

Détection de mutations du gène *KRAS* par TAAN

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

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

Avis d'évaluation

(Désignation complémentaire)

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CHU de Québec – Université Laval

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

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

2. RÉSUMÉ

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

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

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

3.2. Description de la méthode

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

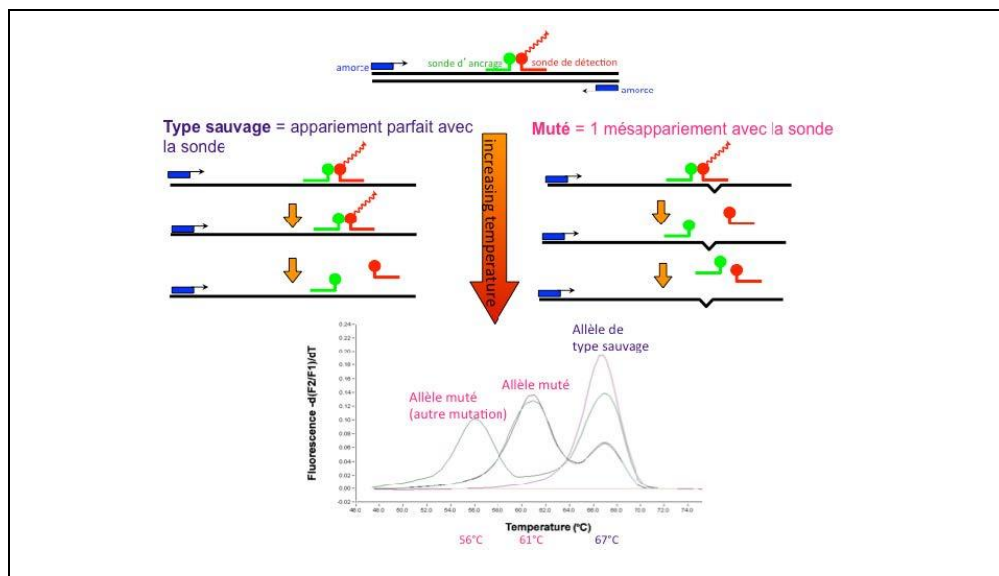


Figure 1 Détection de mutations par les sondes d'hybridation FRET

Source : Données de validation fournies par le laboratoire demandeur.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

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

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

Algorithme

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

Temps de réponse

Moins de 10 jours ouvrables.

3.4. Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison.

3.5. Homologation

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

3.6. Valeur pondérée : 108,44

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

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

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

4.2. Description de la maladie visée

Incidence du cancer colorectal

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

Mutations du gène *KRAS*

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

Prise en charge et traitement

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

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

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

4.4. Situation actuelle

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

4.5. Données médico administratives

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Selon le demandeur, l'analyse permettrait :

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

4.7. Assurance qualité

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

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

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

5.2. Valeur pronostique et thérapeutique

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

5.3. Validité analytique

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

La COLD-PCR combinée au séquençage de Sanger

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

Une comparaison de sensibilité a été effectuée en analysant entre autres les mutations dans le gène *KRAS* à l'aide d'une trousse commerciale pour effectuer une spectrométrie de masse (Sequenom Inc.) ou en précédant le séquençage de Sanger de la PCR-ciblée ou la « Fast COLD-PCR »¹.

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

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

¹ La Fast COLD-PCR est la version rapide de la COLD-PCR permettant d'enrichir les mutations G>C et A>T qui réduisent la température de fusion du produit à amplifier, en utilisant une température T_c (température de dénaturation critique) qui promeut l'amplification de l'allèle mutant [Pritchard *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dans une étude similaire, Mancini et ses collaborateurs [2010] ont effectué la technique COLD-PCR combinée à la « high-resolution melting (HRM)² » et au séquençage pour détecter entre autres les mutations du gène *KRAS* dans des échantillons de tissus tumoraux congelés provenant de patients atteints de cancer colorectal (n = 117). La COLD-PCR a été réalisée en utilisant deux procédures alternatives, à savoir une procédure abrégée « Fast COLD-PCR » et une complète « Full COLD-PCR ». La procédure abrégée révélait les allèles enrichis à la température de fusion, tandis que la COLD-PCR complète révélait les allèles permettant de maintenir ou d'augmenter la température de fusion dans le but d'en augmenter la sensibilité analytique [Mancini *et al.*, 2010].

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

² La « high resolution melting » est une analyse post-PCR employée pour détecter des variations dans les séquences d'acides nucléiques. La méthode est basée sur la détection de différences entre les courbes de fusion (information tirée de « A guide to high resolution melting (HRM) analysis » (2009), disponible à : <https://www.gene-quantification.de/ab-hrm-guide.pdf>).

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

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

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

Abréviations : s. o. : Sans objet.

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

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

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

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

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

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

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

5.4. Données fournies par le demandeur

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

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

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

Concordance des résultats entre la PCR et le séquençage

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

Tableau 6 Nombre de patients de type sauvage ou muté

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

Source : Données de validation du demandeur.

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

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

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

Source : Données fournies par le demandeur.

Limites de détection

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

Quantité d'ADN

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

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

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

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

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

Source : Données fournies par le demandeur.

Résultats globaux et interprétation

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

Tableau 9 Fréquence des géotypes

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

Source : Données fournies par le demandeur.

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

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

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

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

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

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

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

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

National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

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

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

American Society of Clinical Oncology (ASCO)

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

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

Groupe d'experts canadiens

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

Tableau 10 Catégories des consensus

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

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

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

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

Déroulement de l'analyse

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

Analyse optimale pour déterminer le statut mutationnel de *KRAS*

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

Exigences à observer pour rapporter les résultats d'analyse

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

Temps de réponse acceptable

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

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

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

Tableau 11 Description de la force de recommandation

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

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

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

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

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

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

Alberta Health Services

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

Japanese Society of Medical Oncology

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

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Détection de mutations du gène *KRAS* par TAAN

La recommandation de l'INESSS

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

- ☐ Complètes
- ☒ Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

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

RÉFÉRENCES

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

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

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

**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

