



L'INNOVATION EN BIOLOGIE MÉDICALE

DES IMPACTS ET DES BÉNÉFICES TANT MÉDICAUX
QUE SOCIO-ÉCONOMIQUES SOUS-ESTIMÉS

Rapport réalisé par Claude Le Pen, économiste de la santé



PARTIE01

P.6 LA PLACE DE LA BIOLOGIE MÉDICALE INNOVANTE DANS LE SYSTÈME DE SANTÉ

- + Analyse médico-économique de Claude Le Pen, économiste de la santé, professeur à l'université Paris-Dauphine

PARTIE02

P.14 9 EXEMPLES DE TESTS INNOVANTS DE BIOLOGIE MÉDICALE AUX BÉNÉFICES PATIENTS RECONNUS MAIS NON PRIS EN CHARGE

- + Dépistage des maladies génétiques
- + Diagnostic et Traitement de l'infertilité féminine
- + Prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle
- + Evaluation du risque de pré-éclampsie à différents termes de la grossesse
- + Détection des anomalies chromosomiques dans le retard de développement de l'enfant
- + Diagnostic des phéochromocytomes et paragangliomes ainsi que des neuroblastomes chez le jeune enfant
- + Dépistage des Infections Tuberculeuses Latentes
- + Diagnostic précoce du cancer de l'ovaire
- + Dépistage du cancer de la prostate

P.74 LEXIQUE

PARTIE 01

LA PLACE DE LA BIOLOGIE MÉDICALE INNOVANTE
DANS LE SYSTÈME DE SANTÉ



DE LA MISE EN ŒUVRE DE TECHNOLOGIES INNOVANTES AU BÉNÉFICE DIRECT DES PATIENTS ET DU SYSTÈME DE SANTÉ DANS SON ENSEMBLE

Alors que la biologie médicale se sophistique technologiquement et apporte de ce fait une contribution déterminante tant à la prévention qu'au diagnostic et/ou au pronostic de pathologies de plus en plus nombreuses, ses bénéfices sont sous-estimés.

Ce rapport présente une sélection de ces examens biologiques novateurs dans une perspective didactique afin de mettre en lumière le rôle essentiel de la biologie médicale innovante pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

La vocation première de ce rapport est donc pédagogique. Il s'agit de faire connaître les progrès extraordinaires réalisés par l'analyse biologique ces dernières années à travers une dizaine d'exemples particulièrement significatifs.

Autant les médias s'intéressent volontiers aux progrès thérapeutiques ou chirurgicaux, surtout s'ils sont spectaculaires, autant le progrès du diagnostic les mobilise moins, même s'il est déterminant. Ce manque relatif d'intérêt s'explique sans doute par l'extrême technicité de tests diagnostics dont les caractéristiques et les avantages échappent au profane. En quoi le dosage d'une « nouvelle » hormone peut-il constituer un exploit scientifique et technologique, même et surtout s'il devient crucial pour une bien meilleure prise en charge des malades ? La complexité touche aussi aux critères d'évaluation d'un test biologique déterminant pour le médecin qui l'a requis : les notions de « sensibilité », de « spécificité », de « valeur prédictive » ne sont pas intuitives. Elles nécessitent un dialogue singulier entre le médecin et le biologiste.

Considéré en lui-même, le progrès des techniques diagnostiques, imagerie ou biologie, n'a qu'un intérêt indirect pour le patient. Mais c'est un intérêt capital : il permet une meilleure prise en charge thérapeutique, plus efficace, plus rapide, plus sûre.

Le diagnostic n'est qu'un élément de la chaîne de prise en charge dont seul le dernier maillon – le traitement – débouche sur une amélioration évaluable de la condition du patient. Et c'est donc cette ultime étape qui capitalisera l'ensemble des progrès réalisés tout au long de la chaîne de valeur médicale avec ses phases de dépistage, de diagnostic et de traitement.

On se félicite à juste titre des progrès permis par les « thérapies ciblées » dans certains cancers, qui ont vu l'espérance de vie des patients croître significativement, sans toujours réaliser que ces progrès ont comme condition absolue la caractérisation génétique des patients au moyen de batteries de tests complexes et innovants.

Les patients et leur entourage valoriseront plus volontiers le progrès des thérapies que celui des tests ayant permis l'adaptation rapide de ces thérapies.

Plus encore en biologie qu'en imagerie, l'analyse diagnostique s'apparente à une médecine invisible au service de la médecine clinique visible.

Les interventions diagnostiques réalisées en amont ou en aval de la prise en charge thérapeutique se trouvent souvent réduites à une forme de prestation de service aidant le clinicien à formuler ses choix thérapeutiques. Or sans cette biologie médicale innovante, les choix thérapeutiques seraient moins « éclairés », faisant l'objet d'ajustements dans le temps avec parfois pour conséquence une perte de chance pour le patient.

C'est la raison pour laquelle, à travers neuf exemples touchant à des domaines médicaux très variés mais tous importants, comme le dépistage de cancers, l'identification de maladies génétiques, la détection d'anomalies dans le développement des enfants ou le traitement de l'infertilité féminine, nous avons voulu mettre en lumière cette dimension mal connue du progrès diagnostic en essayant de montrer à la fois les avancées technologiques qu'ils représentent mais aussi et surtout le bénéfice pratique, concret qu'ils procurent au patient. Nous avons tenté de rendre ces présentations accessibles à un lecteur « cultivé » non spécialisé mais disposant d'un minimum de connaissances médicales.

L'objectif pédagogique, s'il est important, n'est toutefois pas le seul. À travers ce rapport, nous souhaitons également attirer l'attention sur les lourdeurs, les défaillances et les retards de la prise en charge collective des tests biologiques innovants.

Les tests présentés ici – dont le lecteur n'aura guère de mal à se convaincre de l'intérêt médical – présentent cette caractéristique commune qu'aucun n'est actuellement remboursé par la Sécurité sociale ! Plus précisément, aucun n'est coté à la « *Nomenclature des Actes de Biologie Médicale* » (NABM) qui constitue la liste des examens pris en charge par l'Assurance Maladie.

Les examens non inscrits et non cotés peuvent toutefois être effectués « *hors nomenclature* » (HN) – donc sans remboursement – par tout laboratoire agréé, public ou privé. Toute analyse biologique peut en effet être librement réalisée dès lors qu'elle répond aux critères de qualité et de sécurité édictés dans la directive européenne n°98/79/CE sur « *les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro* », en vigueur depuis le 7 juin 2000. Mais ces analyses « HN » doivent être payées intégralement par le patient – c'est généralement le cas des examens réalisés dans les laboratoires « *de ville* » (Laboratoire de Biologie Médicale, LBM) – ou être intégralement financées par l'institution accueillant les patients, notamment les hôpitaux publics.

Dans les deux cas, le patient se trouve pénalisé : soit il paye lui-même le coût de l'analyse, soit il supporte une hospitalisation, ou une consultation hospitalière, qui n'est pas nécessaire et qui augmente le coût de la prise en charge collective. D'où une double inégalité : entre patients hospitalisés et patients non-hospitalisés, d'une part, entre patients pouvant payer et les autres d'autre part.

DES AVANCÉES MÉDICALES INCONTESTABLES PERMISES PAR LES TESTS BIOLOGIQUES RECONNUS PAR LA COMMUNAUTÉ SCIENTIFIQUE, À L'ABSENCE DE PRISE EN CHARGE PAR L'ASSURANCE MALADIE : UN TRÈS LONG PARCOURS AUX MULTIPLES ÉTAPES ADMINISTRATIVES

Pourquoi ce déficit de prise en charge publique d'examens innovants et avérés utiles ? La raison est à la fois économique et procédurale.

Économiquement, selon la Cour des comptes qui a consacré à la biologie médicale un chapitre entier de son rapport annuel 2013, les analyses de laboratoires ont représenté en 2012 une dépense totale de 6 Mds€ environ pour l'Assurance Maladie dont 3,4 Mds€ pour la biologie de ville et 2,6 Mds€ pour la biologie hospitalière¹. La dynamique de ces dépenses des LBM, qui représentaient 2 % environ de la consommation de biens et services médicaux (CSBM) au début des années 70, est passée à plus de 3 % dans les années 90. Depuis une dizaine d'années, une action sur les tarifs a ramené cette part à 2,2 % soit la perte de près d'un point de CSBM, ce qui est considérable (la CSBM s'est élevée à 187 Mds€ en 2013). Ce chiffre montre qu'une maîtrise médicalisée et les référentiels mis en place par les tutelles ont été économiquement efficaces en évitant notamment la sur-prescription d'examens peu utiles.

En 2013 et en 2014, la croissance des dépenses de biologie médicale libérale a été négative (-1 % environ). C'est, avec la dépense de médicaments, le seul poste de la consommation médicale qui soit dans ce cas. Ce ralentissement est toutefois obtenu essentiellement par des moyens tarifaires, des « décisions » de l'Union nationale des caisses d'Assurance Maladie (UNCAM) révisant régulièrement à la baisse la cotation des actes de la nomenclature des tests les plus pratiqués. On comprend que ce contexte de recherche d'économies à court terme avec une focalisation sur les dépenses de biologie médicale ne soit guère propice à l'intégration à la nomenclature d'actes nouveaux. Et ceci bien que les bénéfices médicaux et économiques soient non contestables.

La lourdeur institutionnelle du processus d'inscription d'un nouvel acte diagnostique à la NABM constitue un autre facteur, plus ou moins indépendant du précédent, qui pénalise fortement la prise en charge légitime des innovations.

La première est déclenchée à l'initiative d'une société savante (ou d'une institution publique comme l'UNCAM ou la Direction générale de la santé) qui saisit la Haute Autorité de Santé (HAS) d'une demande d'évaluation d'un test biologique innovant². Contrairement au cas du médicament, les industriels à l'origine de l'innovation n'ont pas compétence pour saisir la HAS. Ils ne peuvent qu'essayer de convaincre une société savante d'agir. Une fois saisie, la HAS inscrit l'évaluation à son plan de charge pour l'année à venir dans le cadre de son « activité programmée ».

1/ Rapport 2013 de la Cour des comptes sur la Sécurité sociale, Septembre 2013, chapitre XII.

2/ Les procédures d'évaluation sont décrites dans les Rapports annuels d'activité de la HAS.

Un groupe d'experts multidisciplinaires ad-hoc comportant entre 10 et 20 membres est alors recruté et réuni pour procéder à l'évaluation proprement dite. Les méthodes comportent des analyses critiques de la littérature, des avis motivés des experts du groupe de travail et, éventuellement, des auditions d'experts externes. Un rapport d'évaluation sur « *l'utilité clinique* » du test analysé est enfin rédigé, soumis pour approbation au Collège de la HAS et généralement rendu public sur le site de la HAS, après son adoption. Ce processus s'étale sur une période moyenne de 9 à 12 mois³, souvent beaucoup plus.

Si le rapport est favorable, c'est-à-dire si la technique est jugée techniquement valide et cliniquement utile pour les patients, s'ouvre une nouvelle phase de nature tarifaire menée au sein d'une institution paritaire, la « *Commission de hiérarchisation des actes de biologie médicale* » (CHAB). Le rôle, la composition et le fonctionnement de cette commission sont fixés par l'avenant n°1 à la « *Convention nationale des directeurs de laboratoires d'analyse médicale* »⁴. Ce texte dispose que la CHAB, qui est composée à parité de représentants des caisses et des syndicats, « *émet un avis sur les règles de hiérarchisation des actes et prestations de biologie médicale pris en charge par l'Assurance Maladie* ». Comme dans toute négociation paritaire, le tarif final résulte d'un compromis entre les positions opposées des caisses et des professionnels.

Un point mérite toutefois d'être souligné : en tant que représentants des LBM de ville, les représentants syndicaux siégeant à la CHAB sont généralement plus sensibles aux aspects tarifaires touchant leur activité courante qu'à celle des actes innovants très techniques qui seront réalisés principalement soit en milieu hospitalier soit dans un petit nombre de laboratoires spécialisés. C'est la limite du modèle paritaire pour l'évaluation des technologies de santé.

La CHAB ne délivre, selon ses statuts, qu'un « *avis* » et la décision finale – dernière phase de la procédure – revient au Collège des directeurs des caisses nationales regroupées au sein de l'UNCAM qui émet une « *décision* » d'inscription à la NABM publiée au Journal officiel.

Cette décision peut s'appuyer sur les avis de la HAS et de la CHAB mais elle ne leur est nullement subordonnée. On peut imaginer qu'un acte recommandé et tarifé ne soit pas inscrit – ou tarde à l'être – pour différentes raisons, crainte d'un mésusage, peur d'une dérive budgétaire, etc. Il est d'un certain côté paradoxal qu'un processus d'évaluation qui s'étale sur de nombreux mois, voire sur quelques années, qui mobilise de nombreux experts et qui donne lieu à une négociation syndicale souvent serrée, débouche finalement sur une décision discrétionnaire des directeurs de caisse qui ne sont pas tenus par des avis conformes des organismes d'évaluation.

3/ Dans le cas d'un avis récent sur le dosage de la vitamine D, l'appel à candidature pour les experts du groupe a été lancé en décembre 2012 et le rapport final est daté d'octobre 2013.

4/ La version actuelle de la Convention a été signée 24 janvier 2006 entre les directeurs des trois caisses nationales d'assurance-maladie et les représentants de trois syndicats de biologistes Le Syndicat des biologistes, le Syndicat des laboratoires de biologie clinique et le Syndicat national des médecins biologistes.

LES CONSÉQUENCES DU LONG PARCOURS POUR LA RECONNAISSANCE DES TESTS INNOVANTS DE BIOLOGIE MÉDICALE

Ce processus est loin de fonctionner de manière satisfaisante. Tous les tests qui sont décrits et documentés dans ce rapport ne sont pas encore pris en charge par l'Assurance Maladie.

Non pas en raison d'un avis défavorable explicite de la HAS. Si c'était le cas, on ne les aurait évidemment pas retenus. Mais par l'effet combiné de l'inertie liée à la lourdeur du processus institutionnel et d'un souci budgétaire. Ce dernier n'étant en aucun cas fondé.

En effet, comme le démontrent sans ambiguïté les exemples qui suivent, ces tests innovants ont tous des bénéfices tels que leur remboursement permettrait une meilleure prise en charge pour les patients, qui soit plus précoce, qui permette de réduire les effets secondaires des traitements, la mise en place de mesures préventives au meilleur moment ou le ciblage d'un traitement donnant ainsi aux patients les meilleures chances. Ce dernier point est d'autant plus pertinent que les traitements « *ciblés* » sont eux pris en charge par l'Assurance Maladie, alors que le test permettant la prescription « *avisée* » de ces thérapies ciblées ne l'est pas.

Quelques exemples qui éclairent la situation paradoxale dans laquelle nous évoluons encore aujourd'hui

Certaines de ces analyses sont en cours d'évaluation et la HAS devrait se prononcer sur les conditions de leur utilisation (par exemple les tests de génétique constitutionnelle prénatale) ; d'autres font l'objet de recommandations positives sans pour autant être prises en charge (par exemple la détermination prénatale du génotype RHD ou la technologie Quantiféron™ de dépistage des tuberculoses latentes) ; d'autres enfin – les plus nombreuses – ne font tout simplement l'objet d'aucune recommandation, en attente peut-être d'une saisine par une société savante : c'est le cas du dosage de l'hormone anti-müllérienne (AMH), du test de dépistage de la pré-éclampsie, du dosage des méthoxyamines plasmatiques ou de celui du nouveau marqueur tumoral du cancer de la prostate [(-2) proPSA].

Tous ces tests sont cependant très documentés dans la littérature et sont reconnus d'utilité clinique majeure comme en témoignent les avis des experts indépendants que nous avons recueillis. Ils sont par ailleurs couramment pratiqués dans certains hôpitaux ou dans des structures de biologie médicale spécialisée comme le laboratoire Biomnis. Contrairement au cas du médicament où les résultats de la recherche clinique sont rapidement et assez systématiquement transcrits en termes d'accès au marché et de remboursement, il existe dans le monde du diagnostic (et de certains dispositifs médicaux), une relative indépendance entre la recherche scientifique et les critères de prise en charge collective. On se trouve dans une situation où des actes et procédures dont le « *service médical rendu* » aux patients ne fait guère de doute, ne sont néanmoins pas admis au remboursement par l'assurance médicale obligatoire.

Cela est d'autant plus paradoxal que des analyses médico-économiques – qui restent encore embryonnaires dans le domaine de la biologie médicale – montreraient sans peine un effet positif de la plupart de ces analyses sur l'efficacité du système de santé et sur son équilibre financier. Pour chacun des tests de ce rapport, un court paragraphe médico-économique a été rédigé pour indiquer sa contribution à la maîtrise des dépenses de santé.

Schématiquement, un test diagnostique plus précis, plus sensible et plus spécifique, entraîne quatre types de conséquences qui peuvent se cumuler : un diagnostic plus rapide, une réduction de l'errance diagnostique et thérapeutique des patients, un meilleur ciblage des traitements médicamenteux ou chirurgicaux, une réduction des effets secondaires des traitements. Dans les différents cas, cela évite des interventions diagnostiques ou thérapeutiques redondantes, inappropriées ou inutiles.

Compte tenu des éléments de coût en jeu – quelques centaines d'euros pour un test innovant, face à plusieurs milliers d'euros au minimum pour un traitement inutile évité en oncologie par exemple – les actes innovants de biologie médicale ont toutes les chances de présenter des rapports coûts/bénéfices favorables. Mais pour capitaliser de tels effets, encore faudrait-il que des études soient plus systématiquement menées et surtout qu'elles contribuent à la décision effective de prise en charge.

LA BIOLOGIE MÉDICALE INNOVANTE CONTRIBUTRICE À LA MAÎTRISE DES DÉPENSES D'AUTRES POSTES DE PRISE EN CHARGE DES PATIENTS : FACTEUR D'EFFICIENCE DE L'ENSEMBLE DU SYSTÈME DE SANTÉ

Mais il faudrait également que le contexte institutionnel s'y prête, ce qui n'est pas complètement le cas en France. Il est paradoxal et contradictoire en effet que les pouvoirs publics mettent instamment l'accent sur la nécessaire recherche de l'efficacité dans le système de santé tout en continuant de concevoir une régulation des dépenses sur un mode vertical, en considérant chaque poste des dépenses de santé comme indépendant des autres.

La régulation des dépenses de biologie médicale en soi n'a aucun sens. Elle n'a de sens que dans la mesure où ces dépenses sont mises en relation avec les autres postes de consommation de soins qu'elles contribuent à maîtriser, qu'il s'agisse des coûts médicamenteux ou des dépenses d'hospitalisation.

C'est par leur contribution à la logique d'ensemble du système concourant à la santé des français que l'efficacité de ses différentes composantes doit être évaluée.

Les exemples détaillés dans ce rapport militent pour que s'engage une réflexion collective sur les modalités de prise en charge de la biologie médicale moderne, qui aille au-delà de la simple dimension budgétaire actuellement dominante.

Claude LE PEN



 biomnis

PARTIE 02

9 EXEMPLES DE TESTS INNOVANTS DE BIOLOGIE MÉDICALE
AUX BÉNÉFICES PATIENTS RECONNUS MAIS NON PRIS EN CHARGE



TEST N°1

+ Dépistage des maladies génétiques

TEST N°2

+ Diagnostic et Traitement de l'infertilité féminine

TEST N°3

+ Prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle

TEST N°4

+ Evaluation du risque de pré-éclampsie à différents termes de la grossesse

TEST N°5

+ Détection des anomalies chromosomiques dans le retard de développement de l'enfant

TEST N°6

+ Diagnostic des phéochromocytomes et paragangliomes ainsi que des neuroblastomes chez le jeune enfant

TEST N°7

+ Dépistage des Infections Tuberculeuses Latentes

TEST N°8

+ Diagnostic précoce du cancer de l'ovaire

TEST N°9

+ Dépistage du cancer de la prostate

Remerciements aux Docteurs :

Jean-Claude AZOULAY,
Georges CHYDERIOTIS,
Grégory EGEE,
Carole EMILE,
André FORCE,
Christine HAMBERGER,
Léna LE FLEM,
Gilles PANTEIX,
Benoit QUILICHINI,
Corinne SAULT,
Benoit SCHUBERT.



TEST N°1

DÉPISTAGE DES MALADIES GÉNÉTIQUES

Techniques de CGH-array (Comparative Genomic Hybridation), **de SNP-array** (Single Nucleotide Polymorphism) ou « **Puces à ADN** »
et de NGS (Next Generation Sequencing) ou « **Séquençage Haut Débit** »

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

Il s'agit de techniques sans antécédents qui représentent une avancée technologique majeure et qui ont fait la preuve de leurs intérêts diagnostiques ou pronostiques pour la détection et le traitement éventuel d'anomalies génétiques, constitutionnelles ou acquises, à l'origine de maladies graves (cancers, retards mentaux, etc.).

Les deux premières techniques (CGH-array et SNP-array), classiquement appelées « *puces à ADN* », permettent de réaliser une analyse globale comparative de deux génomes, patient et témoin, afin de préciser les déséquilibres (en gain ou en perte) de matériel génétique du premier par rapport au second⁵. Elles permettent de déterminer des CNV (Copy Number Variation) à l'origine de pathologies génétiques. La technique de SNP-array apporte des informations supplémentaires sur les pertes d'hétérozygoties* (Loss of Heterozygosity, LOH), c'est-à-dire la perte de matériel génétique provenant d'un des deux parents. Ces deux techniques sont applicables aux pathologies constitutionnelles (ex : bilan génétique d'un retard mental) et acquises (ex : bilan génétique d'une tumeur solide ou d'une hémopathie maligne).

La troisième, la technique de NGS (Next Generation Sequencing) ou « *séquençage haut débit* » permet de réaliser rapidement et à moindre coût le séquençage d'une partie ou de la totalité du génome humain. Grâce à la lecture en parallèle de plusieurs millions de séquences d'ADN, ces machines de nouvelle génération (apparues à partir de 2007), sont dotées de débits de 50 à 1 000 fois supérieurs à ceux des séquenceurs traditionnels (méthode de synthèse enzymatique de Sanger) utilisés depuis une trentaine d'années. Elles permettent en outre de s'affranchir d'un certain nombre de biais de la méthode Sanger, comme la nécessité de cloner l'ADN* à séquencer. Cette technique est applicable aux pathologies constitutionnelles, par exemple le dépistage prénatal non invasif (DPNI) de la trisomie 21, ou acquises, par exemple la détection des gènes de prédisposition à certains cancers comme les gènes BRCA1 et BRCA2 pour le cancer du sein.

^{5/} Ces tests sont aussi dénommés « caryotype moléculaire » car ils analysent des déséquilibres du génome entier, ce qui les rapproche du caryotype conventionnel.

◎ INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

.....

L'intérêt médical de ces techniques peut être illustré par trois exemples rapides :

a) L'exploration génétique d'un retard

mental (« Déficience intellectuelle dans un cadre syndromique », DICS). Les techniques traditionnelles (caryotype* conventionnel et FISH), limitées par leur niveau de résolution diagnostique, ne peuvent mettre en évidence que de 5 à 10 % d'anomalies génétiques. Les techniques de CGH/SNP-array permettent d'atteindre plus de 20 % d'anomalies dans ce cadre nosologique. La prise en charge clinique de ces patients en est améliorée et ils peuvent bénéficier d'un conseil génétique adapté.

b) Le dépistage non invasif des trisomies

13, 18 et 21. La découverte de la présence d'ADN fœtal dans le sang maternel associée à la nouvelle technologie de séquençage haut débit a ouvert de nombreuses perspectives dans le domaine du dépistage prénatal non invasif (DNPI). L'une des premières applications est le dépistage des principales aneuploïdies fœtales : trisomie 13, 18 et 21. Ce test non invasif permettrait de diminuer le nombre de prélèvements invasifs (amniocentèse et biopsie de trophoblaste) au plan national, avec une diminution des pertes fœtales secondaires à ces prélèvements. On estime que 90 à 95 % des examens invasifs pourraient être évités quand le DPNI est rassurant.

c) Le développement de la médecine

personnalisée. La compréhension des mécanismes moléculaires dans les tumeurs solides a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de développer des thérapies ciblées contre les cellules tumorales. Des tests de biologie spécialisée dits « compagnons » sont réalisés pour connaître l'éligibilité ou non à cette médecine personnalisée. La technique de NGS va permettre de réaliser en une seule fois la recherche d'un panel exhaustif de mutations oncogéniques (ex : KRAS, NRAS, EGFR, BRAF, etc.) avec un bénéfice exhaustif, direct et rapide pour la prise en charge thérapeutique d'un patient atteint d'une tumeur solide.

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

.....

Dans le domaine de la pathologie acquise (cancers notamment), ces tests sont essentiellement proposés par les plateformes INCA afin d'assurer un accès juste et équilibré à une prise en charge diagnostique et thérapeutique optimale sur le territoire français.

En génétique constitutionnelle prénatale (DPNI), nous sommes dans l'attente des directives de la Haute Autorité de Santé. Le programme STIC (Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses) intitulé « SAFE 21 » et conduit à l'hôpital Necker à Paris, pourrait aider à préciser le positionnement du DPNI dans le parcours de soins de la patiente et sa place dans l'arbre décisionnel des examens du 1^{er} trimestre de la grossesse.

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

L'apport des techniques de séquençage nouvelle génération en termes médico-économiques peut d'ores et déjà être évalué de manière très positive dans le cadre du Diagnostic Prénatal Non Invasif.

Pour la seule détection prénatale de la Trisomie 21, plus de 11 000 amniocentèses sont réalisées chaque année en France, acte invasif qui engendre des fausses couches (évaluées entre 0,5 % et 1 %) alors qu'il s'agit de fœtus sain. Une amniocentèse (ponction + caryotype) a par ailleurs un coût important puisqu'aux 500 à 800 euros de l'acte en lui-même, s'ajoute le coût de l'arrêt de travail (1 jour si l'intervention se déroule normalement) et la prise en charge des patientes ayant des complications plus ou moins importantes.

Le DPNI pourrait être prescrit selon des configurations différentes selon la stratégie souhaitée par l'Assurance Maladie, mais dans tous les cas, il diminue de manière significative les actes invasifs tout en diminuant le coût de prise en charge global pour la société. À titre d'exemple, si l'Assurance Maladie décidait de prendre en charge le DPNI pour les femmes présentant un risque entre 1/50 et 1/250, le nombre d'amniocentèse ne serait plus que de 2 500 en première intention soit une diminution de près de 80 % avec le même niveau de détection.

Le test DPNI est réalisé par le laboratoire Biomnis au prix de 650€ (non remboursé actuellement), ce qui le place dans la moyenne des prix des amniocentèses, sans interruption de travail et sans complication possible.

DESCRIPTIF TECHNIQUE

Le laboratoire Biomnis a fait le choix d'une *plateforme technique* Illumina™ permettant la réalisation conjointe des techniques de SNP-array (logiciel KaryoStudio et GenomeStudio) et des techniques de NGS (séquenceur HiSeq™ 2500).

Elles sont réalisées à partir d'un tube sanguin prélevé sur EDTA (avec anticoagulant) ou d'un bloc tumoral inclus en paraffine. Des kits de prélèvements spécifiques sont également disponibles dans le cadre du DPNI.

Dans le domaine de la génétique constitutionnelle pré et post natale, la mise en œuvre de ces tests nécessite une information éclairée et le consentement du patient.



AVIS D'EXPERT

« Le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens (CNGOF) salue le Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE) pour l'avis qu'il a rendu le 25 avril sur : « les questions éthiques associées au développement des tests génétiques foetaux sur le sang maternel ». Il y donne un avis favorable à l'introduction progressive, dans le cadre du programme de dépistage de la trisomie 21, de ce diagnostic prénatal non invasif (DPNI) qui, par une simple prise de sang réalisée chez la mère en début de grossesse, permet l'analyse de l'ADN foetal.

Le CNGOF avait saisi lui-même le CCNE en raison des questions éthiques particulières que les évolutions techniques de ce dépistage posent et de leurs conséquences potentielles sur la conception du diagnostic prénatal et sa pratique dans notre pays. Dans un communiqué publié en ce début d'année, et dans l'attente de l'avis du CCNE, le CNGOF avait souhaité pouvoir appliquer le DPNI aux patientes à risque élevé de trisomie 21.

Le CCNE répond positivement à cette demande considérant que cette méthode qui ne modifie pas le fond de la procédure actuelle revêtirait, en revanche, une importance considérable en termes de non-malfaisance en diminuant le nombre de prélèvements invasifs (choriocentèses et amniocentèses) qui comportent un risque de fausse couche de l'ordre de 1 %.

Le CNGOF souhaite maintenant que la législation et la prise en charge par la solidarité nationale interviennent rapidement pour que le DPNI soit intégré dans les procédures du diagnostic prénatal proposé aux femmes enceintes. Il rappelle, comme le fait aussi le CCNE, que ces avancées diagnostiques nécessitent de progresser en même temps sur le versant thérapeutique, en investissant sur la recherche pour le traitement des maladies génétiques, la prise en charge des personnes handicapées et l'accompagnement de leurs familles. Le CNGOF rappelle l'importance de la qualité de l'information qui sera donnée aux couples. »

Bureau Permanent du CNGOF - Communiqué de presse publié le 26 avril 2013



BIBLIOGRAPHIE

1. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62(4):768-75. PubMed PMID: 9529358; PubMed Central PMCID: PMC1377040.
2. Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012 Aug;207(2):137.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2012.05.021. Epub 2012 Jun 1. PubMed PMID: 22742782.
3. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-9.
4. Jouinot A, Coriat R, Huillard O, Goldwasser F. Les biothérapies des cancers colorectaux métastatiques en 2014. *Presse Med* 2014;43:1056-66.





TEST N°2

DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE L'INFERTILITÉ FÉMININE

Dosage de l'hormone anti-müllérienne (AMH) chez la femme

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

Le dosage de l'hormone anti-müllérienne (AMH) joue un rôle de plus en plus important dans le diagnostic et le traitement des situations d'infertilité chez la femme.

Produite par les cellules de la granulosa*, cette hormone, qui est connue depuis les années 1980, participe à la bonne régulation de la croissance folliculaire, indispensable à la maturation de l'ovocyte et donc à l'ovulation. Conjointement à d'autres examens et analyses, son dosage présente de nombreux intérêts dans le domaine de la gynécologie endocrinienne et de la médecine de la reproduction, notamment parce qu'il ne dépend pas de la phase du cycle durant laquelle le dosage est effectué, ni de la présence de pathologies de l'axe hypothalamo-hypophysaire*⁶ qui peuvent affecter la concentration plasmatique d'autres hormones impliquées dans le cycle ovarien.

Le dosage de l'AMH est principalement utile comme marqueur de la « réserve ovarienne* » (RO), du « Syndrome des ovaires polykystiques »* (SOPK), de la perte folliculaire et de la réponse aux gonadotrophines dans le cadre de la fécondation *in vitro* (FIV).

Dans chacune de ces indications, il s'avère en général plus sensible* et plus spécifique* que les tests existants, avec des conséquences importantes pour les patientes, par exemple l'optimisation du taux de grossesses dans la FIV.

◎ INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

Marqueur de la réserve ovarienne (RO)

L'évaluation de la RO constitue une étape indispensable du bilan d'infertilité. Il s'agit d'estimer le stock d'ovocytes présent à un moment donné au sein des follicules ovariens. Cette réserve dépend de différents facteurs comme l'âge, les problèmes de poids (par excès ou par défaut), le tabagisme ainsi que d'autres plus ou moins bien connus. Les moyens classiques d'estimation comprennent notamment les dosages en début de cycle des hormones qui gouvernent le cycle ovarien comme

^{6/} Telles que hyperprolactinémie, l'aménorrhée hypothalamique fonctionnelle ou l'hypogonadisme hypogonadotrope...

la FHS (hormone folliculo-stimulante), la LH, l'estradiol ou l'inhibine B qui est d'ailleurs en voie d'abandon : des concentrations sériques anormalement élevées (FHS) ou basses (estradiol) de ces hormones peuvent témoigner d'une insuffisance ovarienne.

Les examens privilégiés sont cependant le comptage folliculaire antral (CFA) et le dosage de l'AMH. Effectué par échographie endo-vaginale également en début de cycle, le CFA permet de compter à l'écran les follicules ovariens où sont stockés les ovocytes avant l'ovulation.

Le dosage de l'AMH, qui est un marqueur physiologique de la décroissance de la réserve folliculaire dès l'âge de 25 ans, présente de nombreux avantages. Tout d'abord, sa concentration plasmatique reste relativement stable au cours du cycle, ce n'est pas le cas du comptage folliculaire antral (CFA) et des concentrations de FSH, LH et oestradiol plasmatiques, qui doivent toutes être mesurées en début de phase folliculaire.

L'AMH apparait en outre plus sensible* que la FSH pour la détection précoce d'une insuffisance ovarienne⁷. Enfin on constate une très bonne corrélation entre les concentrations plasmatiques d'AMH et les résultats du CFA⁸. Le dosage de l'AMH plasmatique est même plus sensible et plus spécifique que le CFA dans la mesure où il reflète des follicules pré-antraux et petits antraux (< 5 mm) non ou peu visibles en échographie.

L'AMH est encore utile dans les situations où le CFA n'est pas réalisable ou difficilement réalisable, par exemple dans le cas des échographies par voie sus-pubienne chez des patientes obèses présentant une mauvaise échogénicité.

Marqueur du Syndrome des Ovaires Polykystiques (SOPK)

Le SOPK se caractérise par un excès de follicules antraux immatures qui peut être décelable à l'échographie (plus de 12 follicules de 2 à 9 mm par ovaire et/ou un volume ovarien supérieur à 10 mL). Il touche 5 à 10 % de la population féminine mondiale avec un impact important sur la fertilité et sur la santé générale de la femme. C'est la cause la plus fréquente des anovulations chroniques et de l'hyper-androgénie* chez les jeunes femmes. Des anomalies métaboliques peuvent en outre être associées au SOPK, avec notamment un risque augmenté de résistance à l'insuline, indépendamment de l'obésité.

Le dosage de l'AMH sérique – dont la concentration est 2 à 4 fois plus élevée chez les femmes atteintes de SOPK que chez les femmes « normales » – est de plus en plus considéré comme l'examen de référence pour le diagnostic⁹. Ce dosage serait

7/ Il n'existe pas à l'heure actuelle de seuil consensuel pour définir une baisse de la réserve ovarienne, mais une majorité d'auteurs propose un seuil de 1 ng/ml soit 7,14 pmol/L. En effet, dans l'étude de Nelson et al. 2009, les groupes de femmes ayant une AMH inférieure à 1 pmol/L ont 60 % d'annulation de cycle pour mauvaise réponse, et aucune des 26 femmes n'a obtenu de grossesse. Les femmes ayant une AMH entre 1 et 5 pmol/L ont entre 8,2 % et 25,7 % d'annulation de cycle pour mauvaise réponse et 8,1 à 14,7 % de grossesse par cycle selon le protocole utilisé. Le dosage de l'AMH est également intéressant dans les insuffisances ovariennes induites par la chirurgie ou une thérapeutique gonadotoxique, en particulier en oncologie.

8/ Cela s'explique par le fait que ce sont les cellules de la granulosa des follicules de 5-9 mm qui produisent la quantité la plus significative (60 %) d'AMH dosable au niveau plasmatique et que ce sont justement ces follicules qui sont visibles à l'échographie

9/ Il est impossible à ce jour de proposer un seuil de diagnostic consensuel et universel pour l'AMH sérique dans le SOPK. Dans notre expérience cependant, un seuil à 35 pmol/L (4,9 ng/mL) avec le kit EIA AMH/MIS a permis de définir avec de bonnes performances (sensibilité 92 % et spécificité 97 %), le diagnostic de SOPK (meilleure sensibilité que le CFA).

en effet plus sensible que le comptage folliculaire antral par échographie pour les mêmes raisons que précédemment, à savoir qu'il tient compte de très petits follicules non visibles à l'échographie.

Marqueur de la perte folliculaire

Le dosage de l'AMH peut également se révéler utile, dans les cas d'insuffisance ovarienne prématurée. L'AMH est en effet un marqueur précoce d'une insuffisance ovarienne débutante et précède l'élévation de la FSH, ce qui permet, en médecine de la reproduction, de mieux prédire les mauvaises réponses aux stimulations ovariennes contrôlées dans le cadre de la FIV.

Marqueur de la réponse aux gonadotrophines

Enfin, toujours dans le cadre de la FIV, le dosage de l'AMH est utile pour adapter les doses de médicaments inducteurs de l'ovulation (les gonadotrophines) nécessaires pour le recueil des ovocytes. Le choix de la dose de gonadotrophines et du protocole de stimulation ovarienne en fonction de la concentration sérique d'AMH, donne en effet de bons résultats en ce qui concerne les grossesses menées à terme. Il contribue en effet à diminuer le risque d'annulation de cycle en cas d'hypo-réponse ainsi que celui de syndrome d'hyperstimulation ovarienne en cas d'hyper-réponse.

STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

Le dosage de l'AMH ne fait pas l'objet de recommandations spécifiques de la part de la HAS.

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

Le coût moyen d'une FIV pour la sécurité sociale est extrêmement élevé. On l'estime en effet à environ 4 100 € pour un cycle complet, soient 1 300 € pour le traitement de stimulation (médicaments et intervention de l'infirmière), 500 € pour la surveillance hormonale, 600 € en moyenne pour les actes de biologie et 1 700 € d'hospitalisation. Ce coût n'intègre pas le coût de l'arrêt de travail (3 jours minimum).

Compte tenu de ce coût d'un cycle, la France a limité la prise en charge à 100 %, après validation du dossier, dans la limite de 4 cycles (les cycles interrompus avant le transfert embryonnaire ne sont pas décomptés). Il est donc crucial (i) de maximiser les chances de succès d'une tentative (ii) et de minimiser les risques d'hospitalisation en cas de complication.

Le test AMH proposé répond à cet objectif, car il évite le recours inutile à la FIV lorsque la réserve ovarienne est basse ; il permet d'optimiser le protocole de stimulation et donc de réduire le nombre de tentatives de FIV ; il permet d'anticiper le risque d'hyperstimulations ovariennes et donc de diminuer les hospitalisations associées aux cas sévères ; enfin, il remplace avantageusement les dosages d'inhibine B chez la femme (qui ne seront plus réalisés), en raison de ses meilleures performances.

Or, au regard d'un cycle de FIV, son coût est très limité (facturé 49 € par le laboratoire Biomnis), si bien qu'il est d'ores et déjà prescrit, malgré l'absence de prise en charge.

☰ DESCRIPTIF TECHNIQUE

.....

Il existe actuellement 3 techniques de dosage différentes, avec 2 trouses commercialisées par la société Beckman Coulter, la trousse AMH Gen II® (A79765) utilisée en Europe et aux États-Unis, et la trousse EIA AMH/MIS® (A11893) surtout utilisée en France. Une nouvelle trousse de dosage un peu plus sensible, AL-105, est commercialisée par la société américaine AnshLabs depuis le milieu de l'année 2013 [7, 8]. La même compagnie commercialise également une trousse ultrasensible (AL-124i, « picoAMH »), qui semble prometteuse pour l'étude des situations de baisse de réserve ovarienne, comme après une chimiothérapie par exemple. En effet, le seuil de quantification est très bas, annoncé à 0,028 pmol/L, soit 50 à 100 fois inférieur à celui des kits usuels.

La difficulté réside dans le fait que ces différents kits sont utilisés dans le monde et que les dosages ne sont pas comparables entre eux. La comparaison entre des études utilisant des kits de dosages différents est donc impossible, ainsi que la mise en place d'un consensus sur les valeurs seuils à utiliser. La mise à disposition d'un standard international est donc impatiemment attendue, en principe en 2015. Les normes ainsi que la trousse utilisée par le laboratoire doivent être connues pour une bonne interprétation du dosage.

Toutes les étapes (pipetage des calibrateurs, des échantillons et des contrôles, les ajouts de réactifs, lavages, incubations et la lecture finale) sont réalisées de manière entièrement automatique. L'automate utilisé au laboratoire est un Etimax™ (Diasorin). Le temps nécessaire entre le démarrage du processus analytique et la collecte des résultats est d'environ 4 heures pour une plaque complète (80 analyses).

Particularités de l'AMH

En pratique clinique, le dosage sérique de l'AMH présente de nombreux intérêts, mais il existe encore des difficultés liées à plusieurs particularités biologiques de cette molécule. Tout d'abord, il existe une hétérogénéité moléculaire de l'AMH au niveau circulant, avec une forme non clivée biologiquement inactive et une forme clivée biologiquement active. La forme non clivée est la pro-hormone, qui sera clivée par la proconvertase PC-5 au niveau de la région N terminale, libérant ainsi la petite région C-terminale de 25 kDa bioactive. La forme clivée est un complexe où les régions N-terminale et C-terminale restent associées de manière non covalente.

Cette association renforcerait sa stabilité, éviterait son agrégation et/ou faciliterait son association au récepteur de type II de l'AMH. La région mature C-terminale de l'AMH est la partie biologiquement active, mais contrairement aux autres protéines de la famille du TGF- β , elle a besoin de la région N-terminale pour avoir sa pleine activité. La stabilité de l'AMH lors du stockage du prélèvement est mal connue, mais semble bonne en cas de stockage à -80 °C sur 5 jours.

 AVIS D'EXPERT

Professeur Didier DEWAILLY

Pôle Médecine de la Reproduction, CHRU Lille

« Dans le domaine de la gynécologie endocrinienne et de la médecine de la reproduction, le dosage de l'AMH me paraît indispensable dans 4 situations cliniques :

- + Pour sa valeur hautement informative, le dosage d'AMH plasmatique permet d'éviter le recours inutile à la fécondation in vitro en cas de diminution importante de la réserve ovarienne, qui est moins bien reflétée et plus tardivement par les marqueurs actuellement disponibles (FSH, estradiol, comptage folliculaire à l'échographie).
- + En cas de diminution moyenne de la réserve ovarienne, le dosage d'AMH permet d'optimiser le protocole de stimulation en vue d'une FIV, ce qui limite le nombre de tentatives.
- + Dans les situations de réserve ovarienne abondante, l'augmentation du taux d'AMH prédit le risque d'hyperstimulation et permet d'anticiper ce risque, réduisant l'incidence des cas sévères d'hyperstimulation ovarienne nécessitant l'hospitalisation.
- + Pour le diagnostic d'un trouble de l'ovulation, l'augmentation de l'AMH est hautement prédictive du syndrome des ovaires polymicrokystiques, ce qui simplifie la démarche diagnostique avec, en particulier, un bilan hormonal qui peut être simplifié. »

Docteur Jean-Claude EMPERAIRE

Endocrinologue, centre AMP, clinique Jean VILLAR, Bruges

« L'évaluation du stock ovocytaire ou réserve ovarienne (RO), est un élément fondamental de la prise en charge d'une patiente infertile, car à problématique comparable, c'est ce niveau de RO qui va orienter les stratégies thérapeutiques. Plusieurs marqueurs sont disponibles, qui ont tous leurs limites : sur le plan fonctionnel, le taux plasmatique de base de FSH montre une variabilité significative intercycle, et les épreuves dynamiques, complexes à mettre en œuvre et à interpréter, n'apportent pas de précisions supplémentaires ; de son côté, le taux d'inhibine B s'est finalement montré assez mal corrélé à la réponse ovarienne, raison de son abandon progressif. D'où la recherche de marqueurs réellement fiables qui dépassent les effets de nouveauté ou de mode.

C'est ainsi qu'au fil des années et des nombreuses publications qui lui sont consacrées, l'hormone anti-müllérienne (AMH) s'est progressivement imposée comme le marqueur actuellement le plus fiable de la RO et comme le meilleur paramètre prédictif de la réponse ovarienne, aussi bien en stimulation ovulatoire classique qu'au cours de l'hyperstimulation ovarienne contrôlée pour FIV. L'AMH est, comme l'inhibine, une glycoprotéine de la famille du TGF bêta. Elle est sécrétée par les follicules de moins de 4-6 mm de diamètre, taille à partir de laquelle ils deviennent sensibles à la FSH ; elle inhibe le passage des follicules primordiaux vers le stade de follicule primaire, et mesure ainsi la taille de la cohorte folliculaire en voie de recrutement, elle-même corrélée à l'importance du stock ovocytaire total.

Son dosage devient incontournable dans tout bilan d'infertilité. Il permet d'apprécier le stock folliculaire restant, donc d'estimer l'âge chronologique de l'ovaire, qui peut être plus avancé que celui de la patiente, et ainsi d'adopter une stratégie thérapeutique plus agressive chez une patiente dont la RO décline. Il permet de prévoir la sensibilité de l'ovaire à la stimulation, qui augmente avec le taux d'AMH, et ainsi de mieux calibrer la dose de départ de FSH ; un taux bas d'AMH fait craindre une mauvaise réponse ovarienne, alors qu'un taux élevé fait anticiper une réponse excessive. Il permet de dépister un syndrome des ovaires micro-polykystiques en cas de troubles du cycle devant un taux élevé, même si, pour le moment, le taux d'AMH ne fait pas encore partie des critères officiels de définition du syndrome. Dans le cadre de la préservation de la fertilité, il permet d'apprécier les dommages ovariens de la chimiothérapie, ainsi que les chances d'obtenir des embryons ou des ovocytes congelables.

Enfin, son taux ne variant que de façon négligeable au cours du cycle, le dosage d'AMH n'est pas cantonné aux premiers jours du cycle, au contraire de l'estimation de tous les autres paramètres de la RO proposés. Le seul problème potentiel qui demeure est celui de son dosage et de son interprétation. La multiplication des trousse de dosage a secondairement répandu la confusion avec l'apparition de résultats discordants voire aberrants ; les problèmes techniques sont maintenant résolus, mais, en l'absence actuelle de standard international, un résultat d'AMH doit être interprété selon la technique de dosage utilisée et les normes fournies pour chaque laboratoire.

On estime généralement que le compte folliculaire antral (CFA) effectué par échographie dans les premiers jours du cycle est un aussi bon marqueur que l'AMH de la cohorte folliculaire recrutée et donc de la RO. Bien qu'ils mesurent tous deux le même processus physiologique, l'AMH fonctionnellement et le CFA morphologiquement, ces deux paramètres ne sont pas interchangeables, même s'ils sont bien corrélés entre eux ; de plus, la mesure du CFA comporte des variations significatives inter-cycles, et surtout intra- et inter-observateurs. »

BIBLIOGRAPHIE

1. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20:370-85.
2. Rajpert-DeMeyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3836-44.
3. Pigny P. Anti-Mullerian hormone assay: what's up in 2013? *Médecine de la reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2014;16:16-20.
4. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2011;26:312.
5. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, et al. Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle election. *Mol Hum Reprod* 2013;19:519-27.





TEST N°3

PRÉVENTION DE L'ALLO-IMMUNISATION FŒTO-MATERNELLE

Détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

L'allo-immunisation fœto-maternelle est une complication de la grossesse, qui peut donner lieu à des accidents périnataux graves.

Cela concerne les femmes de phénotype RH:-1 (Rhésus D, RhD, négatif), qui ne possèdent pas d'anticorps (Ac) contre le RhD positif (qui attaqueraient leurs propres globules rouges, GR) mais qui sont porteuses d'un fœtus phénotypé RH:1 (RhD positif)¹⁰. Actuellement, environ 90 000 grossesses (sur environ 800 000) surviennent chaque année en France dans ces conditions.

La production d'anticorps maternels contre des antigènes érythrocytaires fœtaux est à l'origine d'une destruction des hématies fœtales, induisant une anémie de gravité variable, qui peut aller jusqu'à l'anasarque fœto-placentaire, avec un fort risque de mort fœtale. C'est une urgence de la médecine fœtale. La prise en charge thérapeutique est très lourde, requérant une transfusion *in utero*.

Parmi les antigènes en cause, l'antigène Rhésus D (RH1) est à l'origine de la majorité des incompatibilités fœto-maternelles. Il est donc important de déterminer le génotype rhésus D du fœtus chez les femmes RH:-1 non immunisées. Si le fœtus est RH:-1, il n'y a pas de risque pour lui et il ne sera pas nécessaire de faire de prévention chez la mère. En revanche, s'il est RH:1, des mesures de surveillance appropriées devront être prises (titrage régulier des Ac, imagerie) avec des injections de gammaglobulines anti-D (Rhopylac®) et un suivi hémobiochimique rapproché de la grossesse. Rophylac® est un produit d'origine humaine dont le risque infectieux, même infime, n'est pas nul, dont le coût est élevé et qui est soumis à un risque de pénurie.

Chez les femmes RH:-1 déjà immunisées, le test permet d'ajuster les modalités de prise en charge et de surveillance de la grossesse. En effet, si le fœtus qu'elles portent est identifié RH:-1, elles n'auront pas de risque de réactivation de leur immunisation vis-à-vis de l'antigène RH1.

La détermination du rhésus fœtal est donc essentielle. Elle nécessite toutefois un geste invasif qui n'est pas sans risque, avec ponction de liquide amniotique ou prélèvement de sang fœtal. Ces gestes peuvent favoriser le passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle et entraîner ou réactiver l'immunisation maternelle.

^{10/} La fréquence du phénotype RH:-1 est variable selon l'origine ethnique (15 % de la population d'origine caucasienne, 3 à 5 % de la population d'origine africaine et moins de 0,1 % de la population d'origine asiatique).

◎ INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

Le test consiste à déterminer le génotype rhésus D fœtal à partir de sang veineux prélevé chez la mère, donc sans aucun risque pour le fœtus.

Le caractère non invasif pourrait permettre sa généralisation chez les femmes enceintes

RH:-1 avec un bénéfice majeur en termes d'injections de gammaglobulines anti-D évitées ainsi qu'en termes de surveillance allégée de la recherche des Ac anti-érythrocytaires (ou recherche d'agglutinines irrégulières : RAI).

Le test permet donc d'adapter la conduite à tenir pour la surveillance des grossesses des femmes RH:-1 non immunisées ou déjà immunisées préalablement, commençant une nouvelle grossesse.

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

Les recommandations actuellement en vigueur en France sont les suivantes :

- + chez les femmes de phénotype RH:-1 non immunisées, une prophylaxie systématique par injection d'immunoglobulines anti-D à 28 semaines d'aménorrhée (SA) (CNGOF 2005) ;
- + chez les femmes RH:-1 immunisées dont la concentration en Ac est faible (Ac anti-RH1 < 1 µg/ml), une recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) et un dosage d'Ac toutes les 3 semaines environ à partir du 4^e mois, accompagnés à chaque fois d'une consultation spécialisée de gynécologie-obstétrique ;
- + chez les femmes RH:-1 immunisées dont la concentration en Ac est forte (Ac anti-RH1 > 1 µg/ml), mêmes examens et consultations que chez les femmes faiblement immunisées, plus une échographie fœtale, chaque semaine.

En ce qui concerne la détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel, il est recommandé d'effectuer ce test à partir de 10 semaines de grossesse ou 12 semaines d'aménorrhée (la quantité d'ADN fœtal dans le sang maternel augmentant au cours de la grossesse, il faut respecter un certain délai). En raison de l'absence de possibilité de vérifier la présence d'ADN en quantité suffisante lorsque le fœtus est de génotype RH:-1, un contrôle est recommandé sur un nouveau prélèvement effectué 15 jours après, ou plus tôt dans le cas d'une grossesse déjà avancée.

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

Deux tiers des femmes de Rhésus D négatif (RhD-) sont exposés au risque d'allo-immunisation, qui est à l'origine d'accidents périnataux graves. Les recommandations de pratique clinique de l'immunoprophylaxie RhD émises en 2005 (RPC 2005) consistent en l'administration de manière systématique d'immunoglobulines anti-D (IgRH) à 28 semaines d'aménorrhées (SA) sans connaître le Rhésus D du fœtus.

Le génotypage non invasif pourrait permettre d'éviter aux femmes sans risque d'immunisation de recevoir des IgRH (dérivés du plasma humain extraits à partir de sang de donneurs nord-américain rémunérés et volontairement sensibilisés par injection de globules rouges RhD) et de rationaliser l'immunoprophylaxie Rhésus (stratégie d'immunoprophylaxie sélective) avec un double impact économique et éthique (en traitant les seules patientes qui en ont besoin).

Une évaluation médico-économique de l'application systématique du génotypage fœtal rhésus D sur sang maternel à toutes les femmes enceintes (l'étude STIC GENIFERH) est en cours et ses résultats doivent être publiés en 2015.

Le coût d'un génotype Rh fœtal dans le sang maternel est de 150 € (non remboursé actuellement).

DESCRIPTIF TECHNIQUE

L'expression de l'antigène RH1 est sous la dépendance du gène RHD. Les sujets qui ne portent pas le gène RHD sont de phénotype RH:-1. Le phénotype RH comprend également les antigènes RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e) qui sont sous la dépendance du gène RHCE. Les 2 gènes RHD et RHCE présentent une grande homologie de structure (environ 96 % d'identité) et sont localisés sur le chromosome 1 en position « tête bêche ». Les réarrangements entre ces 2 gènes sont favorisés par cette organisation et sont responsables de gènes hybrides, à l'origine de variant RH. Ceci justifie la nécessité d'amplifier 3 exons.

L'ADN fœtal circulant est extrait à partir du plasma maternel par des techniques d'extraction classiques. Le test consiste en l'amplification par PCR de trois exons du gène RHD ; en effet, compte tenu de l'existence de nombreux variants, il serait insuffisant et à risque d'erreurs de n'amplifier qu'un seul exon.

Il existe un kit commercialisé et marqué CE, développé après collaboration de la firme Biorad avec le Centre national de référence en hématologie périnatale (CNRHP) : le principe technique est fondé sur l'amplification des exons 5, 7 et 10 du gène RHD.

Dans le kit Biorad utilisé au laboratoire Biomnis, les échantillons de patients sont encadrés dans une même série par de nombreux contrôles (témoin positif, témoin négatif, blanc extraction, blanc PCR) afin de vérifier d'une part, l'amplification efficace des exons présents, et d'autre part, l'absence de contamination.


AVIS D'EXPERT
Avis de la haute Autorité de Santé (extrait de l'avis du 26 janvier 2011)

« Détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel.

Classement NABM : non classé Code : non codé.

Le service attendu est considéré suffisant. Par conséquent, l'avis de la HAS sur l'inscription de l'acte à la liste des actes prévue à l'article L. 162-1-7 du Code de la sécurité sociale est favorable.

1. Indications principales

- + la prise en charge des grossesses de femmes RH:-1 (D négatif) non immunisées pour lesquelles le géniteur présumé est RH:1 (D positif) ;
- + la prise en charge des grossesses de femmes RH:-1 (D négatif) immunisées pour lesquelles le géniteur présumé est RH:1 (D positif).

2. Gravité de la pathologie

L'allo-immunisation foeto-maternelle est à l'origine d'anémies fœtales et néonatales ou d'ictères néonataux graves.

3. Caractère préventif, curatif ou symptomatique de la technique

La technique assure deux approches selon que la femme enceinte RH:-1 est ou non immunisée. La détermination peut être réalisée en vue d'une action :

- + prophylactique donc en préventif chez les femmes non immunisées ;
- + thérapeutique pour ajuster les modalités de prise en charge et de surveillance chez les femmes immunisées.

4. Place dans la stratégie thérapeutique

Une fois établi, le statut d'immunisation des femmes enceintes RH:-1 (D négatif) pour lesquelles le géniteur présumé est RH:1, ce test permet d'envisager les modalités de prise en charge et de suivi en ciblant :

- + la population de femmes enceintes RH:-1 non immunisées relevant d'une injection d'immunoglobulines anti-RH1 ;
- + les femmes enceintes RH:-1 immunisées devant faire l'objet d'une prise en charge et d'un suivi spécialisés lourds.

5. Amélioration du service attendu

Modéré (III).

6. Population cible

Le nombre de réalisations de ce test serait compris entre 150 000 et 180 000 par an pour une première détermination, auquel il convient d'ajouter une seconde détermination en cas de première détermination négative, estimée entre 58 000 et 70 000 par an (correspondant au nombre de femmes RH:-1 enceintes de fœtus RH:-1).

7. Modalités de mise en oeuvre

Détermination par technique de PCR, actuellement la PCR en temps réel est réalisée à partir du sérum ou du plasma maternel recueilli sur prélèvement veineux.

Détermination prénatale du génotype RHD foetal à partir du sang maternel – Avis sur les actes Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011.

Les séquences géniques amplifiées en France sont une combinaison d'exons 7 et 10 ou exon 10 isolé.

La réalisation d'un second test sanguin de détermination est jugée nécessaire à 15 jours lorsque le résultat du premier test était négatif.

La première détermination peut être réalisée à partir de 11 SA et jusqu'à 28 SA. »

Extrait du rapport de la HAS, janvier 2011.

http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-10/avis_genotypage_foetal.pdf.


BIBLIOGRAPHIE

1. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœtomaternelle. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2006 ;35(Suppl 1):1S81-1S135 .
2. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. Blood 1991;78:2747-2752.
3. Lo YM, Patel P, Sampietro M, et al. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. Lancet 1990;335:1463-1464.
4. Branger B, Winer N. Épidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2006;35(Suppl 1):1S87-1S92.
5. Carbone B, Castaigne-Meary V, Tesnière V, et al. Intérêt pratique du pic systolique de vélocité à l'artère cérébrale moyenne dans la prise en charge des allo-immunisations sévères. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2008;37:163-169.



TEST N°4**EVALUATION DU RISQUE DE PRÉ-ÉCLAMPSIE
À DIFFÉRENTS TERMES DE LA GROSSESSE****Dosages sériques de PAPP-A et de PlGF
et test prédictif à partir du ratio sFlt-1/ PlGF****★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST**

La pré-éclampsie (PE) est une hypertension artérielle gravidique sévère qui survient dans environ 3 % des 800 000 grossesses enregistrées annuellement en France. Non traitée, elle évolue vers l'éclampsie, une crise convulsive constituant une situation d'urgence vitale. La définition de la PE est essentiellement clinique : tension artérielle systolique supérieure à 140 mm Hg et/ou diastolique à 90 mm Hg associée à une protéinurie supérieure à 0,3g/24 h survenant après 20 semaines de grossesse.

La moitié des PE environ, dites « précoces », surviennent avant 34 semaines d'aménorrhée (SA), les autres étant dites « tardives ». Les premières sont les plus redoutées car elles sont associées à une prématurité iatrogène et à un retentissement fœtal important.

La PE et ses complications sont associées à une morbi-mortalité élevée : c'est la 2^e cause de décès maternels en France après les hémorragies de la délivrance. C'est également une cause majeure de retard de croissance intra-utérin (RCIU) et elle est à l'origine d'un tiers des naissances de grands prématurés. Les poussées hypertensives massives imposent parfois l'interruption de grossesse.

En outre, la PE entraîne des complications à long terme : les femmes ayant connu un accouchement prématuré du fait d'une PE ont 8 fois plus de risque de décéder d'une maladie cardiovasculaire que les femmes n'ayant pas souffert de PE et dont la grossesse a été menée à terme.

A l'heure actuelle, l'identification des femmes à risque repose principalement sur l'interrogatoire, qui permet de mettre en évidence un certain nombre de facteurs de risque de PE (antécédents, parité, âge maternel, obésité, hypertension artérielle préexistante, etc.), sur la mesure de la pression artérielle et, éventuellement, sur des examens complémentaires échographiques.

◎ INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

À ces éléments diagnostiques classiques peuvent s'ajouter des tests innovants plus complexes. L'idée est de sélectionner les femmes à risque à partir de renseignements cliniques et de combiner ceux-ci à des marqueurs biophysiques et des dosages biologiques :

- + Au 1^{er} trimestre de la grossesse : dosages sériques de PAPP-A, marqueur du dépistage combiné de la trisomie 21, et de PlGF (PerkinElmer, Roche)
- + Au 2^e trimestre : mesure du ratio sFlt-1/ PlGF (Roche) ou sur le dosage de PlGF couplé aux données échographiques (PerkinElmer)¹¹.

L'instauration de cette stratégie de dépistage peut bénéficier des dosages déjà effectués en début de grossesse pour l'évaluation du risque de trisomie 21.

Chez les patientes hypertendues chroniques avec une protéinurie préexistante, un dosage de PlGF permet en outre de distinguer l'aggravation de la pathologie chronique d'une pré-éclampsie surajoutée, ce qui est important en raison de prises en charge différentes.

En phase précoce (1^{er} trimestre), le dépistage précis et rapide de femmes à risque de PE permet l'instauration d'une prophylaxie par aspirine. Il est en effet bien établi que, débutée entre 10 et 16 semaines de grossesse à une dose au moins égale à 100 mg/j, l'aspirine prévenait la pré-éclampsie (surtout les formes précoces), les RCIU et les décès périnataux. Le dépistage et le ciblage du traitement sur les femmes à risque offre le double avantage d'augmenter l'observance (qui est inférieure à 50 %) et de diminuer les effets indésirables par rapport à une stratégie plus « communautaire ».

En phase plus tardive (2^e trimestre ou 20 à 37 SA), le test prédictif (ratio sFlt-1/PlGF) permet de distinguer les femmes nécessitant une hospitalisation et celles pouvant bénéficier d'un suivi à domicile.

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

Il n'y a pas actuellement de recommandation d'utilisation des tests biologiques de dépistage de la pré-éclampsie, mais leur utilisation est fondée sur plusieurs grandes études, notamment de l'équipe de Nicolaidis en Grande Bretagne.

En France une « Étude Pilote sur la mise en place du dépistage de la pré-éclampsie au 1^{er} trimestre de la grossesse dans le système sanitaire français » menée avec le test Perkin Elmer et dirigée par le Professeur Yves Ville et le Dr Françoise Muller, est en cours afin de préciser sa place dans le parcours de soins des femmes enceintes¹².

L'étude Perastin dirigée par le Pr Franck Perrotin à Tours sur 5 000 patientes a pour objet d'évaluer la « prévention de la pré-éclampsie et du retard de croissance intra-utérin par l'aspirine à faible dose chez les primipares ayant des notchs utérins bilatéraux au premier trimestre ».

11/ D'autres fournisseurs (Thermo Scientific B•R•A•H•M•S Biomarkers,...) développent également des tests de dépistage de la PE.

12/ Le laboratoire Biomnis participe à cette étude (biologiste responsable Corinne Sault, en collaboration avec le Pr Cyril Huissoud, gynécologue obstétricien)

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

L'intérêt de ces tests est important du point de vue de la réduction de la morbi-mortalité fœto-maternelle due à la PE et de ses coûts associés. En effet, les moyens biochimiques et biophysiques sont déjà en place et un traitement préventif simple, l'aspirine, est disponible. L'intérêt économique apparaît clairement si l'on met en balance une prise en charge par l'aspirine 100 mg/j (coût modique) et la gestion d'une pathologie gravissime pour le fœtus et la mère. Ces tests permettent in fine, en combinaison avec les informations cliniques, une prise en charge rationnelle de la pré-éclampsie aboutissant, en cas de nécessité, à la mise en place d'un traitement préventif précoce peu coûteux et ayant fait la preuve de son efficacité.

Coût : Dosage isolé : 54 € (non remboursé) ;
 Dosage couplé avec les dosages des marqueurs sériques du 1^{er} trimestre de la trisomie 21 : 30 € (non remboursé).

DESCRIPTIF TECHNIQUE

■ DÉPISTAGE AU PREMIER TRIMESTRE DE LA GROSSESSE

Dosages biologiques de PAPP-A (*Pregnancy-Associated Plasma Protein-A*) et de PlGF (*Placental Growth Factor*) et calcul de risque par un logiciel dédié. Le dosage est automatisé sur AutoDELFIATM ou DELFIA XpressTM Perkin Elmer couplé au logiciel PredictorTM pour le calcul du risque.

Dosages

Les dosages sont réalisés sur un prélèvement de sang effectué entre 11 semaines et 0 jour d'aménorrhée (11+0 SA) et 13+6 SA (1er trimestre de la grossesse), conjointement au dépistage combiné de la trisomie 21 fœtale (dosages sériques de PAPP-A et de l'hCGβ). Il est intéressant de coupler ces dépistages, notamment chez les patientes à risque de pré-éclampsie, car cela permet de ne réaliser qu'un seul prélèvement et un seul dosage de PAPP-A pour 2 examens.

Le PlGF (*Placental Growth Factor*), produit par le placenta, est un médiateur de l'angiogenèse, appartenant à la famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Chez les patientes qui développeront une pré-éclampsie, la concentration sérique de PlGF est inférieure à celle des patientes non atteintes. Il pourrait également avoir un intérêt pour prédire les RCIU vasculaires et peut-être la prématurité.

La PAPP-A (*Pregnancy-Associated Growth Factor*) est une métalloprotéase, jouant un rôle important dans l'invasion trophoblastique. C'est également un marqueur sérique maternel du calcul risque combiné de T21 fœtale. Une faible concentration sérique en PAPP-A évoque un risque de T21, de trisomie 18, de pré-éclampsie, de RCIU et/ou de fausse-couche spontanée (PAPP-A et hCGβ basses).

Calcul de risque par un logiciel

Le calcul de risque est effectué au laboratoire par un logiciel de calcul adapté aux réactifs et fonctionnant sur le même principe que celui du logiciel de calcul de risque de T21. Les facteurs de risque cliniques, biophysiques et biologiques ont été

établis à partir d'une cohorte de femmes enceintes dont certaines ont développé une pré-éclampsie et d'autres, non. Ce calcul prend en compte les facteurs de risques recueillis par l'interrogatoire et l'examen clinique, les mesures biophysiques (échographie du 1^{er} trimestre avec mesure de la longueur crânio-caudale, tension artérielle, index de pulsatilité à l'écho-doppler des artères utérines) et les marqueurs biologiques.

Renseignements cliniques :

- + IMC : obésité, facteur de risque de PE,
- + Origine géographique : risque de PE augmenté chez les femmes originaires d'Afrique subsaharienne et des Antilles,
- + Parité : la nulliparité est un facteur de risque de PE,
- + Antécédent personnel ou familial de PE,
- + Hypertension chronique (traitée ou non),
- + Tabac : un tabagisme actif diminue le risque de PE (correction sur la distribution des marqueurs biologiques exprimés en MoM).

Mesures biophysiques :

- + **Pression artérielle** : mesurée entre 11+0 SA et 13+6 SA, idéalement bi-bras (sinon un seul bras), permettant de calculer la Pression Artérielle Moyenne (PAM) à partir des pressions systoliques et diastoliques :
PAM = Diastolique + ((Systolique - Diastolique)/3). La pression artérielle moyenne a en effet une valeur prédictive positive de pré éclampsie plus élevée que la simple mesure de la pression artérielle. Le calcul est effectué par le logiciel, puis exprimé en MoM (Multiple de la Médiane) en tenant compte du poids de la patiente.
- + **Doppler des artères utérines** : index de pulsatilité (IP) (présence ou disparition du Notch utérin).

Le calcul peut être réalisé en l'absence des mesures de pression artérielle et/ou Doppler. Si elles sont effectuées, le prélèvement sanguin devra se faire à une date rapprochée de ces mesures biophysiques. La précision de l'estimation du risque augmente avec le nombre de renseignements fournis (renseignements cliniques, mesures biophysiques).

Les performances sont meilleures pour le dépistage des PE précoces (les plus « redoutées »).

La combinaison des dosages sériques et des renseignements cliniques permettrait de dépister 93 % des PE précoces (avec environ 5 % de faux positifs) ; en y ajoutant les marqueurs biophysiques, le taux de détection est de 96,3 %.

■ TEST PRÉDICTIF AU DEUXIÈME TRIMESTRE DE LA GROSSESSE

Mesure du ratio sFlt-1/PlGF

Le sFlt-1 (fraction soluble du récepteur au VEGF de type 1) est un inhibiteur endogène naturel du VEGF et du PlGF, qui capte les formes circulantes libres de PlGF et de VEGF, empêchant ainsi la fraction libre active du VEGF d'exercer son action biologique, notamment vasodilatatrice, en se liant aux récepteurs VEGF-R1 membranaires. La concentration de sFlt-1 augmente et celle du PlGF diminue 5 semaines avant la survenue des signes cliniques de PE. Le rapport sFlt-1/PlGF a une valeur prédictive positive supérieure à la mesure isolée de sFlt-1.

Ce ratio est prédictif de la survenue d'une PE dans les 2 à 5 semaines qui suivent le test avec une VPP et une VPN respectivement de 96 et 98 %, (performances supérieures à celles des dosages isolés de chaque marqueur (Etude PROGNOSIS).

Pr Cyril Huissoud
Gynécologie-obstétrique, Hôpital de la Croix-Rousse, HCL, Lyon

« La pré-éclampsie constitue la 2e cause de mortalité maternelle en France (Rapport du CNEMM, 2014) et la plupart des pré-éclampsies surviennent chez des primigestes, qui n'ont donc par définition, aucun antécédent obstétrical qui puisse alerter le clinicien. Cette affection d'origine vasculaire placentaire est également l'une des premières causes de prématurité et de retard de croissance intra-utérin (RCIU). Ces complications fœtales et néonatales sont l'une des premières étiologies des séquelles neurologiques liées à la naissance.

Disposer d'un test de dépistage permettrait :

- + de mettre en œuvre des traitements préventifs connus et efficaces sans attendre la survenue de complications parfois irréversibles,
- + d'instaurer une surveillance adaptée dans l'intérêt maternel et fœtal.

En outre, les valeurs du PlGF permettent également de préciser le risque de RCIU isolé et d'adapter la surveillance échographique en ciblant mieux les patientes à risque. Les RCIU non diagnostiqués représentent la 1ère cause de mort fœtale in utero évitable. (Roux-Terrier et al, 2014). »

Dr Pierre Arnould
Gynécologie-Obstétrique, CH Annecy

« La France doit faire des efforts pour améliorer ses résultats périnataux. Une grande partie de la morbidité et de la mortalité infantiles est liée à la prématurité, surtout précoce (< 34 SA), qui ne diminue pas depuis 30 ans.

Or, certaines sources de progrès sont apparues ces dernières années pour diminuer l'incidence de la prématurité spontanée et surtout induite (essentiellement pré-éclampsie et retard de croissance intra utérin précoce). Les méta-analyses réactualisent l'intérêt de l'aspirine débutée précocement dans la pré-éclampsie et dans le RCIU, ou de la progestérone dans les incompétences cervicales. Des avancées épidémiologiques (distinction entre les facteurs de risque des complications précoces ou tardives, utilisation d'un calcul statistique combiné limitant les faux positifs), et des avancées techniques avec les progrès de l'échographie (doppler utérin fiable au 1er trimestre), ou la mise au point de marqueurs biochimiques performants et prédictifs comme le PlGF, permettent maintenant d'évaluer un risque de complication précoce de la grossesse, dès la fin du premier trimestre.

Les obstétriciens sont très intéressés par ces perspectives, d'abord sur le plan de la prévention, et d'autre part en raison de l'évolution de la démographie médicale qui impose déjà de redéfinir les filières de soin, au mieux en fonction d'un pronostic évalué précocement au début de la grossesse. »

 BIBLIOGRAPHIE

1. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. Competing Risks Model in Early Screening for Preeclampsia by Biophysical and Biochemical Markers. *Fetal Diagn Ther* 2013;33:8-15 et erratum *Fetal Diagn Ther* 2013;34:43
2. Bujold E, Roberge S, Nicolaides KH. Low-dose aspirin for prevention of adverse outcomes related to abnormal placentation. *Prenat Diagn* 2014;34:642-8.
3. Goffinet F. *Epidemiology. Ann Fr Anesth Reanim.* 2010;29:e7-e12
4. Poon LC1, Zymeri NA, Zamprakou A, Syngelaki A, Nicolaides KH. Protocol for measurement of mean arterial pressure at 11-13 weeks' gestation. *Fetal Diagn Ther* 2012;31:42-8.
5. Roux-Terrier C, Huissoud C, Carrabin N, Colin C, Rudigoz RC, Dupont C. Perinatal mortality and quality of clinical management in the Aurore network from 2005 to 2011. Implementation of morbidity and mortality conferences. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2014.





TEST N°5

DÉTECTION DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DANS LE RETARD DE DÉVELOPPEMENT DE L'ENFANT

Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) permettant de détecter des anomalies chromosomiques de petite taille non visibles sur le caryotype* standard

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

Lors de la mitose*, c'est à dire la division d'une cellule mère en deux cellules filles, chaque cellule fille reçoit une copie complète du génome* de la cellule mère. Toutefois durant ce processus complexe et traumatique, des erreurs de copies peuvent se produire, notamment des pertes (délétion*) ou des gains (duplication*) en chromosomes*, avec de possibles conséquences pathologiques, dont font partie les retards de développement.

Une technique dite d'Hybridation Génomique Comparative (CGH en anglais) permet de repérer ces anomalies en comparant des séquences d'ADN de manière à identifier les déséquilibres en perte ou gain, de tout ou partie d'une ou plusieurs régions génomiques. Mais cette technique ne peut détecter des déséquilibres de taille inférieure à 5 mégabases (5Mb), c'est à dire de 5 millions de paire de base (rappelons que le génome humain comprend 3,4 milliards de paires de base).

🎯 INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

L'ACPA est une technique de CGH réalisée sur un micro-réseau d'ADN, une « puce à ADN », qui autorise actuellement la détection de déséquilibres inférieurs à 100 kilobases (soit 100 000 paires de base).

Grâce à sa grande résolution, cette technologie permet d'augmenter très significativement les taux de détection d'anomalies dans les retards de développement et d'éviter des errances diagnostiques longues et coûteuses en nombre d'exams complémentaires.



STATUT RÉGLEMENTAIRE ET CONDITIONS DE RÉALISATION

L'ACPA est soumise au Décret n°2000-570 du 23 juin 2000 qui fixe les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales. Le consentement de la personne et l'attestation de consultation du prescripteur sont obligatoires.

Les laboratoires de cytogénétique pratiquant les caryotypes constitutionnels (pré ou post natal) sont soumis à autorisation des ARS et les praticiens les exécutant doivent être agréés par l'Agence de la Biomédecine. Tous les laboratoires réalisant l'ACPA, doivent suivre les recommandations techniques préconisées dans le guide des bonnes pratiques édité en 2010 par l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF).

Par ailleurs, des contrôles de qualité externes prospectifs peuvent être réalisés (EEQ ACLF et UKNEQAS).



INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

En augmentant très significativement les taux de détection d'anomalies dans les retards de développement, l'ACPA permet d'éviter des errances diagnostiques longues et coûteuses en nombre d'examens complémentaires.

Les tarifs de l'ACPA sont extrêmement variables d'un laboratoire à l'autre avec un prix moyen de l'ordre de 800 €.

☰ DESCRIPTIF TECHNIQUE

Les puces single-nucleotide polymorphism ou SNP (HumanCytoSNP-12, Illumina) sont des puces pangénomiques sur laquelle chaque marqueur présent contient un SNP. Ces puces contiennent environ 300 000 marqueurs. Leur résolution est comparable à celle de la technique CGH-array, avec une résolution théorique de 31 kb mais, en pratique, de 100 kb, en postnatal.

L'ADN du patient est amplifié et hybridé sur la puce, mais, à la différence de la CGH-array, l'ADN testé n'est pas cohybridé avec celui d'un témoin. C'est donc la variation absolue du signal d'intensité de l'hybridation qui est analysée et non une variation comparative d'intensité entre 2 signaux. En effet, dans la technologie Illumina, l'ADN du patient est comparé à une référence virtuelle issue du projet international Hapmap. Ce dernier est un catalogue des variations génétiques les plus fréquentes chez l'humain. Il décrit la nature des variants, leur emplacement dans la séquence d'ADN et leur distribution au sein d'une population et entre les populations dans différentes parties du monde.

De plus, ces puces étudient le génotype du patient au niveau de chaque marqueur SNP présent sur la puce. Cela permet la détection des pertes d'hétérozygotie (un allèle perdu (hémizygotie) ou 2 allèles identiques (homozygotie)) ou d'un gain lorsqu'un allèle supplémentaire est détecté.

La technique se déroule en 3 étapes principales, comme indiqué ci-dessous, selon le protocole Infinium HD Assay.

La première étape consiste en la dénaturation (NaOH) puis l'amplification de l'ADN génomique.

La deuxième étape est une fragmentation enzymatique puis une dénaturation de l'ADN amplifié. L'ADN est ensuite déposé sur la puce et hybridé pendant 16 à 24 h à 48 °C dans des chambres d'hybridation. Au niveau de chaque sonde, s'hybrident des fragments d'ADN de l'échantillon étudié. Le 1er nucléotide libre (non hybridé) de chaque fragment est un SNP.

Chaque sonde oligonucléotidique subit une extension d'une seule base en se servant de la sonde comme amorce et du fragment d'ADN génomique hybridé comme matrice. Cette extension se fait par un dinucléotide (dNTP) marqué juste au niveau du SNP. La Guanine et la Cytosine sont marquées à la biotine (fluorescence verte) ; l'Adénine et la Thymine sont marquées au DNP (fluorescence rouge). La puce est ensuite lavée de façon à déshybrider les fragments issus de l'échantillon, puis chaque SNP nouvellement marqué subit une amplification du signal à l'aide d'anticorps (Ac anti-biotine et Ac anti-DNP). La puce sera ensuite scannée et le signal analysé. Chaque SNP va renvoyer un signal fluorescent, lors du scanner (rouge ou vert si homozygote, jaune si hétérozygote), dont l'intensité varie en fonction du nombre de copies présent chez le patient étudié.

 AVIS D'EXPERT

Pr Damien Sanlaville
CHU de LYON

« Historiquement, le caryotype a été le premier examen permettant une analyse globale du génome. L'analyse du caryotype permet d'identifier des anomalies de nombre des chromosomes (exemple : trisomie 21) ou de structure des chromosomes. Ces anomalies de structure peuvent être déséquilibrées (par exemple délétion 4p16) ou équilibrées (par exemple translocation réciproque).

Le principal problème est le niveau de résolution du caryotype qui ne permet pas d'identifier des anomalies de moins de 5 à 10 Mb (millions de paire de bases).

Ces 25 dernières années, plusieurs techniques ont permis de voir avec de plus en plus de précision le détail des chromosomes. La dernière technique, dont la faisabilité a été montrée en 1997, est la technique d'Analyse Chromosomiques sur Puce à ADN (ACPA) encore nommée CGH array (array CGH en anglais pour array Comparative Genomic Hybridization) ou caryotype moléculaire. Cette technique permet d'offrir un niveau de résolution 100 fois plus important que le caryotype, c'est-à-dire que le zoom a été multiplié par 100, autrement dit qu'il est maintenant possible de voir des anomalies 100 fois plus petites que sur un caryotype « classique ».

Cette technologie a été introduite en France en diagnostic en 2007 sous l'impulsion de la DGOS qui a financé des plateformes diagnostiques.

Dans le cadre des pathologies constitutionnelles, l'ACPA permet de mettre en évidence 10 à 15 % de variation du nombre de copies (CNV = perte ou gain de matériel génétique) pathogènes non détectées sur le caryotype chez les patients présentant une déficience intellectuelle avec ou sans syndrome malformatif (Miller et al., 2010). Ces variations du nombre de copies (CNV) correspondent à des pertes (on a perdu une partie de l'information à un endroit de notre génome, on parle aussi de délétion) ou des gains (on a gagné de l'information, c'est-à-dire que nous avons en 3 ou 4 exemplaires une information que nous ne devrions avoir seulement qu'en 2 exemplaires). »

La technique d'ACPA est également utilisée dans les pathologies acquises (cancers) permettant d'améliorer le diagnostic histologique, parfois de donner des éléments pronostiques voire thérapeutiques (développement des tests compagnons).

Cette technique permet d'identifier des variants jusqu'alors inconnus. Le nouveau challenge des généticiens est donc l'interprétation de ces nouvelles données jusqu'à présent inconnues.

Au total, l'ACPA est une technique fiable qui a montré sa robustesse et son intérêt diagnostique dans :

- + les pathologies constitutionnelles post natales : déficience intellectuelle, syndrome malformatif, troubles du spectre autistiques, épilepsie, caractérisation d'anomalie chromosomique ;*
- + les pathologies constitutionnelles pré natales : signes d'appels échographiques et caractérisation d'anomalie chromosomique ;*
- + les pathologies acquises : profil génomique des tumeurs liquides mais surtout solides.*

BIBLIOGRAPHIE

1. Guide de bonnes pratiques en cytogénétique (version 3, 2014)
2. Guide de bonnes pratiques de l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) en période prénatal (version 1, 2013)
3. Guide de bonnes pratiques de l'analyse sur puce à ADN (ACPA) (version 1, 2010)
4. JR Vermeesch et al, Eur J Hum Genet, 2007, 15:1105-1114: Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis
5. Shaffer LG, Beaudet AL, Brothman AR, Hirsch B, Levy B, Martin CL, Mascarello JT, Rao KW. Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities, of Genetics in Medicine, 2007, September, vol 9 N°9, p 654-662



TEST N°6

DIAGNOSTIC DES PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES, AINSI QUE DES NEUROBLASTOMES CHEZ LE JEUNE ENFANT

Dosage des dérivés méthoxylés libres des catécholamines dans le plasma (ou méthoxyamines ou métanéphrines libres plasmatiques)

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

Le dosage de ces substances organiques contribue, en association avec les arguments cliniques et l'imagerie médicale, au diagnostic des phéochromocytomes et paragangliomes.

- + Les premières sont des tumeurs généralement bénignes (mais malignes dans 10 % des cas) des glandes surrénales, qui entraînent des épisodes aigus d'hypertension artérielle accompagnés de palpitations, de céphalées sévères, de transpiration.
- + Les secondes, plus rares, sont des amas cellulaires (malins dans 2 à 30 % des cas) qui apparaissent dans le système nerveux sympathique, le plus souvent au niveau du cou ou du thorax.

Ces deux types de tumeurs sont de structures analogues et secrètent des catécholamines, une famille de composés chimiques dont les plus fréquents sont l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine. Dans ces deux cas, le traitement repose principalement sur l'ablation chirurgicale de la tumeur.

Des concentrations élevées de catécholamines sont également retrouvées chez les jeunes enfants – entre 3 mois et 5 ans – présentant un neuroblastome, une tumeur maligne dont le pronostic est très péjoratif en l'absence de diagnostic précoce. Le traitement repose sur la chimiothérapie et sur l'exérèse chirurgicale de la tumeur.

Dans ces pathologies, le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés – en particulier des « dérivés méthoxylés¹³ plasmatiques sous forme libre¹⁴ » – constitue un élément diagnostique important. En France, la technique de dosage utilisée pour le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés totaux (formes libre + liée) dans le plasma et l'urine est la Chromatographie Liquide Haute Performance (CL) couplée à une détection électrochimique (ED), soit CLED.

NB : dérivés méthoxylés des catécholamines = méthoxyamines = métanéphrines.

13/ Ces dérivés méthoxylés sont constitués de trois molécules : la métadrénaline (ou métanéphrine), la normétadrénaline (ou normétanéphrine) et la 3-méthyl-dopamine (ou 3-méthoxytyramine) qui sont les dérivés méthoxylés respectifs des catécholamines suivantes : adrénaline, noradrénaline, dopamine.

14/ Les formes totales varient en fonction de l'alimentation et de certains traitements ; les formes libres sont donc plus spécifiques, en particulier pour le diagnostic du phéochromocytome.

◎ INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

La technique innovante, dite LC-MSMS, consiste à coupler la Chromatographie Liquide Haute Performance à un détecteur spectromètre de masse en tandem (mass spectrometry MS/MS), ce qui permet d'analyser les formes libres des dérivés méthoxylés des catécholamines plasmatiques, en lieu et place des catécholamines plasmatiques ou urinaires, avec de nombreux avantages.

Le prélèvement sanguin unique est plus simple à réaliser que le recueil des urines de 24 heures chez l'adulte ou que de simples mictions urinaires chez les enfants jeunes, nécessitant une conservation au frais et une acidification assez rapide après la fin du recueil des urines. Les recueils urinaires des 24 h sont souvent mal réalisés (notamment chez les enfants), ce qui entraîne la répétition des examens, voire un défaut de diagnostic et de prise en charge adéquate.

Dans le plasma, peuvent être dosées les catécholamines libres ou les dérivés méthoxylés plasmatiques libres. Le dosage des catécholamines plasmatiques libres, remboursé, est influencé par l'activité corporelle immédiate et nécessite, idéalement, un repos de 30 minutes avant le prélèvement. Ce dosage, peu pratique, est également peu sensible. Les dérivés méthoxylés plasmatiques libres sont moins dépendants de l'activité corporelle immédiate et plus performants.

Les dosages des formes totales des dérivés méthoxylés plasmatiques ou urinaires, en particulier par CLED, peuvent être influencés par certains traitements (antihypertenseurs, bêtabloquants, antalgiques) nécessaires au patient. Le dosage plasmatique des dérivés méthoxylés des catécholamines sous forme libre, rendu possible par la technique LC-MSMS, permet de s'affranchir de l'impact des traitements et de diminuer l'influence du régime alimentaire.

Les recommandations actuelles concernant les tests biochimiques pour le diagnostic des phéochromocytomes sont le dosage des dérivés méthoxylés libres plasmatiques des catécholamines et le dosage des dérivés méthoxylés urinaires.

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

Les dosages des dérivés méthoxylés libres des catécholamines plasmatiques ou métanéphrines plasmatiques ne sont pas inscrits à la nomenclature des actes de biologie médicale et le dosage par LC-MSMS n'a fait pour l'instant l'objet d'aucune recommandation de l'HAS ou de toute autre autorité sanitaire en France.

En revanche, les dosages des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires des catécholamines ou métanéphrines urinaires sont tous deux remboursés.

Les dosages des dérivés méthoxylés des catécholamines ou métanéphrines plasmatiques par LC-MSMS sont effectués par quelques centres hospitalo-universitaires (CHU) en France, mais depuis plusieurs années, par la majorité des CHU dans des pays comme la Hollande et l'Allemagne.

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

Le coût du test par personne est de 43 € Hors nomenclature (HN) en remplacement des catécholamines plasmatiques (B140 = 37,80 €) et/ou urinaires (B130 = 35,10 €)

La compensation de ce surcoût apparent est une précision diagnostique qui évite la répétition d'analyses non concluantes et accélère la prise en charge de pathologies graves mais potentiellement curables en cas de traitement précoce.

DESCRIPTIF TECHNIQUE

La chromatographie liquide (ou liquid chromatography LC) couplée au détecteur spectromètre de masse en tandem (mass spectrometry MSMS) ou LC-MSMS permet, grâce à ses bonnes performances en termes de sensibilité et de spécificité, le dosage des formes libres des méthoxyamines plasmatiques. Les méthoxyamines libres ne représentent en effet qu'une fraction faible des méthoxyamines dites totales (= liées + libres). En pratique, elles sont purifiées et concentrées à partir d'un faible volume de plasma, puis, après ajout de standards internes (les mêmes molécules sous forme deutérées), extraites de manière automatisée avant dosage par LC-MSMS. La détection par MSMS offre un gain important en sensibilité ; de plus, sa spécificité élevée permet de s'affranchir de nombreuses interférences potentielles.

Enfin, cette méthodologie présente l'avantage d'une extraction plus simple et automatisable et d'une séparation chromatographique plus rapide, permettant une durée d'analyse et donc un délai de rendu des résultats plus courts. En outre, elle est adaptée à un grand nombre de dosages.

L'analyse des méthoxyamines plasmatiques libres nécessite des instruments spécialisés (LC-MSMS) et un personnel qualifié. Il existe des contrôles de qualité internes vendus par Chromsystems (plasma endocrine control) et un contrôle de qualité externe organisé par RCPA Chemical Pathology Quality Assurance Program (Australie). Le test sera présenté au COFRAC par BIOMNIS en 2016.



AVIS D'EXPERT

Patricia NICCOLI**Onco-endocrinologue, Coordinatrice Nationale du Réseau RENATEN, Bureau du GTE, Hôpital la Timone, Institut Paoli Calmette, Marseille**

« Le dosage des méthoxyamines libres plasmatiques est d'un apport considérable dans le diagnostic des phéochromocytomes et paragangliomes, en tant que marqueur tumoral diagnostique, pronostique et de suivi post-traitement.

Le dosage plasmatique permet de s'affranchir des contraintes liées au recueil urinaire, ce qui est particulièrement pertinent chez les enfants (formes familiales de ces tumeurs), mais également des interférences médicamenteuses et de la nécessité d'arrêt de certains traitements anti-HTA (souvent impossible) et enfin de la nécessité préalable d'un régime adapté.

Cette technique permet un prélèvement en ambulatoire, couplé à d'autres marqueurs neuroendocrines plasmatiques (dans le cadre du suivi des néoplasies endocriniennes multiples), qui peut être réalisé en consultation.

Enfin, dans le suivi des sujets génétiquement à risque de néoplasie endocrinienne multiple de type 2 ou de formes héréditaires de phéochromocytome/paragangliome, où un dosage annuel est indiqué pour le cas index de la famille mais souvent aussi pour plusieurs membres de la même famille, dont des enfants, le dosage plasmatique permet une évaluation précise, fiable et simple à réaliser.

Il est par contre nécessaire d'en prévoir le remboursement par la sécurité sociale du fait du coût élevé de ces dosages, à réaliser le plus souvent pour plusieurs membres d'une même famille.

En effet, on assiste de façon quasi constante à un refus de réaliser le dosage plasmatique de la part des familles qui ne peuvent en supporter le coût, au profit des dosages urinaires, souvent mal réalisés, quasi-impossible pour les enfants, ce qui entraîne la répétition des examens pour tenter d'obtenir une évaluation valable, et conduit dans certains cas à des errances diagnostiques voire à un défaut de diagnostic et de prise en charge adéquate délétères pour les patients.

Cette position est validée par le Réseau National de Prise en Charge des Tumeurs Neuroendocrines Sporadiques et Héréditaires (RENATEN), Réseau de Cancers Rares labellisé par l'Institut du Cancer et par le Groupe d'Etude des Tumeurs Neuroendocrines (GTE) »

 BIBLIOGRAPHIE

1. de Jong WH, Eisenhofer G, Post WJ, Muskiet FA, de Vries EG, Kema IP. Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(8):2841-9.
2. Hickman PE, Leong M, Chang J, Wilson SR, McWhinney B. Plasma free metanephrines are superior to urine and plasma catecholamines and urine catecholamine metabolites for the investigation of pheochromocytoma. *Pathology* 2009;41(2):173-7.
3. Kim HJ, Lee JI, Cho YY, Lee SY, Kim JH, Jung BC, Kim SW, Chung JH, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim JH. Diagnostic accuracy of plasma free metanephrines in a seated position compared with 24-hour urinary metanephrines in the investigation of pheochromocytoma. *Endocr J* 2014 Dec 4. [Epub ahead of print]
4. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF Jr; Endocrine Society. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):1915-42.
5. Peaston RT, Ball S. Biochemical detection of pheochromocytoma: why are we continuing to ignore the evidence? *Ann Clin Biochem* 2008;45(Pt 1):6-10.



TEST N°7

DÉPISTAGE DES INFECTIONS TUBERCULEUSES LATENTES

**Tests sanguins IGRAs (Interferon Gamma Release Assay)
Technologie QuantiFERON®-TB Gold IT et T-SPOTTM TB.**

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

Un tiers de la population mondiale, soit 2 milliards de personnes, est porteuse du BK (bacille de Koch) responsable de la tuberculose. Chaque année, 9 millions de personnes développent une tuberculose-maladie et 2 millions en meurent. Il existe deux formes de cette infection par le BK :

- + **Une « forme maladie »** qui s'accompagne de signes cliniques et qui est contagieuse, essentiellement par voie aérienne.
- + **Une « forme latente »**, dite ITL (« Infection Tuberculeuse Latente »), silencieuse et non contagieuse, mais qui, dans globalement 5 % des cas, se transforme en tuberculose maladie. Le taux de passage est plus élevé chez les nourrissons (de l'ordre 50 %) et les jeunes enfants (de l'ordre de 25 %) ainsi que chez les patients immunodéprimés : il peut aller jusqu'à 20 % chez un porteur du VIH. Il est augmenté dans les 2 ans suivant la contamination par le BK.

Il est donc important de dépister et de traiter les ITL récentes. Un traitement antibiotique par isoniazide et rifampicine de 3 mois permet de prévenir efficacement l'apparition d'une tuberculose maladie. Pour dépister les patients porteurs du BK on utilise, depuis 1907¹⁵, le test cutané d'hypersensibilité à la tuberculine (ou intradermo-réaction à la tuberculine, IDR). Quoique très utilisé dans le monde entier depuis de très nombreuses années, ce test IDR présente de nombreux inconvénients.

D'abord, il est contre-indiqué dans le cas d'antécédents connus de réaction allergique. Un traitement adapté doit être accessible sur le site de l'injection en cas de réaction anaphylactique ou d'hyperréactivité. La réalisation pratique de l'injection intradermique est délicate et la validité de l'interprétation dépend de la qualité cette réalisation.

Le résultat s'obtient 3 jours après l'injection par mesure de la taille d'une induration qui s'est développée au point d'injection¹⁶. La lecture peut en être subjective. La nécessité des 2 visites fait perdre jusqu'à 30 % des patients selon certaines enquêtes. Enfin, les performances statistiques du test sont entachées de « faux négatifs » (patients infectés en phase pré-allergique sans réaction à la tuberculine) et de « faux positifs » (par effet croisé avec le BCG ou des mycobactéries non tuberculeuses). Le nombre de faux positifs peut conduire à un sur-risque de traitement antituberculeux.

15/ Test mis au point en 1907 par le médecin français Charles Mantoux à partir des travaux de Robert Koch

16/ Une réaction est jugée négative lorsque le diamètre d'induration est < à 5 mm. Une réaction est jugée positive lorsque le diamètre d'induration est >= à 5 mm

◎ INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

Depuis janvier 2007, des tests plus performants de dépistage de la tuberculose latente, les IGRAs (*Interferon Gamma Release Assay*), sont disponibles. L'idée est de détecter la présence de BK en mesurant *in vitro* la réaction immunologique de l'organisme, notamment la présence dans le sang d'interféron-gamma (IFN- γ) libérée par les lymphocytes au contact des antigènes du BK. Les avantages de cette technologie sont nombreux et largement reconnus :

- + Elle ne nécessite qu'une seule visite du patient avec des résultats disponibles sous 24h
- + La technique de prélèvement est simple et classique
- + Il n'existe pas de contre-indications
- + Les performances en termes de sensibilité et de spécificité sont très supérieures à celles de l'IDR¹⁷
- + Et surtout, la spécificité chez les patients ayant été vaccinés par le BCG est bien meilleure que celle de l'IDR car les antigènes utilisés dans ces tests sont absents du BCG.

De ce fait, ils permettent d'éviter des explorations inutiles de type radiographie pulmonaire et surtout des traitements antituberculeux en excès.

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

Plusieurs recommandations d'utilisation des IGRAS ont été émises en France.

La Haute Autorité de Santé (HAS) en décembre 2006 avait listé les indications de ces tests. Elles ont été précisées par le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) en juillet 2011 et à nouveau en octobre 2013. Le test IGRA doit être préféré à l'IDR dans les situations suivantes :

- + Enquêtes épidémiologiques autour d'un cas de TB maladie (âge > 5 ans)
- + Patients infectés par le VIH (dépistage systématique de la tuberculose latente ; inclusion dans le bilan initial),
- + Avant mise sous traitement par anti TNF- α
- + A l'embauche des personnels de santé (si IDR > 5 mm ou si exposition à un cas index),
- + Personnes migrantes âgées de 5 à 15 ans.

Le test n'est pas indiqué pour le diagnostic de la tuberculose maladie. Le HCSP a toutefois précisé que les IGRAS pouvaient constituer une aide au diagnostic de tuberculose maladie en cas de diagnostic difficile, chez l'enfant.

17/ Spécificité dans une population vaccinée : QuantIFERON® (QTF) > 98 % versus IDR = 35,4% (à 10 mm d'induration) - Sensibilité dans la tuberculose maladie : QTF = 89 % versus IDR = 65,8% (à 5 mm d'induration).

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

Les tests IGRA étant beaucoup plus spécifiques que l'IDR, ils permettent d'exclure une tuberculose latente avec de très bonnes performances et ainsi, d'éviter des explorations inutiles de type radiographie pulmonaire et surtout des traitements antituberculeux en excès.

DESCRIPTIF TECHNIQUE

Les IGRAs sollicitent les lymphocytes effecteurs du patient (à durée de vie courte) et testent leur réponse mémoire aux antigènes mycobactériens. Après une prise de sang, ces lymphocytes sont mis en contact avec trois environnements : un environnement neutre qui sert de témoin négatif, de la phytohémagglutinine pour le témoin positif et 3 antigènes spécifiques du BK (ESAT-6, CFP-10 et TB 7.7) pour le tube réactionnel. Les contrôles étant validés, un résultat positif témoigne que le patient est porteur de BK vivants, sans pour autant préjuger de la multiplication de ces BK (tuberculose maladie) ou de leur quiescence (tuberculose latente). La mise en évidence de l'activation des lymphocytes effecteurs se fait par la mesure de l'IFN- γ par un test ELISA (QuantiFERON®-TB Gold IT) ou par Elispot (T-SPOTTM TB). L'IFN- γ est une cytokine stable (4 semaines à + 4°C) et dosable par des tests ELISA bien standardisés.

Le test QuantiFERON®-TB Gold IT requiert l'utilisation de tubes spéciaux. Sa réalisation au laboratoire de biologie médicale est simple et automatisable. Il existe des contrôles de qualité internes vendus par Qiagen et un contrôle de qualité externe organisé par UKNEQAS. Le test est accrédité COFRAC chez Biomnis.

 AVIS D'EXPERT**Professeur Stéphane NANCEY****MD, PhD, Chef de Service d'Hépatogastroentérologie, GH LYON-Sud, Hospices Civils de Lyon, INSERM U1111-Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)**

« Le QuantiFERON® est un outil plus sensible que l'IDR à la tuberculine dans une population de patients immunodéprimés. Il doit être systématiquement interprété selon un témoin positif et négatif. En cas de lymphopénie, il peut être faussement négatif. Il exclut une tuberculose latente avec une excellente performance et permet de réduire de moitié le nombre de patients requérant un traitement antibiotique prophylactique anti-tuberculeux dans le cadre de la prévention de la réactivation tuberculeuse (comparé à l'IDR souvent faussement positive). »

Docteur Gérard CHATTE**Service de pneumologie, Infirmierie Protestante, Caluire**

« Le QuantiFERON® s'avère bien utile en pratique pneumologique. Bien sûr, son usage ne s'applique pas en cas de lymphopénie. J'ai une pratique déjà longue de l'IDR, et même avec une bonne technique, on peut avoir des soucis d'interprétations selon l'ancienneté de la vaccination BCG, ou en cas de contage tuberculeux passé. Chez la personne âgée, il faut parfois répéter l'IDR pour qu'elle se positive. Le QuantiFERON® nous aide dans les cas de contage tuberculeux, lorsque l'IDR est en zone grise (10-15 mm d'induration). Il s'avère indispensable avant la mise en route d'une biothérapie anti-TNFα.

J'ai le souvenir d'un collègue pneumologue, présentant une maladie de Crohn, qui avait été évalué par IDR seulement et qui a développé sous anti-TNFα, une tuberculose multifocale (cérébrale et pulmonaire). Je pense que le QuantiFERON® aurait permis de correctement le classer en tuberculose maladie et de le traiter au préalable. »

BIBLIOGRAPHIE

1. BEH 24-25 / 12 juin 2012 283 ; Numéro thématique – Tuberculose en France : La vigilance reste nécessaire.
2. La revue du praticien Vol.62 ; avril 2012 ; 471-509 ; Monographie Tuberculose coordonnée par E. Bouvet
3. Haut Conseil de la Santé Publique : Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma. Rapport du groupe de travail, 1er juillet 2011
4. Haut Conseil de la Santé Publique : Enquête autour d'un cas de tuberculose. Recommandations pratiques, Rapport 25 octobre 2013
5. Médecine et maladies infectieuses 42 (2012) 579-584 ; Performance of Quantiferon for the diagnosis TB ; V. Meyssonier et Al.



TEST N°8

DIAGNOSTIC PRÉCOCE DU CANCER DE L'OVAIRE

◆

**Dosage de HE4 (*Human Epididymal secretory protein*) et Algorithme ROMA
de calcul du risque de cancer de l'ovaire**

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

.....

En France le cancer de l'ovaire se situe à la 8^e place des cancers féminins pour l'incidence (4615 nouveaux cas en 2012) mais à la 4^e place pour la mortalité (3140 décès en 2012¹⁸).

Cette surmortalité relative (3 % des nouveaux cas et 5 % des décès de cancer) s'explique au moins en partie par un diagnostic tardif. Chez les femmes atteintes, l'examen clinique peut en effet rester longtemps normal et les symptômes, lorsqu'ils s'expriment, sont peu spécifiques : asthénie, amaigrissement, altération de l'état général, douleurs dorsales, sensation de gonflement abdominal, douleurs de l'abdomen, envie urgente d'uriner, etc. L'âge au diagnostic est ainsi supérieur à 60 ans dans deux tiers des cas.

Outre l'examen clinique, le diagnostic du cancer de l'ovaire repose sur l'imagerie (échographie pelvienne, scanner, IRM) et il est confirmé par l'analyse anatomopathologique des prélèvements tissulaires réalisés par cœlioscopie ou laparotomie.

Au plan biologique, le principal marqueur du cancer de l'ovaire est l'antigène CA125 sérique. Sa spécificité est faible car sa concentration sérique peut s'élever au cours d'autres cancers (cancers de l'endomètre, du sein ou du poumon) ou d'autres pathologies non cancéreuses (kystes, fibrome, endométriose, infections gynécologiques, etc.). Sa sensibilité est variable (de 30 à 90 % selon le type de cancer de l'ovaire). Un test plus sensible et spécifique pourrait permettre une détection plus précoce des cancers, susceptible d'en améliorer la prise en charge et donc le pronostic.

.....

18/ INCA : Les Cancers en France, édition 2014, Janvier 2015, p.68.

🎯 INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

Le dépistage pourrait être amélioré par le dosage sérique d'un nouveau marqueur tumoral, **HE4** (« *Human Epididymal Protein 4* »), associé à la mesure du CA125. Au sein d'un algorithme mathématique, l'algorithme **ROMA™** (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*), ces deux marqueurs donnent une estimation quantifiée du risque de malignité.

La protéine HE4 est plus sensible et plus spécifique que le CA125 (notamment, elle ne s'élève pas dans les endométrioses) et leur association offre la meilleure sensibilité de détection des cancers ovariens aux stades précoces et de leurs récives (*Moore RG et al. Gynecol Oncol 2008*).

L'association HE4/CA125/ROMA permet ainsi réduire le nombre d'interventions chirurgicales inutiles ou, a contrario, d'orienter rapidement une femme ayant un risque élevé vers une équipe spécialisée.

HE4 est également utile dans le suivi des cancers de l'ovaire après traitement, notamment dans les cas où le CA125 n'est pas exprimé. Sa concentration sérique augmente en effet 2 à 5 mois avant la récive clinique et une augmentation de 20 % d'HE4 est considérée comme une progression significative.

Ce marqueur n'est toutefois pas totalement spécifique du tissu ovarien, ni du cancer de l'ovaire : il est surexprimé dans les cancers thyroïdiens, des glandes salivaires et de l'endomètre et son expression est forte à modérée dans les adénocarcinomes pulmonaires, mammaires et les mésothéliomes (mais les contextes sont différents).

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

En France, le dosage du CA125 **n'est pas recommandé** pour la détection du cancer de l'ovaire en raison de son manque de sensibilité et de spécificité. Il est toutefois recommandé lors du bilan diagnostique, pour le suivi du traitement des patientes ayant un cancer de l'ovaire (Guide ALD30 « Cancer de l'ovaire », HAS InCa, janvier 2010).

Il n'existe pas actuellement de recommandation d'utilisation d'HE4 (index ROMA) ni de cadre réglementaire particulier pour ce dosage.

📉 INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

Le coût du dosage de HE4 et du calcul ROMA est de 25 € HN. Il faut ajouter le coût à la nomenclature du dosage de CA125 (B60, soit 16,20 €).

La contrepartie est évidente. Chez les patientes présentant une masse pelvienne, HE4/CA125/ROMA permet une meilleure évaluation du risque de cancer et donc de réduire le nombre d'interventions chirurgicales à visée diagnostique (et thérapeutique) inutiles. Le dépistage plus précoce du cancer de l'ovaire permet une prise en charge à un stade permettant d'améliorer la survie, de réduire les traitements et les durées d'hospitalisation. Le dépistage plus précoce des récives a la même incidence.

☰ DESCRIPTIF TECHNIQUE

HE4 est une glycoprotéine appartenant à la famille des WFDC2 (*Whey Acidic Four Disulfide Core protein*) anciennement WAP gene family, comportant des inhibiteurs de protéases. Sa séquence est composée d'environ 50 acides aminés avec 8 résidus cystéines formant 4 ponts disulfides. Sa biologie est mal connue : activité anti-protéase (cible inconnue) et/ou réponse anti-inflammatoire au développement du cancer.

HE4 est surexprimée chez les patientes ayant un cancer de l'ovaire, même dans les premiers stades (I et II), principalement dans les cancers de type séreux, endométrioïdes et à cellules claires. Son expression est indépendante de celle du CA125, et effective dans 50 % des cancers qui n'expriment pas le CA125.

La réalisation de ce dosage au laboratoire est simple et automatisable. Il existe des contrôles de qualité interne et un programme de contrôle de qualité externe.

Il convient de prélever du sérum (1 ml requis ; quantité minimale : 600 µL). Le sérum doit être séparé du caillot puis congelé à -20°C . Le dosage s'effectue par électrochimiluminescence sur automate d'immunoanalyse.

L'algorithme ROMA™ permet de classer les patientes selon leur niveau de risque de malignité, faible ou élevé, en tenant compte de leur statut ménopausal. Celui-ci doit impérativement être précisé. À titre indicatif, avec la technique ECL Roche :

Chez la femme préménopausée :

ROMA $\geq 11,4$ = haut risque de cancer de l'ovaire
ROMA $< 11,4$ = faible risque de cancer de l'ovaire

Chez la femme postménopausée :

ROMA $\geq 29,9$ = haut risque de cancer de l'ovaire
ROMA $< 29,9$ = faible risque de cancer de l'ovaire
Pour l'algorithme ROMA, HE4 et CA125 doivent être dosés avec la même technologie.

Recommandations 2013 du CNGOF

http://www.cngof.asso.fr/data/RCP/CNGOF_2013_FINAL_RPC_tumeurs%20ovaire.pdf

« En cas de masse ovarienne indéterminée ou complexe en échographie, une IRM est utile pour la caractériser (NP2). Dans cette circonstance, quelle que soit la taille tumorale, l'IRM est indiquée en 2e intention (grade B). La TDM et la TEP-TDM ne sont pas indiquées dans la stratégie diagnostique d'une tumeur ovarienne présumée bénigne (TOPB). La ponction à visée diagnostique ne doit pas être réalisée pour préciser la nature d'un kyste uniloculaire liquidien (grade C). Elle est contre-indiquée en cas de kyste non strictement liquidien. La performance diagnostique du dosage plasmatique du CA125 pour orienter vers la malignité devant une TOPB est insuffisante.

Le dosage plasmatique du CA125 n'est pas recommandé en première intention dans un but diagnostique chez la femme en période d'activité génitale ayant une TOPB (grade C). Chez la femme ménopausée ayant une masse ovarienne uniloculaire liquidienne, même persistante, le dosage systématique du CA125 dans un but diagnostique n'est pas recommandé (grade C).

La spécificité du dosage plasmatique d'HE4 est supérieure à celle du CA125 pour le diagnostic de malignité (NP4), mais ce marqueur n'est pas utilisé en pratique courante. HE4 n'est pas référencé dans les actes de biologie à ce jour. Des algorithmes ont été proposés pour aider la stratégie diagnostique. Ces modèles prédictifs sont basés sur la valeur du CA125 (OVA 1) +/- HE4 (ROMA) et parfois associés aux données échographiques et au statut ménopausique. L'algorithme ROMA a une meilleure sensibilité que le CA125 et l'HE4 seuls pour le diagnostic de malignité (NP1). Il est donc prometteur dans le diagnostic différentiel des tumeurs bénignes et malignes de l'ovaire.

Devant la découverte fortuite en coelioscopie d'une masse ovarienne, la stratégie diagnostique ne peut être définie précisément, car l'aspect macroscopique de la tumeur est peu spécifique et le diagnostic histologique extemporané peu sensible dans les tumeurs ovariennes à malignité atténuée. Devant la découverte fortuite d'un CA125 plasmatique élevé, l'échographie pelvienne est l'examen d'imagerie de première intention. Les données de la littérature sont insuffisantes pour définir une valeur seuil de CA125 nécessitant des explorations complémentaires ou une surveillance particulière, en cas d'échographie pelvienne normale. Il n'y a pas d'arguments pour modifier les stratégies diagnostiques ci-dessus selon l'état ou non de ménopause. »

BIBLIOGRAPHIE

1. Moore RG et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 2009;112(1):40-46.
2. Moore RG et al. Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass *American Journal of Obstetrics Gynecology* 2010;203(3):228.
3. T Van Gorp et al. HE4 et CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer : prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Molecular Diagnostics* 2011;104:863-870.
4. Li et al. Does risk ovarian malignancy algorithm excel human epididymis protein 4 and CA125 in predicting epithelial ovarian cancer:A meta-analysis *BMC. Cancer* 2012;12:258.
5. Lamy P. HE4, un nouveau marqueur des cancers épithéliaux ovariens:évaluation des performances analytiques. *Ann Biol Clin* 2012;68(3):325-9.



TEST N°9

DÉPISTAGE DU CANCER DE LA PROSTATE

Dosage d'un nouveau marqueur tumoral du cancer de la prostate, [-2]proPSA, avec calcul d'un score de risque de malignité : *Prostate Health Index (phi)*

★ CONTEXTE ET OBJET DU TEST

La problématique du dépistage du cancer de la prostate est bien connue. Avec 56 840 nouveaux cas estimés en 2012¹⁹, c'est le cancer le plus fréquent chez l'homme, loin devant le cancer du poumon (28 200 cas) et le cancer colorectal (23 200 cas).

Son incidence est en nette augmentation (+6,3 % depuis 2009) en grande partie sous l'effet d'une très large prescription du dosage d'un marqueur biologique, l'Antigène Spécifique Prostatique (en anglais Prostate Specific Antigen, PSA) qui est une substance presque exclusivement sécrétée par la prostate (d'où le qualificatif de « spécifique ») et qui existe sous plusieurs formes dont les plus connues sont le « PSA libre » et le « PSA lié », l'ensemble de ces formes constituant le PSA total (PSAt). Le dosage des PSA est devenu – en dépit des mises en garde de la HAS – une analyse quasi routinière chez les hommes de plus de 50 ans.

Mais ce test de dépistage, spécifique de l'organe, a l'inconvénient d'être peu « spécifique » de la pathologie au sens statistique du terme. La concentration sérique de PSA peut en effet être temporairement élevée pour diverses raisons, en cas de prostatite ou après une échographie endorectale, par exemple. Par ailleurs, la sécrétion de PSA est également augmentée en cas d'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) qui est une condition très fréquente chez les hommes dans cette tranche d'âge, mais qui n'a d'autres inconvénients que l'inconfort lié aux troubles mictionnels qu'elle entraîne. Signes cliniques que l'on retrouve également en cas de cancer ! Le dosage du PSA seul ne permet donc pas de conclure à la présence d'une tumeur maligne. Il conduit à un nombre élevé de « faux positifs » (concentration plasmatique élevée du PSA chez des patients sans cancer). Inversement, comme une concentration basse de PSA n'exclut nullement la présence de cellules cancéreuses, il peut également conclure à des « faux négatifs » (patients avec PSA « normal » malgré la présence d'un cancer²⁰).

Ce manque de spécificité statistique conduit les cliniciens à rechercher une confirmation diagnostique par la réalisation d'échographies ou d'IRM prostatique et pelvienne, mais aussi, dans de nombreux cas, par celle d'une ou plusieurs biopsies prostatiques. Il s'agit d'actes qui ne sont pas anodins, qui présentent des risques infectieux et hémorragiques non négligeables et qui, réalisés sous anesthésie locale ou générale, sont très inconfortables pour le patient.

19/ INCA : Les Cancers en France, édition 2014, Janvier 2015

20/ La spécificité du dosage des PSAt est faiblement améliorée par le calcul du rapport entre PSA total et PSA libre (PSA_{libre}/PSAt) dont la valeur élevée (au-delà de 20 %) oriente plutôt vers un diagnostic d'HBP.

En 2011, près de 30 000 biopsies de la prostate ont été réalisées en France²¹. Un certain nombre pourrait être évité avec un test biologique plus spécifique.

Enfin, le dosage des PSA ne permet pas de distinguer les cancers agressifs nécessitant une intervention thérapeutique rapide, des cancers localisés sans progression, qui ne demandent qu'un suivi attentif des patients. Il n'existe en effet pas de corrélation entre le niveau de PSA et un indice de mesure du degré d'agressivité du cancer comme le score de Gleason²².

🎯 INTÉRÊT MÉDICAL DU TEST

C'est pour gommer ces inconvénients qu'a été développé récemment un nouveau test, consistant à effectuer le dosage d'un nouveau marqueur, le [-2] proPSA, une isoforme* du PSA_t, qui a l'avantage d'être presque exclusivement exprimée par les cellules de cancer de la prostate, indépendamment de l'âge du patient et du volume prostatique. Ce marqueur est donc plus spécifique que le dosage classique du PSA_t, sensible à l'hyperplasie du tissu prostatique, qu'elle soit bénigne ou cancéreuse.

Combinée au PSA total et au PSA libre au sein d'une formule mathématique (le *Prostate Health Index*), cette mesure permet en outre d'obtenir un indicateur (phi) qui reflète de manière plus précise la probabilité de présenter un cancer. Cela peut permettre par exemple de poser un diagnostic de cancer chez des patients ayant une concentration sérique en PSA_t inférieure au seuil de 2 ng/ml, pourtant considéré comme « normal ».

De manière générale, le [-2]proPSA associé au calcul de l'index phi permet, chez les patients âgés de 50 ans et plus, ayant une concentration sérique de PSA total comprise entre 2 et 10 ng/ml et un toucher rectal (TR) non suspect :

- + d'identifier de manière non invasive les patients à forte probabilité de présenter une biopsie de la prostate positive (et donc de réduire le risque de sur-diagnostic et le nombre de biopsies prostatiques),
- + de détecter les cancers potentiellement agressifs (et donc de réduire le risque de sur-traitement) puisqu'il existe une corrélation significative entre la valeur du phi et le score de Gleason.

📄 STATUT RÉGLEMENTAIRE EN FRANCE

Il n'existe actuellement aucune recommandation d'utilisation du [-2]proPSA et de l'index phi, ni de cadre réglementaire particulier pour ce dosage.

En revanche, le dosage de PSA_t a fait l'objet de nombreuses recommandations, parfois divergentes, dont le but est de trouver un délicat équilibre entre capacité de dépistage des cancers et risque de sur-diagnostic et de sur-traitement.

Ainsi la HAS, dans un avis de 2012, recommande de ne pas dépister systématiquement le cancer de la prostate par le PSA_t, ni dans la population générale, ni dans une

21/ Si 1 million de dosages de PSA_t sont proposés, 100 000 biopsies seront réalisées, 20 000 cancers détectés et 10 000 prostatectomies réalisées ; 10 patients vont en décéder, 300 patients auront une incontinence et 4 000 auront une impuissance (Frankel et al, Lancet, 2002).

22/ Le score de Gleason, côté de 1 à 5 est fondé sur l'analyse histologique des cellules cancéreuses prélevées par biopsie. Il est bien corrélé à la probabilité de survie sans traitement.

population considérée à haut risque. Le dépistage reste ainsi une démarche individuelle de diagnostic précoce d'un cancer de la prostate, à la demande d'un patient, dans le cadre d'une consultation pour des troubles mictionnels, à la suite d'une découverte d'une anomalie au toucher rectal. Les hommes doivent être informés des risques et bénéfices de tous les examens impliqués dans cette démarche.

En revanche, l'Association Française d'Urologie (AFU) recommande la détection du cancer de la prostate chez les hommes sans polyopathie, à partir de 50 ans, par un TR et par le dosage de PSA_t. Chez les hommes à haut risque de cancer prostatique (d'origine africaine ou antillaise ou avec antécédent familial), la détection précoce est recommandée à partir de l'âge de 45 ans.

En ce qui concerne le suivi d'un cancer de la prostate traité, l'AFU recommande des dosages périodiques du PSA_t pour évaluer la réponse à un traitement (chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie) et détecter une récurrence de la maladie. L'élévation du PSA total en cas de récurrence ou de métastase peut précéder de 6 à 18 mois la symptomatologie clinique.

L'Association Européenne d'Urologie (EAU) propose un premier dosage à 40-45 ans avec une adaptation de la fréquence ultérieure des dosages en fonction de cette valeur initiale : intervalle de 2 à 4 ans pour les hommes avec un PSA_t ≥ 1 ng/ml à 45-59 ans et de 8 ans pour ceux avec un PSA_t < 1 ng/ml²³.

INTÉRÊT MÉDICO-ÉCONOMIQUE

Le coût de l'ensemble du test (dosages des PSA_t, PSA libre et [-2]proPSA et calcul du phi) est de 95 € (Hors Nomenclature).

Le dosage du PSA_t (examen 7318) est coté B45 à la NABM* (soit 12,15 €) et celui du PSA libre avec rapport PSA libre/PSA_t (examen 7320) est coté B70 (18,90 €)²⁴. Ces deux examens ne sont pas cumulables.

Ce surcoût doit être mis en balance avec ses avantages médico-économiques, notamment la réduction de gestes invasifs et inappropriés :

- + réduction du nombre de biopsies prostatiques et de leur morbidité associée,
- + mise en surveillance active des cancers de la prostate détectés, afin de ne traiter que les évolutifs,
- + identification rapide des patients à risque de cancer agressif permettant une prise en charge plus précoce.

23/ Ces dérivés méthoxylés sont constitués de trois molécules : la métadrénaline (ou métanéphrine), la normétadrénaline (ou normétanéphrine) et la 3-méthyl-dopamine (ou 3-méthoxytyramine) qui sont les dérivés méthoxylés respectifs des catécholamines suivantes : adrénaline, noradrénaline, dopamine.

24/ Les formes totales varient en fonction de l'alimentation et de certains traitements ; les formes libres sont donc plus spécifiques, en particulier pour le diagnostic du phéochromocytome.

☰ DESCRIPTIF TECHNIQUE

Les conditions de prélèvement pour le dosage du [-2] proPSA sont celles requises pour les dosages de PSA total et PSA libre. Il doit donc être réalisé à distance de toute manipulation prostatique telle qu'un toucher rectal, un massage de la prostate, une échographie transrectale ou une biopsie de la prostate.

Le sérum prélevé (1 ml requis ; quantité minimale : 700 µL) doit être séparé du caillot dans les 3 heures suivant le prélèvement, puis congelé à - 20 ° C.

Le dosage s'effectue par chimiluminescence (calibration Hybritech®) sur automate d'immunoanalyse avec contrôles internes.

L'index *phi* est défini comme : $phi = \frac{[-2] \text{ proPSA}}{PSA_{\text{libre}}} \cdot \sqrt{PSA_{\text{total}}}$ ²⁵, les dosages de

[-2]proPSA, PSA libre et PSA total devant avoir été réalisés avec la même technologie.

Valeurs de l'index <i>phi</i> (étalonnage Hybritech®)	Probabilité de cancer (à 95% de spécificité)
0 - 21	8,4 % (1,9 - 16,1 %)
21 - 40	21 % (17,3 - 24,6 %)
> 40	44 % (36,0 - 52,9 %)

25/ Cf. Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjen J et al.: Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. Eur. Urol. 2010 Jun;57(6):921-7.



AVIS D'EXPERT

Pr Alexandre de La Taille
Urologie, hôpital Henri-Mondor (Créteil)

« L'enjeu est de pouvoir distinguer les patients à haut risque d'évolution vers un cancer agressif et qui vont décéder de leur cancer de la prostate, de ceux qui présentent des cancers faiblement agressifs n'ayant pas d'impact sur l'espérance de vie. Il faut donc utiliser le PSA à bon escient dans le diagnostic précoce du cancer de la prostate.

L'utilisation concomitante du [- 2] proPSA et du PSA réduirait le nombre de biopsies inutiles, améliorerait la prédictibilité de l'agressivité tumorale et aurait un intérêt dans la surveillance active. L'IRM peut avoir à l'avenir un rôle de filtre dans la détection des cancers agressifs, mais sa sensibilité est très radiologue-dépendant. »

Propos cités par S. Le Gac dans « Diagnostic précoce du cancer de la prostate. Comment améliorer les performances du PSA ? », Le Quotidien du Médecin, 17 Novembre 2014.



BIBLIOGRAPHIE

1. Sokoll LJ, SandaMG, Feng Z, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network Study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1193-200.
2. Jansen FH, Van Schaik RHN, Kurstjens J, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010;57:921-927.
3. Guazzoni G et al. p2PSA Significantly Improves the Prediction of Prostate Cancer at Initial Extended Prostate Biopsies in Patients with Total PSA Between 2.0 and 10ng/ml: Results of a Prospective Study in a Clinical Setting. *Eur Urol* 2011; 60: 214-222.
4. Catalona W. J et al. A multicenter study of -2 proPSA combined with PSA and free PSA for Pca detection in 2 to 10 ng/ml PSA range. *J Urol* 2011; 185:1650-1655.
5. Houlgatte A. et al. Place du [-2]proPSA et de l'index Phi dans la détection précoce du cancer de prostate : évaluation sur une série de 452 patients. *Progrès en urologie* 2012; 22 : 279-283.



ADN :

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule, présente dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. C'est aussi le support de l'hérédité car il est transmis lors de la reproduction, de manière intégrale ou non. Il porte donc l'information génétique (génotype) et constitue le génome des êtres vivants.

Aneuploïdie :

L'aneuploïdie caractérise une cellule qui ne possède pas le nombre normal de chromosomes (46 chez l'être humain).

Axe hypothalamo-hypophysaire :

Système fondamental de l'organisme associant l'hypothalamus et l'hypophyse (dans le cerveau) à différentes glandes de l'organisme et permettant la régulation de la production d'hormones par ces glandes (thyroïde, surrénales, ovaires...).

Caryotype :

Le caryotype est l'analyse ou la description macroscopique de l'arrangement des chromosomes d'une cellule. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard : par paire et classés par taille.

Cellules de la granulosa :

La granulosa est une couche de cellules folliculaires granuleuses entourant l'ovocyte et la cavité liquidienne du follicule ovarien et responsable de la sécrétion de la progestérone durant la 2e moitié d'un cycle ovarien (corps jaune périodique) ou durant les quatre premiers mois de la grossesse (corps jaune gravidique).

Chromosome :

Un chromosome est un élément microscopique constitué de molécules d'ADN et de protéines. Il porte les gènes, supports de l'information génétique, transmis des cellules mères aux cellules filles lors des divisions cellulaires ou mitoses. Chaque cellule somatique humaine possède 22 paires de chromosomes homologues (également appelés autosomes), numérotés de 1 à 22, et une paire de chromosomes sexuels (également appelés gonosomes), soit un total de 23 paires.

Délétion :

Une délétion est une mutation génétique caractérisée par la perte de matériel génétique sur un chromosome.

Duplication :

La duplication est une mutation génétique caractérisée par le doublement du matériel génétique sur un chromosome.

Forme libre-forme liée :

Les molécules peuvent circuler dans le plasma sous forme libre ou liée à une protéine de transport.

Génome :

Le génome est l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce codée dans son acide désoxyribonucléique (ADN) (en ce qui concerne l'espèce humaine).

Homozygotie – hétérozygotie :

Homozygote se dit d'un gène qui, chez un individu, sera représenté par deux allèles (des variantes de ce gène) identiques, sur un même locus. L'homozygotie s'oppose à l'hétérozygotie, qui consiste à avoir, pour un même gène, deux variants différents. Un individu est toujours homozygote pour certains gènes, et hétérozygote pour d'autres.

Hyperandrogénie :

Elle correspond à un excès de sécrétion d'androgènes (hormones mâles). Chez la femme, elle entraîne de l'acné, une pilosité excessive, notamment au niveau du visage et du thorax, ainsi qu'une hyperséborrhée.

Isoforme :

Les isoformes d'une protéine sont les différentes formes qu'elle prend lorsqu'elle est issue de gènes différents, ou du même gène après épissage alternatif (étape intermédiaire entre la lecture du gène et la production de la protéine à partir de ce gène par la cellule).

Répétabilité :

Etroitesse de l'accord entre les résultats de plusieurs mesures d'un même paramètre, effectuées en appliquant strictement les mêmes conditions de mesure.

Reproductibilité :

Etroitesse de l'accord entre les résultats de plusieurs mesures d'un même paramètre, effectuées en faisant varier les conditions de mesure.

Réserve ovarienne :

Les femmes disposent dès la naissance d'un stock d'ovocytes défini et non renouvelable, dont dépend la fertilité. S'il n'est pas possible de quantifier ce stock dans sa totalité, le nombre d'ovocytes présents dans les ovaires peut être estimé, à un moment donné. C'est ce que l'on nomme réserve ovarienne.

Sensibilité :

La sensibilité (Se) est la probabilité qu'un test réalisé sur une personne malade se révèle positif ; autrement dit, que le test soit positif sachant que la personne est malade.

	Malade	Non-malade	
Positif	a	b	a + b
Négatif	c	d	c + d
	a + c	b + d	N

La sensibilité correspond donc au nombre de personnes malades et positives au test (vrais positifs) parmi l'ensemble des personnes malades.

$$Se = p(\text{positif} / \text{malade}) = \frac{a}{a+c}$$

Spécificité :

La spécificité (Sp) est la probabilité qu'un test réalisé sur une personne saine se révèle négatif ; autrement dit, que le test soit négatif sachant que la personne n'est pas malade.

	Malade	Non-malade	
Positif	a	b	a + b
Négatif	c	d	c + d
	a + c	b + d	N

La spécificité correspond donc au nombre de personnes non-malades et négatives au test (vrais négatifs) parmi l'ensemble des personnes non-malades.

$$Sp = p(\text{négatif} / \text{non-malade}) = \frac{d}{b+d}$$

Syndrome des ovaires polykystiques :

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est un trouble hormonal qui se caractérise par une augmentation inhabituelle de la production d'androgènes (hormones mâles) dans les ovaires, ce qui perturbe la production d'ovules. Au lieu d'être libérés au moment de l'ovulation, les ovules se transforment en kystes qui s'accumulent dans les ovaires et sont à l'origine de troubles de la fertilité. Le SOPK entraîne aussi des signes d'hyperandrogénie, une résistance à l'insuline (comme le diabète) et est souvent associé à une obésité.

À PROPOS DE BIOMNIS

Leader français dans le secteur de la biologie médicale spécialisée, Biomnis effectue plus de 40 000 analyses par jour sur un panel de plus de 2 500 examens, y compris les actes spécialisés pour lesquels il dispose de tous les agréments nécessaires. Fondé en 1897 par Marcel Mérieux et dédié à la biologie médicale depuis plus de 100 ans, Biomnis demeure l'acteur de référence en biologie spécialisée en France grâce à une innovation et un investissement technologique permanents, notamment dans les domaines de la biologie de la femme, de l'oncologie et de la médecine personnalisée, ainsi que de la génétique chromosomique et moléculaire.

CONTACTS

Biomnis
Direction de la communication
communication@biomnis.com
Tél. 04 72 80 23 54

Contact presse
Agence Ekno
biomnis@ekno.fr
Tél. 07 78 41 19 70

www.biomnis.com