

AVIS

Génotypage du virus du papillome humain (VPH) par Linear Array^{MC}

Transmission au ministre : 5 novembre 2018

Publication officielle : 4 janvier 2019

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

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

GÉNOTYPAGE DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN (VPH) PAR LINEAR ARRAY^{MC} (RÉFÉRENCE°– 2018.02.002P)

Avis de réévaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Hôpital du Saint-Sacrement Québec

1.2. Date de transmission de l'avis au ministre : 5 novembre 2018

1.3. Date de publication de l'avis : 4 janvier 2019

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

Le Dr François Rousseau n'a pas participé aux discussions et s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

- Dr Denis Soulières, hémato-oncologue au Centre hospitalier de l'Université de Montréal.
- Dr François Coutlée, microbiologiste et infectiologue au Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

Avis de réévaluation

Le présent document est une réévaluation de l'avis transmis au ministre le 2 avril 2013.

1.4. Retour sur l'évaluation du 2 avril 2013

Le présent document est une réévaluation de l'analyse Génomique des virus VPH par Linear Array^{MC}.

Lors de l'évaluation initiale, l'usage prévu concernait la recherche de virus du papillome humain (VPH) dans :

- ✓ les carcinomes de la sphère ORL;
- ✓ le cancer du col de l'utérus;
- ✓ les autres échantillons fixés au formol et enrobés de paraffine (FFEP);
- ✓ le dépistage du cancer du col utérin.

L'institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) a alors reconnu que la validité technique de la technologie proposée était établie.

Toutefois, l'INESSS a recommandé un refus d'introduction pour les 3 premières indications demandées. Les preuves scientifiques de l'utilité clinique n'étaient pas disponibles pour ces indications.

La demande de réévaluation vise les patients avec :

- ✓ un carcinome épidermoïde oropharyngé;
- ✓ un carcinome épidermoïde multisite impliquant l'oropharynx ou des métastases aux ganglions lymphatiques cervicaux.

2. RÉSUMÉ

Le génotypage du VPH par Linear Array^{MC} est proposé pour compléter l'IHC P16 afin de déterminer le pronostic des carcinomes épidermoïdes oropharyngés. Le génotypage du VPH permet également d'orienter le diagnostic d'un carcinome épidermoïde multisite impliquant l'oropharynx ou avec des métastases dans les ganglions lymphatiques cervicaux dont le résultat de l'IHC P16 est positif.

Valeur diagnostique

Quatre études ont démontré que la détection de l'ADN de VPH de haut risque dans des métastases ganglionnaires impliquait une probabilité élevée que la tumeur primaire soit un carcinome épidermoïde oropharyngé.

Valeur pronostique

Une revue systématique avec méta-analyse réalisée en 2017 démontre que les patients dont le carcinome épidermoïde oropharyngé est P16+/VPH+ présentent un risque relatif de survie à 5 ans significativement plus élevé que les autres patients, y compris ceux dont le carcinome est P16+/VPH-. Dans cette revue systématique, 5,4 % des carcinomes épidermoïdes oropharyngés est P16+/VPH-.

Une étude de plus de 1 200 patients, réalisée en 2018, démontre que la survie à 5 ans des patients dont le carcinome épidermoïde oropharyngé est P16+/VPH- est significativement inférieure à celle des patients P16+/VPH+ et similaire à celle des patients P16-.

Une étude québécoise réalisée en 2013 appuie également la valeur pronostique de la présence d'un VPH dans un carcinome épidermoïde oropharyngé, en

démontrant une survie globale significativement supérieure chez les patients dont la tumeur est positive pour un VPH de haut risque.

Validité analytique

Quatre études ont comparé la performance du Linear Array^{MC} à d'autres méthodes de détection des VPH dans des carcinomes épidermoïdes oropharyngés et autres échantillons apparentés fixés au formol et enrobés en paraffine. La concordance a été supérieure à 90 % dans 3 de celles-ci. La concordance entre le Linear Array^{MC} et l'INNO-LiPA^{MC} était toutefois au mieux de 71,0 %.

Le livret de la trousse Linear Array^{MC} présente une validation complète; toutefois, les échantillons cliniques étaient des cellules cervicales humaines collectées dans le milieu de prélèvement Cobas^{MC} PCR Cell Collection Media ou dans la solution PreservCyt^{MC}.

Impacts budgétaires

L'ajout de l'analyse permettant le génotypage du VPH par Linear Array^{MC} au *Répertoire* pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 47 000 \$ sur l'ensemble des 3 prochaines années.

Autre enjeu

Une analyse déjà inscrite au *Répertoire* permet la détection des VPH de haut risque dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus. Pour une utilisation sur des échantillons de carcinome épidermoïde oropharyngé, le coût de celle-ci est estimé trois fois moins élevé que celui du Linear Array^{MC}.

Positions ou orientations d'organisations d'intérêt

L'OMS, le NCCN, le CAP et le CCO reconnaissent l'importance de détecter la présence d'ADN du VPH dans les carcinomes épidermoïdes oropharyngés dans des situations bien précises. Le CAP et le CCO fournissent d'ailleurs des algorithmes d'utilisation des différentes analyses permettant de déterminer le statut VPH de ces tumeurs.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

Génotypage du virus du papillome humain (VPH) par Linear Array^{MC} pour clarifier l'origine et le pronostic de certains carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (CETC).

3.2. Description de la méthode

Le génotypage est réalisé à l'aide de la trousse Linear Array^{MC} de Roche [Roche Molecular Systems, 2013; Coutlée *et al.*, 2006]. Le test est fondé sur quatre procédés principaux : la préparation des échantillons; l'amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR, de l'anglais *polymerase chain reaction*) de l'ADN cible à l'aide d'amorces; l'hybridation des produits amplifiés avec des sondes oligonucléotidiques et la détection des produits amplifiés liés à la sonde par colorimétrie.

L'ADN du VPH est extrait d'échantillons de tissus frais ou fixés au formol et enrobés de paraffine (FFEP). La lyse des échantillons s'effectue en présence de protéinase K, un agent chaotrope, et d'un détergent, puis l'ADN est extrait et purifié.

Une séquence de 450 paires de bases (pb) de la région L1 polymorphe du génome du VPH est amplifiée par PCR avec des amorces biotinylées. Celles-ci sont conçues pour amplifier l'ADN provenant de 37 génotypes et sous-types de VPH, dont 13, à haut risque (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68). Une paire d'amorces supplémentaire cible le gène de la β -globine afin de contrôler la qualité de l'extraction et l'amplification.

Suite à l'amplification par PCR, les amplicons sont chimiquement dénaturés et des aliquotes sont transférées dans les puits d'une plaque de typage contenant un tampon d'hybridation et une bandelette de génotypage Linear Array^{MC}. Des sondes spécifiques aux différents VPH sont fixées à des positions définies de la bandelette. Les amplicons marqués à la biotine seront hybridés uniquement s'ils contiennent un des polymorphismes recherchés.

Après la réaction d'hybridation, les bandelettes sont lavées puis un conjugué de streptavidine-peroxydase est lié aux amplicons marqués à la biotine. Un réactif de peroxyde d'hydrogène et de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) est ajouté. En présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase oxyde le TMB pour former un complexe de couleur bleue qui précipite aux positions où l'hybridation a lieu. La bandelette est ensuite lue visuellement.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Le pathologiste fait l'examen du tissu et, en présence d'un carcinome épidermoïde oropharyngé ou de métastases ganglionnaires dont le primaire est inconnu, la surexpression de la protéine P16 est déterminée par immunohistochimie (IHC). Les échantillons dont les résultats sont ambigus sont testés par une méthode de détection spécifique au VPH.

Le génotypage du VPH par Linear Array^{MC} est demandé par les pathologistes après examen. Les demandes ainsi que le bloc de tissu FFEP sont acheminés au laboratoire de pathologie de l'Hôpital du Saint-Sacrement. L'extraction, la réaction PCR et la détection des amplicons sont réalisées sur place.

L'analyse est réalisée toutes les 2 semaines et le temps de réponse moyen est de 2 semaines.

3.4. Société ou concepteur

Roche Molecular Systems, Inc.

3.5. Homologation

La trousse Linear Array^{MC} a été homologuée par Santé Canada le 17 novembre 2006 et porte le numéro 68149¹. La trousse a été homologuée sur la base de tests réalisés sur des cellules cervicales humaines collectées dans le milieu de prélèvement PCR Cell Collection Media de Cobas^{MC} ou PreservCyt de Hologic^{MC}, Inc.

La trousse répond également à la directive 98/79 EC de la Communauté européenne, dans les mêmes conditions.

La trousse Linear Array^{MC} n'est pas homologuée par la Food and Drug Administration.

3.6. Valeur pondérée : 155,73

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Patients présentant un carcinome épidermoïde oropharyngé (CEO) primaire dont la tumeur a un résultat équivoque avec l'IHC de la protéine P16.

Patients présentant un carcinome épidermoïde multisite impliquant l'oropharynx ou présentant des métastases de carcinome épidermoïde dans les ganglions lymphatiques cervicaux, dont le résultat de l'IHC P16 est positif.

4.2. Description de la maladie visée

D'après la Société canadienne du cancer, 1335 Canadiens ont reçu un diagnostic de cancer de l'oropharynx lié au VPH et 372 Canadiens sont décédés de ce type de cancer en 2012 [SCC, 2016]. Le cancer de l'oropharynx prend le plus souvent naissance dans les cellules pavimenteuses qui tapissent l'intérieur de l'oropharynx².

¹ Santé Canada. Liste des instruments médicaux homologués en vigueur (MDALL) [site Web], disponible à : <https://produits-sante.canada.ca/mdall-limh/index-fra.jsp>.

² Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques sur le cancer du pharynx [site Web], disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/oropharyngeal/statistics/?region=nb> (consulté le 6 août 2018).

Les facteurs de risque de développement de ce type de cancer sont notamment la consommation d'alcool, de tabac, certains troubles génétiques et l'infection par un virus du papillome humain (VPH).

Les signes et symptômes d'un CEO sont : mal de gorge, impression que quelque chose est coincé dans la gorge, difficulté à mâcher ou à avaler, mauvaise haleine constante, prothèses dentaires qui deviennent mal ajustées, masse dans le cou, douleur à l'oreille, difficulté à parler, perte d'appétit, fatigue, perte de poids, saignement dans la gorge ou la bouche, incapacité à bouger la langue, difficulté à ouvrir la mâchoire et changement de la voix³.

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur prévoit une centaine de demandes par année pour son centre.

4.4. Situation actuelle

Les prélèvements provenant de CEO primaires sont testés pour en déterminer la surexpression de la protéine P16 par IHC. Lorsque la surexpression de la protéine P16 est ambiguë, les échantillons sont testés par Linear Array^{MC} pour déterminer la présence d'un VPH. Lorsqu'un VPH est identifié, le génotype de celui-ci est mentionné au rapport.

Les prélèvements provenant d'un carcinome épidermoïde multisite impliquant l'oropharynx ou avec des métastases de carcinome épidermoïde dans les ganglions lymphatiques cervicaux sont testés par IHC pour la surexpression de la protéine P16. Les échantillons positifs à P16 sont confirmés par Linear Array^{MC}.

4.5. Données médico administratives

Au cours des 4 dernières années, le laboratoire de pathologie moléculaire de l'Hôpital du Saint-Sacrement a réalisé le génotypage du VPH par Linear Array^{MC} selon les volumes suivants :

- ✓ 2014 : 97
- ✓ 2015 : 94
- ✓ 2016 : 67
- ✓ 2017 : 99

Les données de volumétrie de la surexpression de la protéine P16 par IHC ne sont pas disponibles puisque les analyses sont comptabilisées sur un code générique.

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

En présence d'un CEO connu ou suspecté dont l'IHC P16 est équivoque, le test de génotypage permet de déterminer la présence d'un VPH de haut risque, ce qui influence le pronostic des patients.

³ *Ibid.*

En présence d'un carcinome épidermoïde multisite impliquant l'oropharynx ou avec des métastases de carcinome épidermoïde dans les ganglions lymphatiques cervicaux dont le résultat de l'IHC P16 est positif, la détection du VPH permet de confirmer le résultat en IHC et d'orienter la recherche de la tumeur primaire vers un CEO.

4.7. Assurance qualité

La trousse Linear Array^{MC} comprend un contrôle interne qui valide l'amplification de la PCR et la détection de la β -globine. De plus, 2 réactions de PCR supplémentaires sont réalisées avec un contrôle négatif et un contrôle positif au VPH16. Une lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine, réalisée à partir du bloc FFEP reçu au laboratoire, permet au pathologiste de s'assurer de la concordance du tissu et d'éviter les erreurs de bloc tissulaire.

La qualité de l'ADN extrait des tissus FFEP est évaluée dans le laboratoire par un contrôle de qualité externe du CAP, deux fois par année. Notons toutefois que le CAP n'offre pas de test de performance et de contrôle de la qualité pour la détection des virus VPH sur tissu FFEP.

5. DONNÉES PUBLIÉES

La recherche bibliographique échelonnée sur les 10 dernières années a permis de repérer 4 études traitant de la corrélation du statut VPH des métastases ganglionnaires et de l'origine de la tumeur primaire [Sivars *et al.*, 2017; Baldassarri *et al.*, 2015; Yasui *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2011]. Elle a également permis de repérer 2 études traitant de la valeur pronostique combinée du statut VPH et de la surexpression de la protéine P16 en IHC dans les CEO [Nauta *et al.*, 2018; Albers *et al.*, 2017]. Finalement, une étude déterminant le pronostic des personnes atteintes d'un CEO a été réalisée sur des patients québécois [Thibaudeau *et al.*, 2013]. Concernant la validité analytique du Linear Array^{MC}, 4 études permettent d'en comparer les résultats à ceux d'autres méthodes [Pettus *et al.*, 2017; Ambulos *et al.*, 2016; Shanesmith *et al.*, 2011; Kingma *et al.*, 2010].

5.1. Valeur diagnostique

Corrélation diagnostique entre le statut VPH positif d'une métastase ganglionnaire et la présence d'un carcinome épidermoïde oropharyngé

Quatre études évaluant la relation entre le statut VPH d'une métastase ganglionnaire et la localisation de la tumeur primaire ont été retenues [Sivars *et al.*, 2017; Baldassarri *et al.*, 2015; Yasui *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2011]. Les principaux résultats sont présentés au tableau 1 et les caractéristiques des études retenues sont décrites à l'annexe A.

Parmi les métastases de statut VPH positif, 87 (87,9 %) présentaient un CEO, deux (2,0 %) étaient d'origine non oropharyngée et 10 (10,1 %) demeuraient d'origine indéterminée. À l'opposé, lorsque le statut VPH des métastases était négatif, 67 (33,7 %) étaient d'origine oropharyngée, 114 (57,3 %) n'étaient pas d'origine oropharyngée et 18 (9,0 %) demeuraient d'origine indéterminée.

Tableau 1 Corrélation entre l'identification d'un VPH de haut risque et la localisation de la tumeur primaire

Études pays	Nature des échantillons	Statut vph	Manifestations cliniques			
			CEO	CENO	COI	NC
Cohortes prospectives						
Sivars 2017 Suède	66 métastases ganglionnaires de CETC et conditions bénignes	VPH+ VPH-	17 3	- 17	- -	- 29
Baldassarri 2015 États-Unis	37 patients avec métastases ganglionnaires de CETC	VPH+ VPH- Inv. (2)*	18 2	- 15	- -	- -
Yasui 2014 Japon	53 métastases ganglionnaires de CETC	VPH+ VPH- Inv. (3)	13 9	- 18	4 6	- -
Cohortes rétrospectives						
Yasui 2014 Japon	28 CETC avec métastases ganglionnaires et 17 COI	VPH+ VPH-	6 9	- 13	6 11	- -
Weiss 2011 Allemagne	131 CETC avec métastases ganglionnaires	VPH+ VPH-	33† 44	2‡ 51	- 1	- -

Abréviations : CEO : carcinome épidermoïde oropharyngé; CENO : Carcinome épidermoïde non oropharyngé; CETC : carcinome épidermoïde de la tête ou du cou; COI : cancer d'origine indéterminée; Inv. : Résultats invalides; NC : Non cancéreux; VPH : virus du papillome humain.

* 1 résultat invalide par le Cobas HPVMC et 1 résultat négatif par Cobas HPVMC mais invalide au laboratoire de référence.

† Association significative du VPH16 dans une métastase avec la présence d'un CEO ($p < 0,000001$).

‡ Un carcinome de la paroi pharyngée postérieure et un carcinome des 2/3 antérieurs de la langue.

Les auteurs de ces études ont conclu que la présence d'un VPH de haut risque dans une métastase ganglionnaire impliquait une probabilité élevée que la tumeur primaire soit un CEO.

5.2. Valeur pronostique

Valeur pronostique du statut VPH dans les carcinomes épidermoïdes oropharyngés

Revue systématique avec méta-analyse

Albers et ses collaborateurs [2017] ont réalisé une revue systématique avec méta-analyse des études cliniques évaluant la présence d'ADN du VPH et la surexpression de la protéine P16 dans les CETC. Les auteurs ont inclus les études examinant la survie des patients en fonction des statuts P16 et VPH des tumeurs. Les études devaient présenter les données numériques des sous-groupes formés par les marqueurs P16 et VPH, ainsi que les données numériques de survie (rapport de risque; survie globale; survie sans récurrence) ou une courbe de Kaplan-Meier des sous-groupes de survie globale ou de survie sans récurrence.

La survie globale et la survie sans récurrence de tous les sous-groupes ont été évaluées sous la forme de risque relatif avec un intervalle de confiance à 95 %. L'hétérogénéité des études a été évaluée par un test Q basé sur le chi-carré. L'hétérogénéité existante a été examinée avec l'index I^2 . Un modèle à effet fixe a

d'abord été utilisé et un modèle à effet aléatoire a été utilisé lorsque l'hétérogénéité était significative.

Au total, 25 études ont rempli les critères d'inclusion. De celles-ci, 13 ont examiné séparément les patients atteints d'un CEO (3 593 patients). Dans les CEO, les sous-groupes ont été formés dans les proportions suivantes :

- ✓ P16+/VPH+ : 44,9 %
- ✓ P16+/VPH- : 5,4 %
- ✓ P16-/VPH+ : 5,3 %
- ✓ P16-/VPH- : 44,4 %

Le risque relatif de survie à 5 ans entre ces 4 groupes de patients est présenté au tableau 2. L'hétérogénéité entre les études n'était significative qu'entre les groupes P16+/VPH+ et P16-/VPH+ ($p = 0,0372$) et l'auteur a considéré le risque relatif basé sur le modèle à effet aléatoire pour cette comparaison (RR : 2,67; IC95 % : 1,75 à 4,07). Le risque relatif de survie à 5 ans des patients dont le CEO présentait à la fois la surexpression de la protéine P16 et un VPH (P16+/VPH+) était significativement supérieur à celui des 3 autres groupes de patients.

Le risque relatif de survie à 5 ans d'une tumeur P16+/VPH+ contre P16+/VPH- était de 2,26 (IC 95% : 1,85 à 2,75). À l'opposé, chez les patients dont la tumeur exprimait normalement P16 (P16-), le risque relatif selon la présence d'un VPH n'était pas significatif (RR : 0,93; IC95 % : 0,80 à 1,07).

Tableau 2 Pronostic des patients atteints d'un carcinome épidermoïde oropharyngé

Comparaison des groupes de patients (statut p16/vph)		n	I ² (%), Valeur p*	Risque relatif de survie à 5 ans (IC 95 %)	
				Modèle à effet fixe	Modèle à effet aléatoire
P16+/VPH+	P16+/VPH-	9	53,2 0,0934	2,26 (1,85 à 2,75)	2,24 (1,48 à 3,39)
	P16-/VPH+	9	64,6 0,0372	2,64 (2,19 à 3,17)	2,67 (1,75 à 4,07)
	P16-/VPH-	9	29,4 0,2036	2,87 (2,16 à 3,23)	2,78 (2,28 à 3,39)
P16-/VPH-	P16-/VPH+	3	0,0 0,5518	0,93 (0,80 à 1,07)	0,93 (0,80 à 1,07)

Abréviations : IC95 % : Intervalle de confiance à 95 %; N : Nombre d'études; P16 : Surexpression de la protéine P16 en immunohistochimie; VPH : Virus du papillome humain.

* L'absence d'hétérogénéité se traduit par une valeur p supérieure à 0,05

Les analyses de risque relatif de survie sans récurrence et de rapport de risque n'ont été réalisées qu'à partir des carcinomes épidermoïdes de la tête ou du cou (CETC). Il en est de même pour les analyses de sensibilité selon la région des études, selon la méthode de détection ou pour évaluer un biais systématique dû à la méthode de détection du VPH-16 uniquement. Les analyses de sensibilité ont présenté des résultats similaires à la méta-analyse incluant toutes les données.

Les auteurs considèrent que les patients P16 positifs par IHC devraient être testés pour la présence d'un VPH, afin de valider que les tumeurs sont bien causées par un VPH avant d'introduire les patients dans des études cliniques.

Pronostic des patients présentant un carcinome épidermoïde oropharyngé selon le statut VPH

Nauta et ses collaborateurs [2018] ont réalisé une étude rétrospective visant à évaluer le pronostic d'une cohorte de patients hollandais atteints d'un CEO surexprimant la protéine P16 en IHC (IHC); ils ont également évalué la pertinence de déterminer le statut VPH.

Les biopsies tumorales de 1 204 patients ont été utilisées. Les échantillons FFEP ont d'abord été testés en IHC pour la surexpression de la protéine P16, puis, sur les échantillons positifs, le statut VPH a été déterminé par PCR. Les patients ont ainsi été séparés en 3 groupes; 1) P16+/VPH+, 2) P16+/VPH-, 3) P16-.

La coloration de la protéine P16 en IHC a été positive pour les échantillons de 388 patients. Parmi ceux-ci, la détection d'un VPH de haut risque a été positive pour 340 échantillons. La survie à 5 ans du groupe 2 était significativement plus faible que celle du groupe 1 ($p < 0,001$) et comparable à celle du groupe 3 ($p = 0,371$) (tableau 3).

Tableau 3 Pronostic des patients atteints d'un carcinome épidermoïde oropharyngé

Groupe	statut	Nombre de patients (%)	Survie à 5 ans (%)	Test de rang logarithmique (Valeur p)
1	P16+/VPH+	340 (28,2)	78,5	< 0,001
2	P16+/VPH-	48 (4,0)	46,7	Référence
3	P16-	816 (67,8)	43,0	0,371

Abréviations : P16 : Surexpression de la protéine P16 en immunohistochimie; VPH : Virus du papillome humain.

Les auteurs ont conclu à l'importance de déterminer le statut VPH puisqu'un CEO sur huit qui surexprime la protéine P16 ne présente pas de VPH de haut risque et que ce groupe de patients présente un pronostic significativement moins favorable.

Pronostic de patients québécois atteints d'un carcinome épidermoïde oropharyngé selon le statut VPH

Thibaudeau et ses collaborateurs [2013] ont réalisé une étude prospective évaluant l'impact du statut VPH sur le pronostic d'une cohorte de 255 patients québécois atteints d'un CETC localement avancé, dont 169 avec un diagnostic de CEO. La recherche de VPH a été réalisée à partir d'ADN extrait de tissus FFEP. Elle a été effectuée par Linear Array^{MC} puis les échantillons négatifs ont été testés par PCR avec des amorces plus courtes, afin de s'assurer que des résultats négatifs n'étaient pas causés par la dégradation de l'ADN.

Les patients étaient tous diagnostiqués avec un CETC localement avancé de stade III, IVA et IVB, et traités par radiothérapie et chimiothérapie concomitantes, au Centre hospitalier universitaire de Montréal.

Parmi les 255 patients atteints d'un CETC, le Linear Array^{MC} a décelé 127 tumeurs positives pour un VPH (50 %). La recherche par PCR sur les 128 échantillons négatifs a permis de détecter 48 tumeurs positives supplémentaires, pour une proportion finale de tumeurs positives pour un VPH de 69 %. Parmi les 48 tumeurs positives pour le VPH par PCR, 24 ont été séquencées et le VPH16 a été identifié dans chacune d'elles.

Au total, 137 CEO étaient positifs à un VPH. La survie de ces patients était significativement supérieure ($p = 0,0015$), avec une médiane de survie globale non atteinte après 4,63 ans de suivi, comparativement à une médiane de 2,46 ans pour les 32 patients de statut VPH- (tableau 4).

Tableau 4 Pronostic des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête ou du cou selon le statut VPH

Carcinomes épidermoïdes	Total	VPH négatif		VPH positif		Valeur p
		n	SG médiane (année)	n	SG médiane (année)	
Oropharyngés	169	32	2,46	137	> 4,63	0,0015
Tête et cou	255	80	3,09	175	8,89	0,0002

Abréviations : N : Nombre; SG : Survie globale.

Selon les auteurs, les résultats de cette étude confirment que le statut VPH positif est associé à un meilleur pronostic parmi les patients atteints d'un CETC recevant des traitements concomitants de chimiothérapie et de radiothérapie.

5.3. Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif premier de permettre le choix ou la modification d'un traitement. Toutefois, il est évident que la précision du statut VPH contribue aux décisions thérapeutiques.

5.4. Validité analytique

Trousse Linear Array^{MC}

La trousse a été validée à l'aide de cellules cervicales humaines collectées dans le milieu de prélèvement Cobas^{MC} PCR Cell Collection Media ou dans la solution PreservCyt^{MC}.

La limite de détection a été déterminée à partir de séquences d'ADN clonées dans des plasmides pour 18 génotypes de VPH (Annexe B). L'ADN a été dilué à 5 niveaux de concentration minimum dans la solution PreservCyt^{MC} contenant 250 ng/ml d'ADN génomique humain. Les analyses ont été réalisées par 2 opérateurs, chacun effectuant au minimum 4 séries d'analyses se composant d'au moins 3 répliques par niveau de concentration, pour un total d'au moins 24 répliques par niveau.

La capacité de détecter 18 autres génotypes a été réalisée à une dilution de 900 copies/ml dans la solution PreservCyt^{MC} à 6 reprises avec 2 lots de réactifs. Pour les génotypes n'ayant pas été détectés à 100 % des reprises, des analyses supplémentaires ont été effectuées à des concentrations croissantes jusqu'à ce que la détection soit de 100 % (Annexe C).

La reproductibilité du Linear Array^{MC} a été déterminée avec 3 lots de réactifs, 5 combinaisons d'instruments (thermocycleurs et bains-marie) et 3 opérateurs. Chaque opérateur a effectué 5 séries d'analyses avec chacun des 3 lots de réactifs et une série sur chaque combinaison d'instruments. Les génotypes 16, 18, 31 et 45 ont été préparés dans une solution PreservCyt^{MC} (contenant 250 ng/ml d'ADN génomique humain) à des concentrations de 2 000 copies/ml ainsi qu'à des concentrations faibles (3 à 4 fois la limite de détection), moyennes (10 à 15 fois la

limite de détection) et élevées (100 à 150 fois la limite de détection). Chacun de ces génotypes a été testé en 3 exemplaires, en utilisant chaque lot de réactif. La détection a été de 99 % pour les 4 génotypes à 2 000 copies/ml ainsi qu'à la faible concentration, et de 100 % aux concentrations moyennes et élevées d'ADN (Annexe D).

La spécificité du génotypage par Linear Array^{MC} a été validée contre 62 microorganismes non VPH (bactéries, virus, protozoaires et levures). Ceux-ci ont été testés dans la solution PreservCyt^{MC} contenant 250 ng/ml d'ADN génomique humain (Annexe E).

La spécificité du génotype de VPH de chaque ligne de sonde sur la bandelette a été évaluée en analysant des concentrations élevées d'ADN pour 36 génotypes de VPH. Les stocks d'ADN de VPH disponibles ont été dilués à 500 000 copies/ml. Chaque génotype a été amplifié et détecté en duplicata. Les lignes de sonde se sont montrées spécifiques au génotype attendu pour les 36 génotypes testés [Roche Molecular Systems, 2013].

Études de validation analytique

La recherche bibliographique a permis de relever 4 études comparant les résultats du Linear Array^{MC} à d'autres méthodes de détection des VPH dans des échantillons FFEP provenant de CETC [Pettus *et al.*, 2017; Ambulos *et al.*, 2016; Shanesmith *et al.*, 2011; Kingma *et al.*, 2010]. La description de ces études est présentée à l'annexe F. Les résultats de ces différentes comparaisons sont présentés au tableau 5.

Tableau 5 Concordance du Linear Array^{MC} pour le génotypage du VPH à partir d'échantillons de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou fixés au formol et enrobés de paraffine

Études	Échantillons	Comparateurs	Concordance
Pettus 2016 États-Unis	16 CEO 2 MCEO	Cobas HPV ^{MC} : 14 VPH-HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	15/16 (93,8 %) 2 résultats non valides par Cobas ^{MC}
Ambulos 2016 États-Unis	29 CEO	Ion Torrent NGS HPV : 15 génotypes de haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 3 génotypes probablement à haut risque (26, 53, 66) et 7 génotypes de faible risque (6, 11, 40, 42, 43, 44, 70). PCR VPH16 E6/E7	1 ^{er} site : 27/29 (93,1 %) 2 ^e site : 28/29 (96,5 %) VPH16 : 29/29 (100 %)
Shanesmith 2011 États-Unis	135 CETC	INNO-LiPA ^{MC} : 28 génotypes (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 82 et VPH non défini)	Statut VPH : 93/131 (71,0 %) VPH16 : 83/131 (63,4 %) 4 résultats non valides par LiPA

Kingma 2010 États-Unis	52 CEO 16 CETC 10 AINC	PCR VPH16 E6 PCR VPH16 E7 TaqMan VPH16 E7 Invader HPV16/18	Consensus pour le VPH16 : 70/76 (92,1 %)
		Invader HPV16/18 PCR VPH18 E6	Consensus pour le VPH18 : 76/76 (100 %)

Sources : Pettus *et al.*, 2017; Ambulos *et al.*, 2016; Shanesmith *et al.*, 2011; Kingma *et al.*, 2010.

Abréviations : AINC : Amygdales inflammées non cancéreuses; CEO : Carcinome épidermoïde oropharyngé; CETC : Carcinome épidermoïde de la tête et du cou; MCEO : Métastases de CEO; VPH-HR : VPH de haut risque.

5.5. Données fournies par le demandeur

Un plan de validation fourni par le demandeur est présenté à l'annexe G.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au Répertoire de l'analyse permettant le génotypage du VPH par Linear Array^{MC}. Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses s'appuyant sur des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée au tableau 6. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- ✓ L'analyse proposée cible principalement les patients avec un carcinome épidermoïde oropharyngé primaire dont la tumeur présente un résultat équivoque avec l'IHC de la protéine P16. Elle vise aussi les patients avec un carcinome épidermoïde multisite impliquant l'oropharynx ou avec des métastases de carcinome épidermoïde au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux, dont le résultat de l'IHC de la protéine P16 est positif.
- ✓ En 2016-2017, le demandeur a effectué 99 analyses de génotypage du VPH par Linear Array^{MC}.
- ✓ L'analyse proposée n'a fait l'objet d'aucun envoi hors Québec au cours des dernières années.
- ✓ Le demandeur estime qu'environ 100 analyses seraient réalisées durant chacune des trois prochaines années.
- ✓ La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 155,73.
- ✓ À la suite de l'introduction de cette analyse au *Répertoire*, aucune modification de la prise en charge des patients n'est anticipée.

Tableau 6 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant le génotypage du VPH par Linear Array^{MC}

	An 1	An 2	An 3	Total
Analyses Linear Array ^{MC}	100	100	100	300
Impact net	15 573 \$	15 573 \$	15 573 \$	46 719 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			42 047 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			47 653 \$

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant le génotypage du VPH par Linear Array^{MC} au *Répertoire* pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 47 000 \$ pour le total des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Le répertoire contient déjà une analyse permettant le génotypage des VPH de haut risque qui est utilisée dans le contexte du dépistage des cancers du col de l'utérus.

Lors d'une étude de validation comparant les 2 méthodes, les auteurs ont estimé que le coût de l'analyse par Cobas HPV^{MC} est d'environ un tiers de celui du Linear Array^{MC} [Pettus *et al.*, 2017].

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

Selon l'Organisation mondiale de la Santé, la détection du VPH par PCR constitue le test de référence. Elle permet de détecter le virus sur des prélèvements FFEP ou congelés. Elle peut être utilisée en cas de doute à la suite d'un marquage P16 [Sarradin *et al.*, 2018].

Le National Comprehensive Cancer Network [NCCN, 2018] recommande l'IHC P16 comme analyse de routine pour déterminer le statut VPH des CEO. On stipule également que des méthodes telles que la PCR ou l'hybridation *in situ* peuvent pallier en cas de résultats P16 équivoques.

Le CAP [Lewis *et al.*, 2018] a émis des recommandations quant au test, à l'application, à l'interprétation et à la façon de rapporter les résultats de VPH et de marqueurs substitués pour les CETC. L'algorithme diagnostique du CAP est présenté à l'annexe H. Le CAP a émis les recommandations suivantes :

- ✓ Pour les échantillons de tissus oropharyngés, les pathologistes devraient réaliser l'analyse de VPH de haut risque (VPH-HR) par le biais du marqueur substitut P16 par IHC. Un test additionnel spécifique au VPH peut être réalisé à la discrétion du pathologiste ou du médecin traitant, ou dans le contexte d'essais cliniques (recommandation).
- ✓ L'analyse des VPH de faible risque ne devrait pas être réalisée de routine dans les CEO (consensus d'experts).

Le Cancer Care Ontario [Lacchetti *et al.*, 2013] a émis les recommandations suivantes concernant les analyses de routine du VPH dans les CETC :

- ✓ Les tumeurs de tous les patients adultes avec un CEO devraient être testées de routine pour en déterminer le statut VPH.
- ✓ Il est recommandé de déterminer le statut VPH de routine sur les échantillons de tissus de métastases ganglionnaires au cou dont le carcinome épidermoïde primaire est inconnu.
- ✓ Il est recommandé que le statut VPH des CEO soit initialement déterminé par IHC de la protéine P16. Une technique validée de PCR ou d'hybridation *in situ* pour la détection des VPH de haut risque peut être nécessaire pour confirmer le résultat P16, dans certains cas, selon l'algorithme présenté à l'annexe I.

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Génotypage du virus du papillome humain (VPH) par Linear Array^{MC}

La recommandation de l'INESSS

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

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Les valeurs diagnostique et pronostique du génotypage des VPH à haut risque sont reconnues.
- ✓ La pertinence clinique de l'analyse ainsi que son impact réel sur la prise en charge des patients est mise en doute. À ce titre, la valeur ajoutée du choix technologique et des coûts associés ainsi que le génotypage de tous les sous-types de virus n'est pas démontrée.

ANNEXE A

Caractéristiques des études de corrélation diagnostique entre le statut VPH positif d'une métastase ganglionnaire et la présence d'un carcinome épidermoïde oropharyngé (CEO)

Études	Buts et objectifs	Période, Échantillons Extraction, Méthodes d'analyse	Résultats	Discussion Conclusion
Sivars <i>et al.</i> , 2017 Étude prospective Suède	1-Comparer le statut VPH provenant de cytologie d'aspiration à l'aiguille et de tissus FFEP. 2-Investiguer si la présence d'ADN du VPH-16 dans les AA permet de prédire prospectivement un diagnostic final de CEO VPH+.	Période : Entre 2013 et 2016 Nature des échantillons : cytologie de AA (64 sur masse au cou suspecte pour métastases ganglionnaires et 2 sur la tumeur primaire). Provenance des échantillons : 66 patients avec un CETC soupçonné ou avec une masse suspecte au cou. Extraction : AA : QIAmp DNA micro kit, Qiagen FFEP : High Pure FFPE DNA Isolation Kit, Roche Méthodes de détection : AA et FFEP : PCR qui couvre 27 génotypes de VPH AA et FFEP (patients en clinique) : PCR en temps réel TaqMan (détection des 7 principaux génotypes à haut risque).	Sur 66 aspirations à l'aiguille, VPH-16 a été identifié à 17 reprises (aucun autre génotype identifié). Diagnostic final : CEO : 20 (17 VHP+) CENO : 17 (tous VPH-) conditions bénignes : 29 (tous VPH-) Concordance du statut VPH dans les cytologies testées en laboratoire et en clinique : 40/40.	Discussion : Cette étude fait la démonstration prospective que la détection de l'ADN du VPH-16 est efficace sur des échantillons d'aspirations à l'aiguille et que la présence de celui-ci est hautement indicatrice d'un CEO VPH+. Limites : Les AA n'ont été reçues que si suffisamment de matériel était disponible à la suite des procédures diagnostiques standard. Le nombre d'échantillons était limité. Des prélèvements cytologiques et histopathologiques étaient disponibles seulement pour 19 patients. Conclusion : La détection de l'ADN du VPH-16 dans les aspirations à l'aiguille de ganglions lymphatiques cervicaux et de masses au cou est adéquate et la présence d'ADN du VPH-16 dans une métastase est un indicateur fort de la présence d'un CEO VPH+. L'ADN du VPH n'a pas été identifié dans des carcinomes épidermoïdes d'origine autre

				qu'oropharyngée ou dans des conditions bénignes.
Baldassarri <i>et al.</i> , 2015 Étude prospective États-Unis	L'objectif de cette étude est de valider l'efficacité du Cobas HPV ^{MC} à détecter et génotyper les VPH de haut risque dans des échantillons d'aspiration à l'aiguille provenant des ganglions lymphatiques de patients avec ou sans antécédents de CETC.	Période : non précisée Nature des échantillons : 42 échantillons d'aspiration à l'aiguille provenant de 37 patients et conservés dans le milieu PreservCyt^{MC}. 17 patients avaient des antécédents de CETC. Provenance des échantillons : Masses au cou : 36 Ganglions lymphatiques médiastinaux : 5 Masse parapharyngée : 1 Extraction : réalisée par le Cobas Méthodes de détection : Cobas HPV^{MC} IHC P16 Hybridation <i>In situ</i>	Diagnostic cytologique : Carcinomes épidermoïdes : 32 Suspects pour un carcinome épidermoïde : 4 Kystes kératinisés atypiques : 5 Non cancéreux : 3 Corrélation chirurgicale (31 échantillons) : 3 non cancéreux : validés 1 atypique : kyste Autres : validé cancéreux Cobas HPV^{MC} : VPH-16 : 16 VPH-18 : 0 VPH-HR : 4 Négatifs : 21 Non valide : 1 Corrélation entre le statut VPH des patients (37) et la localisation de la tumeur primaire : VPH+ : 18 (tous) de l'oropharynx VPH- : 2 de l'oropharynx, 15 d'origine autre. Non valides : 2 (1 non valide par Cobas HPV^{MC} et 1 discordant entre Cobas HPV^{MC} et laboratoire de référence. 20 échantillons testés par IHC P16, corrélation avec Cobas HPV^{MC} : VPH-HR+ : 11 IHC P16+ 9 VPH-HR- : 11 IHC P16- Aucune des 15 aspirations à l'aiguille de patients avec un CETC provenant d'ailleurs que de l'oropharynx n'était positive pour un VPH-HR (test de Fisher, $P < 0,001$). Statut VPH-HR comme marqueur de CEO : SE : 90,0 % (IC95 % : 66,9 à 98,2 %) SP : 100 % (IC95 % : 74,7 à 100 %)	Discussion : Dans cette étude, les échantillons d'aspiration à l'aiguille dans lesquels a été identifié un VPH de haut risque, étaient tous des carcinomes épidermoïdes oropharyngés. 90 % des métastases provenant de CEO ont été testées positives pour un VPH de haut risque. Aucune discordance n'a été rencontrée entre les résultats sur les échantillons cytologiques et histologiques. Conclusion : L'étude démontre que le Cobas HPV^{MC} est une méthode efficace pour déterminer le statut de VPH de haut risque et le génotype dans les métastases ganglionnaires de CETC à partir d'aspiration à l'aiguille. Un statut VPH-HR positif a présenté une corrélation forte avec un CEO primaire chez les patients avec un CETC. Une telle information serait utile pour diriger les analyses diagnostiques et la prise en charge des patients.

Yasui <i>et al.</i> , 2014 Étude à 2 volets Japon	Améliorer la compréhension clinique du statut VPH des métastases ganglionnaires provenant de cancer dont la tumeur primaire est inconnue. Investigation du statut VPH, incluant la présence d'ADN du VPH, du génotype et du statut physique dans des paires d'échantillons provenant de tumeurs primaires et de métastases de CETC.	Volet rétrospectif Période : 2005 à 2010 Provenance des échantillons : 28 paires d'échantillons provenant de CETC primaires et de métastases ganglionnaires 17 carcinomes épidermoïdes d'origine inconnue. Nature des échantillons : FFEP Extraction : DNeasy tissue kit (QIAGEN) Volet prospectif Période : 2010 à 2012 Provenance des échantillons : 53 métastases ganglionnaires de CETC Nature des échantillons : non fixés Extraction : QIAamp Mini Kit (QIAGEN) Méthodes de détection : IHC P16 PCR nichée pour VPH-HR et séquençage	Volet rétrospectif : CEO : 6/15 VPH+ Autres CETC : 0/13 VPH+ COI : 6/17 VPH+ Le statut VPH correspondait entre les tumeurs et les métastases associées à 28/28 ($p < 0,0001$). Parmi les CEO, 1/6 VPH+ et 3/9 VPH- avaient de multiples métastases et le statut de celles-ci correspondait au statut VPH du CEO. Volet prospectif : CEO : 13/22 VPH+ Autres CETC : 0/18 VPH+ COI : 4/10 VPH+ Analyse par PCR non valide : 3 Le statut VPH correspondait entre les tumeurs et les métastases associées à 40/40 ($p < 0,0001$). Génotypes : CEO VPH+ : 18 VPH16, 1 VPH33 Le génotype correspondait entre les tumeurs et les métastases associées à 19/19 ($p < 0,0001$). COI VPH+ : 8 VPH16, 2 VPH18 Carcinomes d'origine inconnue : Sur 27 COI (rétro. et prosp.), 19 (5 VPH+, 14 VPH-) ont eu une amygdalectomie et une dissection au cou qui ont révélé une tumeur aux amygdales chez 6/19 (3 VPH+, 3 VPH-). L'IHC P16 et le statut VPH correspondaient entre la tumeur, les métastases et les tumeurs repérées ($P = 0,01$). La différence de distribution des tumeurs P16/VPH était significative	Discussion : Cette étude démontre que : Les métastases ganglionnaires VPH+ sont spécifiques aux CEO. Le statut VPH et le génotype concordent entre la tumeur primaire et les métastases ganglionnaires associées. Le statut P16 et VPH demeure inchangé lorsque la tumeur génère des métastases. En présence d'un COI avec des métastases ganglionnaires VPH+, le site de la tumeur primaire est l'oropharynx. L'amygdalectomie n'a permis d'identifier la tumeur primaire d'aucun COI P16-/VPH-. Conclusion : Le statut VPH de la tumeur demeure inchangé après le développement de métastases. En présence d'un COI VPH+, la tumeur primaire est probablement localisée dans l'oropharynx. Les CEO et COI VPH+ tendent à former des kystes métastatiques dans les ganglions. L'analyse par PCR d'une aspiration permet la détection de l'ADN du VPH sans intervention chirurgicale, ce qui peut faciliter le diagnostic différentiel entre un kyste métastatique au ganglion et un kyste de la fente branchiale.
---	---	--	---	--

			entre les COI avec et sans tumeur repérée ($p = 0,0004$) : Pas de tumeur : 10 P16-/VPH-, 1 P16+/VPH-, 2 P16+/VPH+ Avec une tumeur : 3 P16+/VPH-, 3 P16+/VPH+ La probabilité de trouver une tumeur à la dissection était significativement supérieure si IHC P16+ : RC : 39,0 IC95 % : 1,4 à 377,9; $P = 0,02$.	
Weiss <i>et al.</i> , 2011 Allemagne	Déterminer la prévalence du VPH16 dans les métastases ganglionnaires de CETC et son impact sur les caractéristiques clinico-pathologiques.	Période : 2001 à 2009 Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : CETC de 131 patients avec des métastases ganglionnaires. Le statut VPH16+ a été validé sur les métastases de 20 de ces patients. Le statut P16 et la localisation de la tumeur primaire de 13 de ces patients. Extraction : QIAamp DNA Mini Kit Méthodes : PCR en temps réel pour VPH16 IHC P16	Statut VPH16 et localisation de la tumeur primaire Amygdales et base de la langue (CEO) : 77 dont 33 VPH16+ Autres emplacements (CENO) : 53 dont 2 VPH16+ (Un carcinome de la paroi pharyngée postérieure et un carcinome des 2/3 antérieurs de la langue). COI : 1 VPH- Statut VPH16+ est associé au CEO : $p < 0,000001$ Statut P16 et localisation de la tumeur primaire CEO : 30 P16+ CENO : 5 P16+ COI : 0 P16+ Statut P16 est associé aux CEO : $P = 0,0001$ Statut P16+/VPH16+ : 28 tumeurs Statut VPH16+ des métastases de tumeurs primaires P16+/VPH16+ (11 base de la langue et 9 amygdales) a été validé : 20/20 Carcinomes d'origine inconnue 13 patients se sont initialement présentés avec des métastases des ganglions lymphatiques cervicaux, mais sans tumeur primaire apparente. Localisation de la tumeur primaire : Amygdales : 7 patients (VPH16+)	Discussion/Conclusion : Dans cette étude, 27 % des CETC sont VPH16+. Les carcinomes des amygdales et de la base de la langue avaient la plus forte corrélation avec la présence d'ADN du VPH16. Il n'y avait pas de forte corrélation entre le statut VPH16 et l'âge, l'alcool et la consommation de tabac. L'étude démontre que les patients VPH16+ ont un meilleur pronostic en analyse univariée et multivariée. Les statuts VPH16+ et P16+ sont des marqueurs indépendants de pronostic favorable quant à la survie globale et à la survie sans progression. En excluant les COI, le statut VPH16+ des métastases de 20 CETC a pu être validé (20/20). Le statut VPH16 de 13 COI et la localisation de la tumeur primaire associée ont pu être déterminés. L'amygdalectomie et la biopsie de la base de la langue ont été suffisantes pour

			base de la langue : 5 patients (VPH16+) Indéterminé : 1 patient (VPH16-)	identifier la tumeur primaire dans 12 cas, qui étaient tous VPH16+. En cas de COI, les efforts nécessaires à l'identification de la tumeur primaire devraient être entrepris, y compris l'amygdalectomie, la biopsie de la base de la langue et la recherche du VPH16 par PCR dans les métastases des ganglions lymphatiques.
--	--	--	---	--

Abréviations : AA : Aspiration à l'aiguille; CEO : Carcinome épidermoïde oropharyngé; CETC : Carcinome épidermoïde de la tête et du cou; CENO : Carcinome épidermoïde non oropharyngé; COI : carcinome d'origine inconnue; FFEP : échantillon fixé au formol et enrobé de paraffine; VPH : Virus du papillome humain; VPH-HR : VPH de haut risque.

ANNEXE B

Limite de détection du Linear Array^{MC}

Génotype de VPH	Concentration à laquelle un taux de détection de 95 % est prévu (copies/ml)	Concentration à partir de laquelle un taux de détection de 95 % a été observé pour toutes les concentrations supérieures (copies/ml)
VHP6	2 319	2 000
VHP16	195	200
VHP18	580	1 300
VHP26	2 935	6 000
VHP31*	1 863	6 600
VHP33†	4 000	20 000
VHP35	466	600
VHP39	1 367	1 500
VHP45	401	900
VHP51	181	260
VHP53	256	400
VHP56	6 915	12 000
VHP58	185	250
VHP59	53	76
VHP66	250	300
VHP68	848	900
VHP73	165	300
VHP82	8 089	20 000

* Pour le génotype 31, des taux de détection supérieurs à 95 % ont été observés à 2 000, 1 300, 900 et 660 copies/ml et des taux de détection de 92 % ont été observés à 3 300 et 3 000 copies/ml.

† Pour le génotype 33, des taux de détection supérieurs à 95 % ont été observés à 4 000 et 2 700 copies/ml, un taux de succès de 92 % a été observé à 6 700 copies/ml et un taux de succès de 94 % a été observé à 13 000 copies/ml.

ANNEXE C

Limite de détection du Linear Array^{MC}

Génotype de VPH	Concentration à laquelle un taux de détection de 100 % est observé* (copies/ml)
VPH11	900
VPH40	70 000
VPH42	30 000
VPH54	900
VPH55	900
VPH61	900
VPH62	900
VPH64	300 000
VPH67	30 000
VPH69	900
VPH70	900
VPH71	900
VPH72	900
VPH81	900
VPH83	900
VPH84	900
VPH CP6108	900
VPH IS39	1 500

* 6 échantillons testés par concentration à partir de 900 copies/ml.

ANNEXE D

Reproductibilité du Linear Array^{MC}

Concentration d'ADN	Génotypes et concentrations (copies/ml)				Nombre de tests	Résultats positifs	Reproductibilité % (IC95 %)
	VPH16	VPH18	VPH31	VPH45			
Élevée (100 à 150 fois)	12 000	81 500	192 000	25 100	135	135	100 (98 à 100 %)
Moyenne (10 à 15 fois)	1 200	8 150	19 200	2 510	135	135	100 (98 à 100 %)
Faible (3 à 4 fois)	360	2 445	5 760	753	135	133	99 (95 à 100 %)
2 000 copies/ml	2 000	2 000	2 000	2 000	135	133	99 (95 à 100 %)

Abréviation : IC95 % : Intervalle de confiance à 95 %.

ANNEXE E

Microorganismes non-VPH pour lesquels le Linear Array^{MC} est spécifique

Achromobacter xerosis	Eikenella corrodens	Mycobacterium avium
Acinetobacter ssp. genospecies 3	Enterobacter cloacae	Mycoplasma hominis
Actinomyces israelii	Enterococcus faecalis	Neisseria gonorrhoeae
Aerococcus viridans	Erysipelothrix rhusiopathiae	Pasteurella maltocida
Aeromonas hydrophila	Escherichia coli	Pediococcus acidilactica
Agrobacterium radiobacter	Ewingella americana	Peptostreptococcus productus
Agrobacterium radiobacter	Ewingella americana	Peptostreptococcus productus
Alcaligenes faecalis	Flavobacterium meningosepticum	Prevotella corporis
Bacteriodes fragilis	Gemella morbillorum	Proteus mirabilis
Bifidobacillus longum	Gardnerella vaginalis	Providencia stuartii
Bifidobacterium adolescentis	Haemophilus ducreyi	Pseudomonas aeruginosa
Branhamella catarrhalis	Virus Herpès simplex de type 1	Rahnella aquatilis
Brevibacterium linens	Virus Herpès simplex de type 2	Salmonella minnesota
Candida albicans	Kingella kingae	Serratia denitrificans
Chlamydia trachomatis type D	Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae	Staphylococcus aureus
Chlamydia trachomatis type F	Lactobacillus vaginalis	Streptococcus anginosus
Chromobacter violaceum	Lactococcus lactis cremoris	Streptococcus epidermidis
Clostridium perfringens	Legionella pneumophila	Treponema phagedenis
Corynebacterium genitalium	Leuconostoc paramesenteroides	Trichomonas vaginalis
Cryptococcus neoformans	Micrococcus luteus	Vibrio parahaemolyticus
Deinococcus radiopugnans	Moraxella osloensis	Yersinia enterocolitica
Derxia gummosa	Morganella morganii	

ANNEXE F

Caractéristiques des études de validation analytique retenues

Études	Buts et objectifs	Période, Échantillons Extraction, Méthodes d'analyse	Résultats	Discussion Conclusion
Pettus <i>et al.</i> , 2017 États-Unis	Étude de validation de la détection des VPH de haut risque à partir de tissus FFEP provenant de CEO par Cobas HPV ^{MC} *	Période : non précisée Nature des échantillons : FFEP Échantillons : 28, de 25 patients, dont : 16 CEO primaires 2 métastases ganglionnaires de CEO primaire 3 papillomes 1 cancer de la langue 1 cancer pulmonaire 1 cancer du col de l'utérus 1 cancer de l'utérus Extraction : 6 par Qiacube, 22 par Puregene Méthodes en place dans le laboratoire : - Immunohistochimie P16 - Linear Array^{MC}	CEO et métastases de CEO : 2 non valides par Cobas HPV^{MC} 15 concordants 1 discordant (VPH-33 par LA, négatif par Cobas HPV^{MC}, IHC+) Concordance 15/16 = 93,8 % Autres échantillons : 3 papillomes : VPH-11 par LA et négatif par Cobas HPV^{MC} 4 autres cancers : concordants Concordance totale : 25/26 = 96,2 % Concordance pour VPH-16 et VPH-18 : 100 %	Discussion : Les résultats négatifs ou non valides obtenus par Cobas HPV^{MC} pourraient être validés en 2^e ligne par Linear Array^{MC}. Utiliser le Cobas HPV^{MC}, en 1^{re} ligne pourrait réduire significativement le délai de réponse, le temps technique et les coûts associés à la stratégie actuelle (Linear Array^{MC}). Conclusion : Cette étude documente le développement avec succès d'une méthode d'identification des CEO associés à un VPH à partir de tissus FFEP en utilisant la méthode automatisée Cobas 4800 HPV^{MC}. Cette méthode pourrait être utilisée de routine dans les laboratoires cliniques de pathologie moléculaire.
Ambulos <i>et al.</i> , 2016 États-Unis	Comparer la capacité du NGS HPV par ion torrent [†] à celle du Linear Array ^{MC} , à géotyper adéquatement des VPH dans des échantillons de CETC et CC FFEP archivés.	Période : non précisée Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : 29 CEO 13 CC 2^e analyse : géotypage de 266 cc Extraction : QIAamp DNA FFEP Tissue Kit Méthodes de détection : - Ion torrent NGS HPV (2 sites) - Linear Array^{MC} - PCR VPH-16 - IHC P16	CEO : - Négatifs : 10 - VPH-16 : 10 - VPH-35 : 2 - VPH-26, 33, 58 : 1 fois chacun - VPH-6 + VPH-59 : 1 Discordants : 3 Les 3 résultats discordants avec le Linear Array^{MC} étaient discordants entre les 2 sites par NGS HPV : a) VPH-16 identifié 2 fois par le 1^{er} site, mais négatif au 2^e site, au Linear Array^{MC} et à la PCR. b) VPH-33 identifié 1 fois au 2^e site, mais négatif au 1^{er} site ainsi qu'au Linear Array^{MC}. Concordance du Linear Array^{MC} :	Discussion : Bien que le Linear Array^{MC} soit sensible et spécifique, il est cher à l'unité et demande beaucoup de temps technique, ce qui le rend impraticable pour réaliser des études sur de nombreux échantillons. Ces données démontrent que le Linear Array^{MC} peut produire des résultats faux positifs.

			1 ^{er} site : 27/29 = 93,1 % 2 ^e site : 28/29 = 96,5 % PCR (identification du VPH-16) : 29/29 Cancers du col, concordance pour le cancer du col : 1 ^{er} site : 8/8 2 ^e site : 12/13	
Shanesmith <i>et al.</i> , 2011 États-Unis	2 essais commerciaux de Reverse line blot par PCR ont été comparés pour évaluer la présence d'ADN du VPH dans des biopsies cliniques de CETC envahissants.	Période : 2005 à 2010 Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : 135 CETC (oraux et oropharyngés) Extraction : DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen Méthodes comparées : INNO-LiPA HPV Genotyping Extra ^{MC†} de Innogenetics Linear Array ^{MC} de Roche	Amplification : 135 par LA, 131 par INNO-LiPA Sur 131 échantillons amplifiés par les 2 méthodes : négatifs : 18 mêmes génotypes identifiés : 51 VPH+; ≥ 1 génotype en commun : 13 VPH+ de génotypes différents : 11 VPH+ par 1 seule méthode : 38 VPH positifs : 61,1 % par LA et 82,4 % par INNO-LiPA VPH-16 : 92,5 % des VPH+ par LA, 83,3 % des VPH+ par INNO-LiPA et 90,6 % des 64 VPH+ concordants pour ≥ 1 génotype VPH-16 identifiés : Linear Array ^{MC} : 74 INNO-LiPA ^{MC} : 90 Concordants : 58 sur 106 = 54,7 % VPH de haut risque identifiés (16,18, 31, 33, 35, 45, 52) : Linear Array ^{MC} : 88 INNO-LiPA ^{MC} : 106 Concordants : 63 sur 131 = 48,1 % Concordance : Statut VPH+ : 93/131 = 71,0 %, $K = 0,32$ Statut VPH-16 : 83/131 = 63,4 %, $K = 0,23$ Concordance exacte (positifs et négatifs) : 69/131 = 52,7 %	Discussion : Les 2 méthodes présentent un niveau de concordance globale faible (52,7 %) pour 131 échantillons FFEP provenant de CETC. La concordance n'était que légèrement supérieure en tenant compte des échantillons concordants pour au moins 1 génotype (62,6 %). Le Linear Array ^{MC} a identifié significativement moins de cas avec des VPH de haut risque que le INNO-LiPA. Conclusion : Un haut degré de concordance était attendu entre les 2 méthodes, étant donné l'utilité documentée des 2 méthodes à amplifier des séquences d'ADN de VPH dans les échantillons FFEP et le spectre relativement restreint de génotypes de VPH présents dans les CETC. Cette étude montre une faible concordance entre les méthodes, dans des échantillons FFEP.
Kingma <i>et al.</i> , 2010 États-Unis	Cette étude évalue l'habilité de 6 différents protocoles moléculaires à caractériser le statut VPH d'une série de biopsies de CETC FFEP et tente de déterminer l'utilité diagnostique	Période : 2005 à 2007 (patients consécutifs) Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : 52 CEO invasifs 16 CETC 10 AINC Extraction : DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen	Amplification 78/78 sauf Invader HPV 16/18 : 69/78 (8 résultats non valides en dépit d'analyses répétées et 1 échantillon dont l'ADN était insuffisant). Prévalence : LinearArray HPV ^{MC} : VPH+ : 48 (61,5 %) VPH-16 : 45 (57,7 %) VPH-18 : 5 (6,4 %) Méthode avec la prévalence la plus élevée :	Discussion / Conclusion : Le Linear Array ^{MC} , TaqMan, les PCR VHP-16 E6 et E7 ont montré une concordance excédant 90 %, ce qui porte à croire qu'ils sont cliniquement utiles à la détection des VPH de haut risque dans les CETC FFEP. Une validation plus approfondie des méthodes testées, y compris la reproductibilité, la sensibilité et les

	de chaque technique.	Méthodes comparées : Linear Array ^{MC} PCR VPH-16 E6 PCR VPH-16 E7 PCR VPH-18 E6 TaqMan VPH-16 E7 Invader HPV16/18	VPH+ : Linear Array ^{MC} (61,5 %) VPH-16 : PCR VPH-16 E7 (60,3 %) VPH-18 : PCR VPH-18 E6 (12,8 %) Concordance du Linear Array ^{MC} avec le consensus des différentes méthodes : VPH+ : VPH-16 : 70/76 (92,1 %) VPH-18 : 76/76 (100 %) Concordance entre les méthodes pour la détection : VPH-16 : $K = 0,72$ VPH-18 : $K = 0,43$ Concordance avec le consensus pour le VPH-16 : PCR VPH-16 E6 : 98,7 %; $K = 0,97$ TaqMan : 93,4 %; $K = 0,87$ Linear Array ^{MC} : 92,1 %; $K = 0,84$ Concordance avec le consensus pour le VPH-18 : Linear Array ^{MC} : 100 %; $K = 1,0$ PCR VPH-18 E6 : 94,7 %; $K = 0,69$ Invader : 94,2 %; $K = 0,32$	paramètres de spécificité, est requise afin d'en démontrer pleinement l'utilité clinique.
--	----------------------	---	--	---

Sources : Pettus et al., 2017; Ambulos *et al.*, 2016; Shanesmith *et al.*, 2011; Kingma *et al.*, 2010.

Abréviations : AINC : Amygdales inflammées non cancéreuses; CC : cancers du col; CEO : Carcinome épidermoïde oropharyngé; CETC : Carcinome épidermoïde de la tête et du cou; FFEP : fixé au formol et enrobé de paraffine; FR : Faible risque; IHC : immunohistochimie; LA : Linear Array^{MC}; ND : non défini; PCR : réaction de polymérase en chaîne;

* Cobas HPV^{MC} de Roche : 14 Génotypes de haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)

† Ion Torrent NGS HPV Genotyping Assay : 15 génotypes de haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 3 génotypes probablement à haut risque (26, 53, 66) et 7 génotypes de faible risque (6, 11, 40, 42, 43, 44, 70).

‡ INNO-LiPA HPV Genotyping Extra^{MC} de Innogenetics : 28 génotypes (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 82) et VPH non défini.

ANNEXE G

Plan de validation fourni par le demandeur

Plan de validation

- 24 cas de génotypage du VPH seront validés dans le laboratoire de microbiologie médicale du CHUM, avec l'accord de Dr François Coutlée, chef de service du laboratoire.
- Les 24 cas sont des cas de carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL, préalablement testés dans notre laboratoire pour la présence de VPH par la technique de génotypage.
- La technique utilisée pour la validation dans le laboratoire du CHUM est la même technique que celle que nous utilisons, soit la technique PCR avec les trousse «Linear Array Genotyping Test» et «Linear Array detection kit» de la compagnie Roche Molecular Systems.
- Répartition des 24 cas : 10 cas négatifs, 14 cas positifs (incluant 10 cas positifs VPH haut risque et 4 cas VPH faible risque). Les cas seront anonymisés.
- Pour chacun des cas, l'ADN déjà extrait du tissu FFPE et qui a servi à la technique de génotypage dans notre laboratoire sera envoyé au laboratoire du CHUM.
- Une fois les résultats reçus, un tableau de validation sera préparé et transmis au MSSS.

Le plan a été préparé par : Claudie Paquet Ph.D.

Le plan a été approuvé par : Dr Martine Périgny le 2018-09-18

ANNEXE H

Algorithme diagnostique du CAP

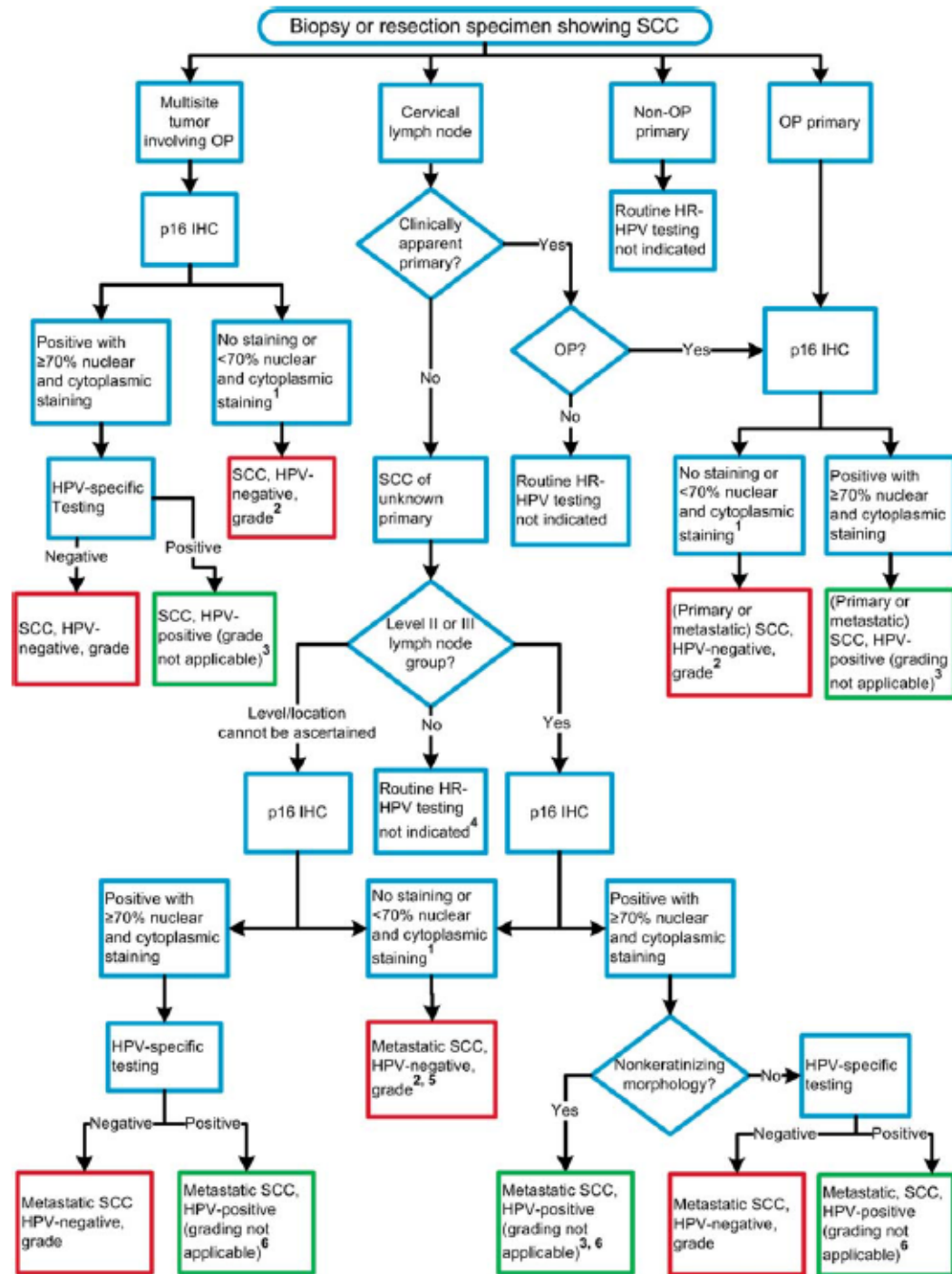
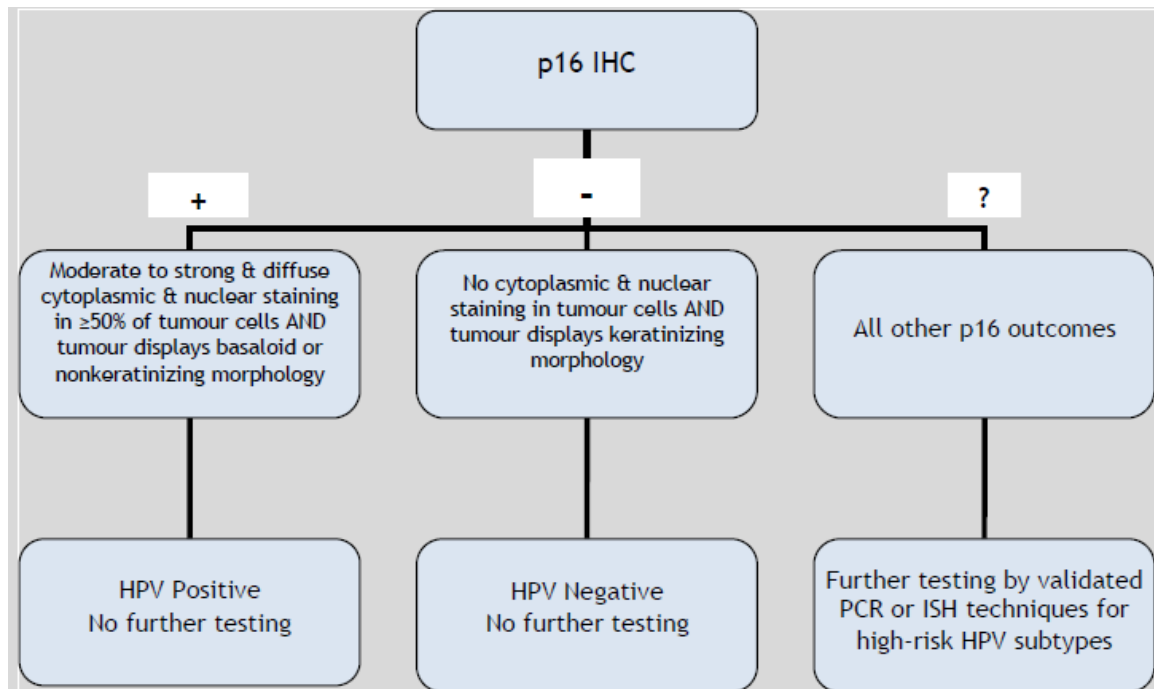


Figure 1. High-risk human papillomavirus (HR-HPV) testing in head and neck squamous cell carcinomas (SCCs). Abbreviations: IHC, immunohistochemistry; OP, oropharyngeal. ¹Consider HR-HPV-specific testing for equivocal p16 results (50%–70% nuclear and cytoplasmic staining). ²May also be reported as p16 negative with a comment specifying that the tumor is very likely HPV negative. ³May also be reported as p16 positive with a comment specifying that the tumor is very likely HPV positive. ⁴HR-HPV may be indicated in patients where the clinical suspicion for an HPV-positive SCC is high. ⁵Consider Epstein-Barr encoding region (EBER) in situ hybridization for Epstein-Barr virus for the rare metastatic nonkeratinizing squamous cell carcinoma that is HR-HPV negative. ⁶Include comment, “Likely oropharyngeal primary.”

ANNEXE I

Algorithme diagnostique du CCO



RÉFÉRENCES

- Albers AE, Qian X, Kaufmann AM, Coordes A. Meta analysis: HPV and p16 pattern determines survival in patients with HNSCC and identifies potential new biologic subtype. *Sci Rep* 2017;7(1):16715.
- Ambulos NP Jr, Schumaker LM, Mathias TJ, White R, Troyer J, Wells D, Cullen KJ. Next-generation sequencing-based HPV genotyping assay validated in formalin-fixed, paraffin-embedded oropharyngeal and cervical cancer specimens. *J Biomol Tech* 2016;27(2):46-52.
- Baldassarri R, Aronberg R, Levi AW, Yarbrough WG, Kowalski D, Chhieng D. Detection and genotype of high-risk human papillomavirus in fine-needle aspirates of patients with metastatic squamous cell carcinoma is helpful in determining tumor origin. *Am J Clin Pathol* 2015;143(5):694-700.
- Coutlée F, Rouleau D, Petignat P, Ghattas G, Kornegay JR, Schlag P, et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* 2006;44(6):1998-2006.
- Kingma DW, Allen RA, Caughron SK, Melby M, Moore WE, Gillies EM, et al. Comparison of molecular methods for detection of HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2010;19(4):218-23.
- Lacchetti C, Waldron J, Perez-Ordóñez B, Kamel-Reid S, Cripps C, Gilbert R. Routine HPV testing in head and neck squamous cell carcinoma. Program in Evidence-based Care Evidence-based Series 5-9. Toronto, ON : Cancer Care Ontario; 2013. Disponible à : <https://www.cancercareontario.ca/en/guidelines-advice/types-of-cancer/581>.
- Lewis JS Jr, Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: Guideline from the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(5):559-97.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Head and neck cancers. Version 1.2018. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Fort Washington, PA : NCCN; 2018. Disponible à : http://oncolife.com.ua/doc/nccn/Head_and_Neck_Cancers.pdf.
- Nauta IH, Rietbergen MM, van Bokhoven AA, Bloemena E, Lissenberg-Witte BI, Heideman DA, et al. Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann Oncol* 2018;29(5):1273-9.
- Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsague X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2014;15(12):1319-31.
- Pettus JR, Wilson TL, Steinmetz HB, Lefferts JA, Tafe LJ. Utility of the Roche Cobas 4800 for detection of high-risk human papillomavirus in formalin-fixed paraffin-embedded oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2017;102(1):47-9.

- Roche Molecular Systems. LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test. Branchburg, NJ : Roche Molecular Systems, Inc.; 2013. Disponible à : https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/ca/en/Documents/GetDocument?documentId=4a743a49-89f4-e311-98a1-00215a9b0ba8.
- Sarradin V, Siegfried A, Uro-Coste E, Delord JP. Classification de l'OMS 2017 des tumeurs de la tête et du cou : principales nouveautés et mise à jour des méthodes diagnostiques. *Bull Cancer* 2018;105(6):596-602.
- Shanesmith R, Allen RA, Moore WE, Kingma DW, Caughron SK, Gillies EM, Dunn ST. Comparison of 2 line blot assays for defining HPV genotypes in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70(2):240-5.
- Sivars L, Landin D, Haeggbloom L, Tertipis N, Grün N, Bersani C, et al. Human papillomavirus DNA detection in fine-needle aspirates as indicator of human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: A prospective study. *Head Neck* 2017;39(3):419-26.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2016. Toronto, ON : SCC; 2016. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%201/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2016-FR.pdf?la=fr-CA>.
- Thibaudeau E, Fortin B, Coutlée F, Nguyen-Tan P, Weng X, Audet ML, et al. HPV prevalence and prognostic value in a prospective cohort of 255 patients with locally advanced HNSCC: A single-centre experience. *Int J Otolaryngol* 2013;2013:437815.
- Weiss D, Koopmann M, Rudack C. Prevalence and impact on clinicopathological characteristics of human papillomavirus-16 DNA in cervical lymph node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011;33(6):856-62.
- Yasui T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, et al. Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. *PLoS One* 2014;9(4):e95364.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

