

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

Transmission au ministre : 5 novembre 2018

Publication officielle : 4 janvier 2019

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

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

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

Transmission au ministre : 5 novembre 2018

Publication officielle : 4 janvier 2019

Rédigé par

Simon Bélanger
Anne Bergeron
Frédéric Breton
Annie Dubé
Andrée Fortin
Catherine Gravel
Phuong Hua
Éléna Morarescu
Geneviève Morrow
Emmanuelle Tchekanda

Coordination scientifique

Éric Potvin

Sous la direction de

Michel LeBrun

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

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

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

Membres de l'équipe projet

Auteurs

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

Coordonnateur scientifique

Éric Potvin, Ph. D.

Directeur

Michel LeBrun MBA, Ph. D.

Repérage d'information scientifique et soutien documentaire

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

Soutien administratif

Annabelle Suire

Équipe de l'édition

Patricia Labelle
Denis Santerre
Hélène St-Hilaire

Sous la coordination de
Renée Latulippe, M.A.

Avec la collaboration de
Carole Saint-Père, révision linguistique

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2019

Bibliothèque et Archives Canada, 2019

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF)

ISBN 978-2-550-83127-3 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2019

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

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Évaluation de six analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Québec, Qc : INESSS; 2018. 123 p.

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

Responsabilité

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

Déclaration d'intérêts

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

COMITÉ SCIENTIFIQUE – ANALYSES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Président

François Rousseau, M.D., M. Sc., FRCPC
Médecin biochimiste, CHU de Québec – Université Laval.

Vice-président

Lambert Busque, M.D., FRCPC
Hématologue, CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal.

Membres

Lorraine Caron, Ph. D.
Consultante en éthique

Guy Fink, Ph. D.
Biochimiste clinique, CIUSSS de l'Estrie-Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke.

Louis Gaboury, M.D., Ph. D., FRCPC
Anatomo-pathologiste, Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

David Rosenblatt, M.D., FRCPC
Pédiatre, généticien, Centre universitaire de santé McGill.

Cédric Yansouni, M.D., FRCPC, DTM&H
Microbiologiste infectiologue, Centre universitaire de santé McGill.

Membre citoyen

Suzanne K.Bédard

SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS

Titre des analyses	Recommandation de l'INESSS
Dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS	Introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> .
Génotypage du virus du papillome humain (VPH) par Linear Array ^{MC}	Refus d'introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i>
Panel sclérodermie	Introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> .
Séquençage du gène <i>FAH</i> dans la tyrosinémie héréditaire de type 1	Pertinence clinique reconnue
Stratification pronostique des leucémies myéloïdes aiguës par séquençage de nouvelle génération – panel de gènes – ajout du gène <i>ASXL1</i> au panel	Introduction de l'analyse au <i>Répertoire</i> (ajout du gène au panel)

LISTE DES ANALYSES

DOSAGE DES PURINES ET PYRIMIDINES URINAIRES PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE°– 2018.01.003P)	1
GÉNOTYPAGE DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN (VPH) PAR LINEAR ARRAY ^{MC} (RÉFÉRENCE°– 2018.02.002P)	34
PANEL SCLÉRODERMIE (RÉFÉRENCE°– 2018.01.004).....	67
SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>FAH</i> DANS LA TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE DE TYPE 1 (RÉFÉRENCE°– 2018.02.001).....	86
STRATIFICATION PRONOSTIQUE DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES AIGUËS PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION–PANEL DE GÈNES – AJOUT DU GÈNE <i>ASXL1</i> (RÉFÉRENCE°–°2015.01.003)	117

DOSAGE DES PURINES ET PYRIMIDINES URINAIRES PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE°– 2018.01.003P)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

**1.1. Demandeur : CIUSSS de l'Estrie-Centre hospitalier
universitaire de Sherbrooke**

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

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

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

M. Guy Fink et Mme Suzanne Bédard n'ont pas participé aux délibérations et se sont retirés au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

- D^r Amichai Grunbaum, biochimiste médical au CISSS de Laval.

2. RÉSUMÉ

La chromatographie en phase liquide (LC) combinée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet d'identifier un spectre de 30 métabolites grâce à la détection de molécules qui ne pouvaient l'être par le système LC-UV en raison de leur impossibilité à absorber les rayons ultraviolets. Toutefois, la question de savoir quand soupçonner une erreur innée du métabolisme des purines et pyrimidines demeure épineuse. L'analyse des purines et des pyrimidines urinaires devrait être effectuée chez tout patient présentant des symptômes tels que des troubles de développement et de comportement, des problèmes neurologiques, des calculs rénaux et des maladies associées à une déficience immunitaire inexpliquée, entre autres.

Utilité et validité clinique

L'identification d'erreurs innées par LC-MS/MS a permis de confirmer la présence de mutations pathogéniques chez les enfants présentant des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines. De même, une identification des déficits enzymatiques a été effectuée chez des enfants présentant des symptômes neurologiques non spécifiques. La répartition en groupes d'âge a révélé des fluctuations dans l'excrétion de certains métabolites de pyrimidines ou purines. De ce fait, la détection de légères augmentations des produits de dégradation des pyrimidines chez les patients portant des erreurs innées nécessiterait une méthode de sélection quantitative associée à des intervalles de référence établis selon l'âge du patient. La précision, la reproductibilité et le pourcentage de récupération réalisés en utilisant un système LC-MS/MS présentent un atout pour la détection rapide de plusieurs métabolites en une analyse. Il serait néanmoins essentiel que les intervalles de référence pour chaque métabolite soient calculés par chaque laboratoire. La méthode proposée a révélé une performance analytique pour la détection de l'adénosine, de la xanthine et de l'hypoxanthine qui s'est distinguée de celles des études publiées. Toutefois, une sensibilité limitée du LC-MS/MS a été rapportée pour la détection de l'acide orotique.

Impact budgétaire

Le rehaussement technologique de la méthode de dosage des purines et pyrimidines pourrait occasionner une réduction de coûts d'environ 96 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années.

Positions ou orientations d'organisations d'intérêt

Le collège américain de génétique et génomique médicale suggère une analyse des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines à partir de l'acide urique contenu dans le sérum et l'urine des patients atteints de troubles du spectre de l'autisme, tout en émettant des réserves sur la recommandation de l'analyse comme test de routine.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

L'analyse proposée est le dosage des purines et pyrimidines urinaires par le moyen de la chromatographie en phase liquide (LC) combinée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

3.2. Description de la méthode

Chaque échantillon d'urine est dilué dans de l'eau et enrichi avec un mélange de standards internes (ISTD). Les ISTD servent à normaliser les résultats en cas de perte pendant la procédure ou d'effet de matrice¹. Les échantillons dilués sont ensuite injectés sur un système LC-MS/MS pour analyse. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne de type C18. La détection par spectrométrie de masse en tandem implique plusieurs ions (annexe A). La quantification est réalisée par une courbe de calibration à partir de solutions constituées de 30 purines et pyrimidines, ainsi que de la créatinine, toutes dissoutes dans de l'eau. Les concentrations de purines et pyrimidines sont normalisées par la créatinine (information recueillie du document de procédure opérationnelle normalisée fourni par le demandeur).

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Un échantillon d'urine congelé d'au moins 0,5 ml est expédié directement au laboratoire de génétique biochimique du CIUSSS de l'Estrie-CHUS par le laboratoire du centre demandeur. L'échantillon est inscrit au système après réception puis analysé et quantifié. Les résultats sont interprétés, et validés avant leur transmission au médecin requérant.

3.4. Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison.

3.5. Homologation

L'analyse n'est homologuée ni par Santé Canada ni par la FDA. Le centre demandeur est agréé par le Collège canadien des généticiens médicaux (CCGM).

3.6. Valeur pondérée : 15,77

¹ Phénomène caractérisé par la coélution de certains composés des milieux biologiques avec les analytes d'intérêt en altérant leur ionisation [Deville *et al.*, 2013].

4. CONTEXTE

L'analyse portant sur le dosage des purines et pyrimidines par HPLC-UV est déjà inscrite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* (ci-après *Répertoire*). Le présent avis d'évaluation porte sur un rehaussement technologique visant à adapter l'analyse effectuée à une plateforme HPLC-MS/MS.

4.1. Patients ciblés

Patients atteints de maladies rénales et neurodéveloppementales. Le demandeur estime les nouveaux cas de troubles du métabolisme des purines et pyrimidines à environ deux par année au Québec.

Il est toutefois à noter que la grande variabilité de présentations cliniques allant d'une immunodéficience sévère combinée aux symptômes neurologiques ou aux calculs rénaux justifierait l'impossibilité de limiter le dosage des purines et pyrimidines à un groupe de patients restreint [Jurecka, 2009; Duran *et al.*, 1997]. De manière générale, les antécédents familiaux de maladie non diagnostiquée dans la fratrie, de la consanguinité parentale ou encore une mort néonatale inexpliquée sont des indicateurs d'un éventuel trouble métabolique d'origine génétique [Cyr *et al.*, 2002]. L'utilisation d'un système HPLC-MS/MS serait également adéquate pour assurer le suivi de la quantité de thymidine excrétée dans l'urine d'un patient atteint de MNGIE² pendant un traitement de dialyse [La Marca *et al.*, 2006b].

4.2. Description de la maladie visée

Les purines et pyrimidines sont des précurseurs de l'ADN et de l'ARN. Leur synthèse, leur recyclage et leur catabolisme requièrent un nombre important de processus métaboliques, tous catalysés par des enzymes différentes [La Marca *et al.*, 2006a]. Un dysfonctionnement dans le métabolisme de purines et de pyrimidines engendre des concentrations anormales de celles-ci ou de leurs métabolites présents dans les fluides biologiques, et ce, en raison d'une diminution ou d'une augmentation des activités enzymatiques [Jurecka, 2009; Van Gennip, 1999]. Les purines et pyrimidines sont détectables dans le plasma, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien. Le liquide biologique de choix pour leur analyse demeure cependant l'urine, compte tenu de sa composition incluant des produits de dégradation générés par l'organisme [Van Gennip, 1999]. Le diagnostic des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines présente un défi à cause des symptômes, généralement variables, non spécifiques et susceptibles d'apparaître à tout âge. De ce fait, les désordres métaboliques des purines et pyrimidines sont souvent sous-diagnostiqués [Sun, 2016; Simmonds *et al.*, 1997].

Plus de 35 types de déficits enzymatiques associés à la synthèse de nucléotides et au métabolisme de purines et pyrimidines ont été repérés, parmi lesquels 17 à 18 pourraient avoir de sérieuses répercussions cliniques [Bakker et Bierau, 2012; Simmonds *et al.*, 1997; Simmonds, 1994]. Certaines affections associées aux anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines et qui pourraient être détectées à partir d'une analyse d'urine sont présentées dans le tableau 1.

² Encéphalopathie mitochondriale neuro-gastro-intestinale, de l'anglais « Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy » (MNGIE).

Tableau 1 Troubles héréditaires associés aux anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines

Déficits enzymatiques	Métabolites	Manifestations cliniques
Adénine Phosphoribosyltransférase (APRT)	Adénine (élevé) 2-8 Dihydroxyadénine (élevé)	Insuffisance rénale grave, Urolithiase
Adénosine déaminase (ADA)	Désoxyadénosine (élevé) Adénosine (parfois élevé)	Immunodéficiência sévère combinée
Purine nucléoside phosphorylase (PNP)	Acide urique (bas) Désoxyinosine (élevé) Désoxyguanosine (élevé) Inosine et Guanosine (élevé)	Retard de développement, immunodéficiência, diplégie, déficit neurologique
Xanthine oxydase (XOD) (XDH, xanthinurie héréditaire)	Xanthine (élevé) Hypoxanthine (élevé) Acide urique (bas)	Crises néonatales, insuffisance rénale, parfois asymptomatique, myopathie, atrophie cérébrale
Cofacteur du molybdène	Hypoxanthine (élevé) Acide urique (bas)	Crises néonatales, épilepsie, déficit neurologique
Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT)	Hypoxanthine (élevé) Acide urique (élevé)	Goutte, calculs urinaires, insuffisance rénale, déficit neurologique, automutilation, syndrome de Lesch-Nyhan
Superactivité de la phosphoribosylpyrophosphate synthétase (PRPS superactivité)	Urique (élevé) Hypoxanthine (élevé)	Néphropathie, arthrite goutteuse, déficit neurologique, dysmorphie, surdité
Adénylosuccinase (adénylosuccinate lyase)	Succinyladénosine (semi-quantitatif)	Retard psychomoteur, épilepsie, autisme
Uridine monophosphate synthase (UMPS)	Acide orotique (élevé)	Anémie, retard de croissance, immunodéficiência
Ornithine transcarbamyase (OTC)	Acide orotique (élevé)	Hyperammoniémie, troubles neurologiques
Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD)	Uracile (élevé) Thymine (élevé)	Microcéphalie, épilepsie, autisme, déficit neurologique
Dihydropyrimidinase (DHP)	Dihydrouracile (élevé) Dihydrothymine (élevé)	Microcéphalie
Thymidine phosphorylase (TP) (syndrome MNGIE)	Thymidine, désoxyuridine	Troubles de motricité gastro-intestinale, neuropathie périphérique, ophtalmoplégie externe chronique progressive

Source : tableau modifié et adapté de Bakker et Bierau, 2012; Nyhan, 2005; Cyr *et al.*, 2002.

Abréviation : MNGIE : Encéphalopathie mitochondriale neuro-gastro-intestinale, de l'anglais « Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy » (MNGIE)

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Un total de 50 à 70 tests a été anticipé par année pour le CIUSSS de l'Estrie-CHUS. Une estimation de 650 à 700 tests annuels a été prévue pour l'ensemble du Québec.

La nouvelle analyse nécessitera 5 jours ouvrables et sera réalisée une fois par semaine.

4.4. Données médico administratives

Au Québec, un test au *Répertoire* permet de réaliser le dosage des purines et pyrimidines par HPLC-UV : chromatographie en phase liquide de haute performance, couplée à un détecteur ultra-violet (tableau 2). Le rehaussement technologique permettrait d'utiliser désormais une plate-forme LC combinée à la spectrométrie de masse en tandem pour la détection des purines et pyrimidines (LC-MS/MS).

Tableau 2 Volumétrie de l'analyse par LC-UV du *Répertoire* (code 50605)

Année administrative	Valeur pondérée	Nombre d'analyses	Total (\$)
2015-2016*	63	636	40 068
2016-2017†	63	697	43 911

Source : données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS).

* : Les tests ont été effectués par le CHU de Québec-Université Laval (n = 1) et le CIUSSS de l'Estrie – CHU de Sherbrooke (n = 635).

† : Les tests ont été effectués par le CIUSSS de l'Estrie – CHU de Sherbrooke.

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

Le transfert de l'analyse des purines et pyrimidines par HPLC-UV vers un système HPLC-MS/MS comporte, selon le demandeur, les avantages suivants :

- ✓ Obtenir une meilleure sensibilité, spécificité, exactitude et reproductibilité pour le dosage de chaque métabolite inclus dans le profil;
- ✓ Éviter plusieurs interférences potentiellement causées par la prise d'un traitement ou d'un régime alimentaire spécifique du patient;
- ✓ Augmenter de 15 métabolites la capacité du test en permettant d'identifier un spectre plus large de maladies héréditaires associées au métabolisme des purines et pyrimidines, grâce à l'analyse de 30 métabolites au total.

4.6. Assurance qualité

Le demandeur participe aux deux programmes européens d'assurance qualité externe suivants :

- ✓ Le « ERNDIM³ Diagnostic Proficiency Testing », évaluant la performance analytique et l'expertise dans l'interprétation des données des laboratoires;
- ✓ Le « ERNDIM Urine Purines and Pyrimidines Scheme », qui assure la comparaison entre les résultats générés pour l'analyse des purines et pyrimidines dans différents laboratoires, en se référant aux valeurs médianes et aux données ciblées⁴. Le demandeur a mentionné la participation continue du laboratoire à ce programme (voir annexe B).

5. DONNÉES PROBANTES

5.1. Valeur diagnostique

La valeur diagnostique sera appuyée par des études cliniques dont l'objectif était d'établir ou de confirmer un diagnostic en utilisant les valeurs de référence des métabolites recherchés. Cette section décrit trois études pour lesquelles la technique HPLC-MS/MS ou RP-HPLC-ESI-MS/MS⁵ est utilisée pour établir ou confirmer un diagnostic [Mamedov *et al.*, 2017; La Marca *et al.*, 2006b; Schmidt *et al.*, 2005].

Les valeurs de références des métabolites de purines et pyrimidines et leur pertinence diagnostique.

Mamedov et ses collaborateurs [2017] ont réalisé une étude dans le but d'établir des valeurs référentielles permettant de poser un diagnostic à l'aide d'un système HPLC-MS/MS. Les échantillons d'urine sont prélevés chez 42 enfants hospitalisés et susceptibles de présenter des anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines. Le groupe contrôle comptait les enfants dont l'absence de maladies métaboliques héréditaires avait été vérifiée. L'analyse du chromatogramme a révélé un pic dominant illustrant la présence d'un métabolite chez l'enfant malade tandis qu'il était inexistant chez l'enfant sain.

Les intervalles de référence de chaque métabolite urinaire n'ont pas révélé de différences majeures dans les concentrations mesurées chez les trois groupes d'âge, dont 3 à 23 mois, 2 à 8 ans et 9 à 17 ans. Les valeurs n'ont changé que pour l'adénine et la xanthine, avec des différences négligeables inférieures à 5 % entre les deux groupes plus jeunes.

Par ailleurs, les diagnostics présentés dans le tableau 3 ont été posés en utilisant les résultats produits à partir d'une méthode non spécifiée, et les tests génétiques pour confirmer la présence de mutations pathogéniques le cas échéant.

³ European Research Network for evaluation and improvement of screening, diagnosis and treatment of inherited disorders of Metabolism.

⁴ ERNDIM. Purines and Pyrimidines in Urine [site Web], disponible à : <http://cms.erndimqa.nl/Home/Purines-and-Pyrimidines-in-Urine.aspx> (consulté le 29 août 2018).

⁵ RP-HPLC-ESI-MS/MS chromatographie en phase liquide inverse à haute performance (RP-HPLC) combinée à l'électrobulbion (ESI) et à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Des 42 enfants, 18 portaient des anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines (tableau 3).

Tableau 3 Diagnostic et caractéristiques des patients portant des anomalies métaboliques de purines et pyrimidines

Nombre de patients (total : n = 18)	Affections	Métabolites	Concentrations (mmol/mol de créatinine)
2	Déficits en DPD	Uracile	325 et 228
3	Déficit en DHP	Dihydrouracile	189, 202, et 263
		Thymine	12 à 23
		Uracile	36, 82
3	Syndrome de Lesch-Nyhan	Acide urique	958, 1 325, et 1 411
1	Hyperactivité de PRPS type 1	Xanthine	64
3	Xanthinurie héréditaire, XOR	Xanthine	44, 58 à 98
2	Déficit en PNP	Inosine	15 et 29
		Guanosine	23 et 39
		Désoxyguanosine	24 et 26
4	Acidurie orotique héréditaire	Acide orotique	Augmentation prononcée 380 à 1 540

Source : Mamedov *et al.*, 2017.

Abréviations : DPD : Dihydropyrimidine déshydrogénase, DHP : Dihydropyrimidinase, PNP : Purine-nucléosyle-phosphorylase, PRPS : Phosphoribosyl pyrophosphate synthase, XOR : Xanthine oxydoréductase.

Les auteurs ont rapporté des incohérences entre les intervalles de référence indiqués par une étude rétrospective et leurs calculs en ce qui concerne la Xanthine, l'uracile, la thymine, l'acide orotique et le dihydrouracile. Leurs limites supérieures pour ces métabolites étaient 1,5 à 5 fois plus élevées que celles de valeurs de référence calculées dans cette étude.

La différence observée dans les échantillons venant de patients contribuerait selon les auteurs aux incohérences entre les valeurs référentielles des laboratoires. Ils recommandent donc que chaque laboratoire établisse ses propres intervalles de référence pour l'analyse des marqueurs de maladies métaboliques héréditaires. Les résultats obtenus ont révélé l'importance pour les laboratoires de scruter davantage les métabolites ayant des concentrations pathologiques très étendues, afin d'établir des diagnostics d'erreurs innées du métabolisme des purines et pyrimidines [Mamedov *et al.*, 2017].

Détection des pyrimidines urinaires et leurs produits de dégradation chez des patients atteints de troubles neurologiques non spécifiques

Dans une étude observationnelle de Schmidt et ses collaborateurs [2005], les produits de dégradation des pyrimidines ont été recherchés par RP-HPLC-ESI-MS/MS (chromatographie en phase inversée) chez les patients atteints de différents troubles neurologiques non spécifiques, d'un retard de croissance ou de malformations physiques. Les métabolites détectés étaient notamment : le dihydrouracile (DHU), la dihydrothymine (DHT), β -uréidopropionate (β -UP), β -uréidoisobutyrate (β -UIB), β -alanine (β -ALA), β -aminoisobutyrate (β -AIB).

Une comparaison entre deux cohortes d'enfants du même groupe d'âge (nouveau-nés à 18 ans) malades (n = 450) ou sains (n = 200) a révélé des différences significatives dans l'excrétion de trois métabolites. La thymine avait une concentration moins élevée chez les patients que chez les sujets sains (p = 0,002). Tandis que la concentration de DHU était plus élevée chez les patients (p = 0,0065). Les différences observées entre les autres métabolites détectés chez les deux groupes n'étaient pas significatives [Schmidt *et al.*, 2005].

Parmi les 17 patients présentant une excrétion urinaire élevée de pyrimidines ou autres métabolites, une déficience en dihydropyrimidine déshydrogénase a été rapportée chez un garçon et une fillette qui avaient des taux d'uracile et de thymine pathologiquement élevés (tableau 6). Les valeurs anormales d'uracile et de thymine du garçon culminaient spécifiquement pendant les périodes d'infections combinées à des crises épileptiques, puis redevenaient normales pendant la rémission du patient [Schmidt *et al.*, 2005].

Tableau 4 Déficience et symptômes des patients atteints d'affections neurologiques

Nombre de patients (total : n = 17)	Déficits enzymatiques (métabolites)	Concentration de métabolites ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ créatinine)	Présentations cliniques
1 (fille de 3 ans)	DPD présence de mutation DPYD*2A (uracile et thymine élevés)	Uracile : 269 Thymine 387	Crises d'épilepsie toniques, développement psychomoteur normal
1 (garçon de 4 ans)	DPD (uracile et thymine élevés)	Uracile : 440 Thymine : 400	Crises d'épilepsie tonico-clonique pendant des épisodes de fièvre et infection accompagnée de régression de la réactivité, perte de motricité, retard du langage
1 (garçon de 6 ans)	OTC (uracile, DHU et β -UP élevés)	Uracile : 275, 1314 DHU : 24, 194 β -UP : 36, 261	Épisodes récurrents de vomissements, conscience réduite
1 (fille de 9 ans)			Retard psychomoteur, rétinite pigmentaire, nystagmus, épisodes récurrents d'hyperammoniémie, hépatosplénomégalie
9 (patients traités à la vigabatrine*)	GABA transaminase (β -ALA élevé)	β -ALA (136 à 511)	Non rapportée
4	D- β -AIB-pyruvate aminotransférase (β -AIB élevé)	β -AIB (430 à 1138)	Probablement aucune manifestation clinique

Source : Schmidt *et al.*, 2005.

Abréviations : β -aminoisobutyrate (β -AIB), β -alanine (β -ALA), la dihydrothymine (DHT), le dihydrouracile (DHU), GABA : l'acide γ -aminobutyrique, OTC : Ornithine transcarbamylase, β -uréidoisobutyrate (β -UIB), β -uréidopropionate (β -UP),

* la vigabatrine est un inhibiteur irréversible de la GABA transaminase.

Une stratification des enfants des groupes patients et témoins en tranches d'âges de 0 à 1 an (n = 143 patients, 56 témoins), de 2 à 5 ans (n = 151 patients, 61 témoins), de 6 à 10 ans (n = 99 patients, 54 témoins) et de 11 à 18 ans (n = 57 patients, 29 témoins) a montré qu'avec l'augmentation d'âge, une diminution de l'excrétion des pyrimidines comparativement à celle de la créatinine a été observée. Par ailleurs, malgré les différents groupes d'âge, les quantités de thymine, d'uracile et leurs produits de dégradation demeuraient inchangés, lorsque l'excrétion de la créatinine passait de 3,2 $\mu\text{mol}/\text{l}$ dans la première année à 8,4 $\mu\text{mol}/\text{l}$ de 11 à 18 ans [Schmidt *et al.*, 2005].

Une comparaison entre les quantités de produits de dégradation des pyrimidines des patients et celles des contrôles a révélé que l'excrétion de la thymine dans les contrôles était plus élevée, tandis que l'uracile, β -UP, β -UIB, β -ALA et β -AIB était à concentration égale dans les deux groupes.

Les auteurs mentionnent la détection de légères augmentations des catabolites chez le patient portant des anomalies du métabolisme de pyrimidines. De ce fait, les catabolites nécessitent une méthode de sélection quantitative associée à des intervalles de références établis selon l'âge du patient. Ils recommandent d'associer l'excrétion des métabolites de pyrimidines à la concentration urinaire de créatinine qui faciliterait la distinction entre les valeurs normales et pathologiques de ces métabolites. Les déficiences en dihydropyrimidine déshydrogénase et en dihydropyrimidinase ont été découvertes chez les individus asymptomatiques [Schmidt *et al.*, 2005].

5.2. Valeur pronostique

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

5.3. Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de permettre le choix ou la modification d'un traitement.

5.4. Validité analytique

La performance analytique de la méthode LC-MS/MS est étayée dans cette section à travers 4 études de validation utilisant une plate-forme HPLC-ESI-MS/MS [Hartmann *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2006a; Schmidt *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2000].

Utilisation d'un système LC-MS/MS de routine pour la détection des anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines en une analyse

L'objectif de l'étude de La Marca et ses collaborateurs [2006a] et de celle de Hartmann et ses collaborateurs [2006] était de développer un système d'analyse permettant de regrouper la détection de tous les composés chimiques impliqués dans le métabolisme des purines et pyrimidines et excrétés dans l'urine.

Valeurs de référence des différents métabolites

Les échantillons prélevés de 100 contrôles sains ont servi à établir des valeurs de référence pour purines et pyrimidines à partir d'un groupe de 80 individus de 1 à 40 ans et un autre de 20 enfants âgés d'un an ou moins [La Marca *et al.*, 2006a]. Les métabolites dont les valeurs de référence variaient entre les groupes d'âge ont été inscrits en caractères gras (Tableaux 5 et 6).

Tableau 5 Intervalles de référence de purines basés sur un intervalle de confiance de 97 % de la moyenne (µmol/mmol de créatinine)

Purines	Intervalle de référence (n = 80) 1 an – 40 ans	Intervalle de référence (n = 20) 1 an et moins
Adénine	3 – 11,9	5,5 – 14,9
Adénosine	0,6 – 1,9	0,6 – 1,9
2-Désoxyadénosine	0,6 – 1,9	0,6 – 1,9
Succinyladénosine	3,9 – 20,7	3,9 – 20,7
Xanthine	3,8 – 10,9	9 – 24,5
Hypoxanthine	2 – 16,1	8 – 29,5
Guanosine	0,6 – 1,8	0,6 - 1,8
Guanine	0,6 – 4,9	0,6 – 4,9
Inosine	2,3 – 3,8	5 – 7,7
2-Désoxyinosine	0,6 – 1,9	0,6 – 1,9
Acide urique	89 - 491	349 - 698
AICAr	0,6 - 3	0,6 - 3

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Abréviations : AICAr : Aminoimidazole-4-carboxamide riboside

Tableau 6 Intervalles de référence de pyrimidines basés sur un intervalle de confiance de 97 % de la moyenne (µmol/mmol de créatinine)

Pyrimidines	Intervalle de référence (n = 80) 1 an – 40 ans	Intervalle de référence (n = 20) 1 an et moins
Acide orotique	Non rapportée	Non rapportée
Uracile	8 – 14,9	8,5 – 18,9
5-Hydroxymethyluracile	n.d.	n.d.
Dihydrouracile	n.d.	n.d.
Pseudouridine	< 1	< 1
2-Désoxyuridine	0,6 – 0,8	0,6 – 0,8
Uridine	0,6 – 9,6	1,8 – 14,2
Thymine	11 – 12,5	11 – 12,5
Dihydrothymine	n.d.	n.d.
Thymidine	1,1 – 1,9	1,1 – 1,9
β - Alanine	0,1 – 0,5	0,1 – 0,5
Acide β - Aminoisobutyrique	0,1 -10	1 – 1,7
Cytosine	0,6 - 0,8	1 – 2,4
Cytidine	0,1 – 1,2	0,1 – 1,2
Uréidopropionate	0,3 – 2,6	0,3 – 2,6

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Abréviations : n.d. : non détectable

Les intervalles de références de certains métabolites notamment, l'adénine, la xanthine, l'hypoxanthine, l'inosine, l'acide urique, l'uracile, l'uridine, la cytosine et l'acide β -aminoisobutyrique, dépendaient de l'âge des individus servant de témoins dans les deux études (Tableaux 5 et 6). Par ailleurs, 77 témoins ont servi à établir des intervalles de références utilisées par Hartmann et ses collaborateurs [2006]. Ils variaient également en fonction des groupes d'âge pour l'uracile la xanthine, l'hypoxanthine et la pseudouridine, contrairement à la guanosine ou à l'acide urique dont les intervalles ne changeaient pas. Les métabolites dont les valeurs variaient en fonction du groupe d'âge sont inscrits en caractères gras dans le tableau 7.

Tableau 7 Intervalles de référence des purines et pyrimidines basés sur un intervalle de confiance de 95 % de la moyenne (mmol/mol de créatinine)

Pyrimidines	Intervalles de référence (n, âge)	Purines	Intervalles de référence (n, âge)
Acide orotique	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Adénine	8 – 9 (n = 77, 0 à 18 ans)
Uracile	8 – 20 (n = 21, ≤ 4 ans) 6 – 10 (n = 48, >4 ans)	Xanthine	10 – 34 (n = 17, ≤ 1 an) 9 – 14 (n = 60, >1 an)
Thymine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Hypoxanthine	7 – 34 (n = 17, ≤ 1 an) 7 – 13 (n = 60, >1 an)
Dihydrouracile	<100 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Inosine	<6 (n = 17, ≤ 1 an)* <2 (n = 59, >1 an)[†]
Dihydrothymine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	2-Désoxyinosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
N-Carbamyl-β-alanine	< 19 (n = 25, ≤ 4 ans)* < 10 (n = 51, >4 ans)	Adénosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
Acide N-Carbamyl-β-aminoisobutyrique	< 17 (n = 17, ≤ 1 an)* < 10 (n = 60, >1 an)[†]	2-Désoxyadenosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
Pseudouridine	64 – 145 (n = 17, ≤ 1 an) 21 – 31 (n = 60, >1 an)	Guanosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
Uridine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	2-Désoxyguanosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
2-Désoxyuridine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Acide urique	443 – 695 (n = 76, 0 à 18 ans)
5-Hydroxyméthyluracile	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	2,8-Dihydroxyadénine	n.d. (n = 77, 0 à 18 ans)
Thymidine	n. d. (n = 77, 0 à 18 ans)	Succinyladénosine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]

Source : tableau adapté de Hartmann *et al.*, 2006.

Abréviations : n.d. : non détectable.

* : la limite supérieure de l'intervalle de référence a été définie par la concentration maximale mesurée.

[†] : La limite supérieure de l'intervalle de référence a été définie par la limite inférieure de quantification.

Précision et reproductibilité de la détection de métabolites des purines et pyrimidines et leur pourcentage de récupération par LC-MS/MS

Les études de La Marca [2006a] et Hartmann [2006] ont révélé des résultats issus des tests de précision et de reproductibilité lors de la détection de métabolites de purines et de pyrimidines. La Marca et ses collaborateurs ont rapporté un coefficient de variation intra journalier variant de 0,1 à 9,8 % pour les six répétitions effectuées sur urine non fortifiée et à basse concentration de créatinine, tandis qu'il variait de 1,6 à 14,1 % pour les mesures inter journalières (données non présentées). La précision a également été évaluée sur urine enrichie avec 12,5 µmol/l du métabolite ciblé (tableau 8). Le pourcentage de récupération variait de 99,38 à 100,58 % (tableau 8).

Tableau 8 Reproductibilité de l'analyse effectuée avec des échantillons urinaires fortifiés et à basse concentration de créatinine (0,88 mmol/l)

Métabolite	Concentration moyenne (µM)	Précision intra journalière (%)	Précision inter journalière (%)	Taux de récupération (%)
Uracile	18,7	1,6	3,5	99,62
Cytosine	14,0	1,2	2,5	99,92
Thymine	22,4	0,6	0,9	99,81
Adénine	15,2	0,2	1,9	100,58
Guanine	15,6	0,4	0,6	100,16
Uridine	19,7	0,7	1,3	100,31
Cytidine	13,6	0,5	1,0	99,84
Thymidine	14,3	0,4	0,6	99,48
Adénosine	13,2	0,4	0,4	99,89
Guanosine	13,8	0,7	1,0	99,71
Désoxyguanosine	13,7	0,7	1,0	99,87
Désoxyadénosine	14,1	0,8	1,6	99,38
Désoxyinosine	14,1	1,3	1,9	99,73
Inosine	14,4	0,3	0,4	99,93
Acide orotique	13,7	0,6	1,3	99,97

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Les auteurs ont aussi rapporté un coefficient de variation intra journalier variant de 0,5 à 17,2 % pour les six répétitions effectuées sur urine non fortifiée et à haute concentration de créatinine, tandis qu'il variait de 1,5 à 29,0 % pour les mesures inter journalières (données non présentées) [La Marca *et al.*, 2006a]. La précision a également été évaluée sur urine enrichie avec 12,5 µmol/l du métabolite ciblé (tableau 9). Le pourcentage de récupération variait de 99,01 à 101,46 % (tableau 9).

Tableau 9 Reproductibilité de l'analyse effectuée avec des échantillons urinaires fortifiés et à haute concentration de créatinine (4,36 mmol/l)

Métabolite	Concentration moyenne (µM)	Précision intra journalière (%)	Précision inter journalière (%)	Taux de récupération (%)
Uracile	31,5	0,1	0,5	99,83
Cytosine	16,2	0,6	0,7	100,03
Thymine	18,9	1,5	1,6	100,51
Adénine	15,1	1,9	4,0	101,46
Guanine	15,4	1,4	2,8	100,04
Uridine	19,2	1,0	1,9	99,84
Cytidine	13,7	1,0	1,9	100,04
Thymidine	13,9	3,0	6,8	99,72
Adénosine	19,6	0,6	1,2	99,27
Guanosine	13,6	0,2	0,8	100,22
Désoxyguanosine	13,3	0,6	1,1	100,01
Désoxyadénosine	13,5	2,3	4,1	99,01
Désoxyinosine	14,1	1,1	1,4	99,92
Inosine	14,1	1,6	3,7	99,33
Acide orotique	15,7	1,2	1,7	100,21

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Selon Hartmann et ses collaborateurs, le coefficient de variation (CV) des analyses effectuées dans la même journée à partir de l'urine enrichie avec les différents métabolites oscillait entre 7 et 24 % pour les 24 métabolites analysés. Des CV de 7 à 25 % ont été rapportés pour les tests effectués à des journées différentes. La moyenne des taux de récupération fluctuait de 85 % à 123 %, à l'exception des purines 2-désoxyinosine et 2-désoxyadenosine et de la thymidine dont les valeurs étaient respectivement de 133 %, 128 % et 128 %. De même, les CV calculés sur les taux de récupération allaient de 9 % à 24 % pour tous les métabolites, à l'exception de l'hypoxanthine, la thymine et la thymidine dont les CV respectifs étaient 34 %, 28 % et 33 % [Hartmann *et al.*, 2006].

Limites de détection et de quantification des métabolites par LC-MS/MS

Les limites de détection (intervalle : 0,1 à 10 µM) et de quantification (intervalle : 0,2 à 15 µmol/l) de 15 métabolites sont présentées dans le tableau 10. La limite de quantification a été fixée à plus de 5 fois la valeur du témoin, tandis que celle de détection s'élevait à plus de 3 fois cette valeur.

Tableau 10 Limite de quantification (LOQ) et de détection (LOD) des métabolites de purines et pyrimidines

Métabolite	Standard interne*	LOQ (µMOL/L)	LOD (µMOL/L)
Uracile	¹⁵ N ₂ -Uracile	11	7,5
Cytosine	¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₃ -Cytosine	0,5	0,33
Thymine	² H ₄ -Thymine	15	10
Adénine	¹³ C-Adénine	3,3	1,65
Guanine	¹³ C-Adénine	0,5	0,33
Uridine	Rib-1- ¹³ C-Uridine	0,5	0,33
Thymidine	Me- ¹³ C-Thymidine	1,5	1
Adénosine	Rib-1- ¹³ C-Adénosine	0,5	0,25
Guanosine	¹⁵ N ₄ -Guanosine	0,5	0,33
Xanthine	¹³ C- ¹⁵ N ₂ -Xanthine	3,3	2,5
Hypoxanthine	¹³ C- ¹⁵ N ₂ -Xanthine	0,5	0,33
Désoxyguanosine	² H ₂ -Désoxyguanosine	0,5	0,33
Désoxyguanosine	¹³ C ₅ -Désoxyadenosine	0,5	0,33
Inosine	¹⁵ N ₄ -Inosine	2	1
Acide orotique	¹⁵ N ₂ -acide orotique	0,2	0,1

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

*: les contrôles internes sont constitués des isotopes des différents métabolites à détecter.

Hartmann et ses collaborateurs ont utilisé huit standards internes pour quantifier et déterminer les limites de détection de 24 métabolites des purines et des pyrimidines. Les données recueillies étaient toutefois comparables à celles générées par d'autres méthodes [Hartmann *et al.*, 2006].

L'utilisation d'échantillons prélevés chez les patients dont les diagnostics ont été préalablement confirmés a révélé la capacité de l'analyse à déceler différentes erreurs innées du métabolisme des purines et pyrimidines, notamment :

- ✓ La superactivité de la phosphoribosylpyrophosphate synthétase (PRPS),
- ✓ Le syndrome de Lesch-Nyhan,
- ✓ La déficience en adénosine déaminase (ADA),
- ✓ La déficience en adénine phosphoribosyltransférase (APRT),
- ✓ L'acidurie orotique héréditaire,
- ✓ MNGIE,
- ✓ La déficience en ornithine transcarbamylase [Hartmann *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2006a].

Les auteurs soulignent l'absence de certains standards internes qui pourraient amener à un changement de protocole. Toutefois, la robustesse, la sensibilité et la spécificité de la technologie LC-MS/MS ont permis de détecter plusieurs métabolites des purines et pyrimidines en une analyse unique de 17 minutes. Les auteurs mentionnent que cette méthode est adéquate à l'utilisation de routine dans les laboratoires cliniques [La Marca *et al.*, 2006a]. De plus, Hartmann et ses collaborateurs concluent en soulignant la rapidité, la spécificité et la fiabilité des détections réalisées avec cette technologie. Ils considèrent le système LC-MS/MS utile pour émettre des diagnostics justes de différents déficits enzymatiques [Hartmann *et al.*, 2006].

Détection des produits de dégradation de pyrimidines à partir d'échantillons d'urine pour la recherche d'erreurs innées du métabolisme

Dans l'étude de Schmidt et ses collaborateurs [2005], précédemment décrite, l'uracile, la thymine ainsi que leurs produits de dégradation présents dans l'urine ont été quantifiés à l'aide d'une plate-forme HPLC-MS/MS en utilisant des isotopes stables comme contrôles internes pour marquer les composés de référence. La variation a été évaluée en détectant, 10 fois dans la même journée, les métabolites de l'urine normale ou de l'urine contenant de la créatinine et enrichie par des composés synthétiques à évaluer (100 $\mu\text{mol/l}$). Par ailleurs, la variation entre les tests a été calculée en mesurant les mêmes échantillons pendant 5 semaines consécutives. Les taux de récupération n'ont toutefois pas été rapportés. Les coefficients de variation sont rapportés dans le tableau 11.

Tableau 11 Coefficients de variation des mesures effectuées avec l'urine normale ou fortifiée

Métabolite	Urine normale CV (%)		Urine fortifiée CV (%)	
	Inter journalière	Intra journalière	Inter journalière	Intra journalière
Thymine	19,1	5,2	4,0	4,3
Uracile	9,1	11,5	2,6	3,1
DHT	13,4	12,4	5,3	3,9
DHU	10,2	8,3	2,6	2,9
β -UIB	25,5	20,9	4,7	1,4
β -UP	6,6	10,3	3,6	3,3
β -ALA	18,5	18,3	2,8	2,6
β -AIB	7,0	2,5	4,3	3,2

Source : tableau adapté de Schmidt *et al.*, 2005.

Abréviations : β -AIB : β -aminoisobutyrate, β -ALA : β -alanine, DHT : Dihydrothymine, DHU : Dihydrouracile, β -UIB : β -uréidobutyrate, β -UP : β -uréidopropionate

Les variations les plus importantes ont été observées dans la détection de la thymine, de β -UIB et de β -ALA.

Les auteurs recommandent l'analyse quantitative des métabolites des pyrimidines comme outil diagnostique chez les enfants atteints de symptômes neurologiques non expliqués, y compris des convulsions épileptiques et un retard psychomoteur [Schmidt *et al.*, 2005].

Utilisation du système HPLC-ESI-MS/MS pour la détection de 17 métabolites à partir d'échantillons d'urine liquide ou asséchée sur du papier-filtre

Ito et ses collaborateurs [2000] ont comparé la détection des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines à partir de deux types d'échantillons, notamment l'urine liquide ou l'urine absorbée par un papier filtre. La reproductibilité et le pourcentage de récupération ont été évalués en mesurant 9 échantillons d'urine liquide et 10 sur papier filtre en duplicata, avec ou sans ajout de contrôles internes.

Le pourcentage de récupération évalué à partir d'échantillons d'urine liquide variait de 96 à 107 %, à l'exception de celui de l'hypoxanthine et de la xanthine, qui était respectivement de 64 % et 79 %. Les récupérations effectuées à partir d'échantillons d'urine absorbée sur papier-filtre s'élevaient de 89 à 108 % pour une concentration de 10 μ mol/l par métabolite ajouté et de 91 à 101 % pour 100 μ mol/l à l'exception de l'hypoxanthine, la xanthine et le 5-hydroxyméthyluracile dont les pourcentages de récupération étaient respectivement de 65 %, 77 % et 80 %. Les coefficients de variation étaient similaires pour chaque métabolite (≤ 12), et ce, pour chaque type d'échantillon [Ito *et al.*, 2000]. Les deux types d'échantillons d'urine de concentration moyenne de

créatinine ont été analysés en duplicata, dont $5,6 \pm 5,5$ mmol/l de créatinine pour l'urine liquide (n = 9) et $6,2 \pm 5,5$ mmol/l pour les échantillons sur papier-filtre (n = 10). L'efficacité d'extraction de différents composés à partir d'échantillon d'urine absorbée était de 88 à 103 %, avec un coefficient de variation de 0,7 à 2,2 %. Les moyennes de pourcentage de récupération et les coefficients de variation des métabolites analysés sont rapportés dans le tableau 12.

Tableau 12 Récupérations moyennes des métabolites ajoutés à des échantillons d'urine liquide ou absorbée sur papier-filtre

Métabolites	Type d'urine	Concentration ajoutée (μmol/l)	Récupération récupérée (%)	CV(%)
Uracile	liquide	78,2	99	4,1
	PF	92,0	100	4,8
Thymine	liquide	78,2	100	8,2
	PF	92,0	100	2,3
Adénine	liquide	78,2	102	3,2
	PF	92,0	97	6,9
Hypoxanthine	liquide	77,4	105	13,0
	PF	91,0	103	12,0
5-hydroxyméthyl uracile	liquide	78,2	88	7,8
	PF	92,0	95	3,7
Xanthine	liquide	83,3	98	13,0
	PF	98,0	87	8,7
Acide orotique	liquide	82,5	93	2,9
	PF	97,0	98	6,2
Thymidine	liquide	87,6	92	1,6
	PF	103,0	90	1,6
Uridine	liquide	77,4	98	4,8
	PF	91,0	96	4,3
Pseudouridine	liquide	87,6	92	8,6
	PF	103,0	91	11,0

Source : tableau adapté de Ito *et al.*, 2000.

Abréviations : CV : Coefficient de variation; PF : Urine absorbée sur papier-filtre.

Tableau 12 Reproductibilité et taux de récupération des échantillons d'urine liquide ou absorbée sur papier-filtre (suite)

Métabolites	Type d'urine	Concentration ajoutée (µmol/l)	Concentration récupérée (%)	CV (%)
Désoxyadénosine	liquide	61,2	101	9,2
	PF	72,0	100	7,0
Désoxyinosine	liquide	57,0	98	5,1
	PF	67,0	90	6,0
Désoxyguanosine	liquide	80,8	102	5,6
	PF	95,0	101	12
Adénosine	liquide	102,0	92	1,8
	PF	120,0	95	2,7
Inosine	Liquide	83,3	99	8,1
	PF	80,0	93	7,8
Guanosine	Liquide	84,2	102	13
	PF	99,0	97	6,6
Succinyladénosine	PF	78,5	99	13

Source : tableau adapté de Ito *et al.*, 2000.

Abréviations : CV : Coefficient de variation, PF : Urine absorbée sur papier-filtre.

La linéarité de chaque métabolite était bonne entre 2,5 – 250 µmol/l ($r^2 = 0,984 - 0,999$). Les limites de détection étaient adéquates pour détecter de légères augmentations de concentrations pour différents métabolites (xanthine : 2,5 µmol/l; succinyladénosine : 1,6 µmol/l; uracile, adénine, hypoxanthine, 5-dihydroxyméthyluracile et pseudouridine : 1,0 µmol/l; et 0,5 µmol/l pour les autres métabolites) [Ito *et al.*, 2000].

Les auteurs ont conclu que le système HPLC-ESI MS/MS peut être utilisé pour détecter rapidement les troubles du métabolisme des purines et pyrimidines [Ito *et al.*, 2000].

5.5. Données fournies par le demandeur

Les données de validation de la méthode LC-MS/MS fournies par le demandeur ont été recueillies en analysant des solutions aqueuses dont les concentrations en métabolite sont connues et des échantillons d'urine prélevés chez les patients.

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées par l'analyse en triplicate d'une série de différentes concentrations pour chaque analyte. Les concentrations testées étaient de 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1 000, et 3 000 nmol/l pour toutes les molécules en dehors de l'acide urique et de la créatinine. Compte tenu de leurs concentrations physiologiques plus importantes, les concentrations d'acide urique et de créatinine étaient respectivement 10 et 30 fois plus élevées que celles des autres métabolites. Pour chaque molécule, la limite de détection (LOD) présentée dans le tableau 13 correspond à la plus faible concentration testée et donnant un rapport

signal/bruit supérieur à 3. La limite de quantification (LOQ) correspond à la plus faible concentration testée équivalant à un rapport signal/bruit supérieur à 10.

Tableau 13 Limites de détection et de quantification

Métabolites	Limites de détection (nmol/L) N = 3	Limites de quantification (nmol/L) N = 3
Créatinine	<300	<300
Adénine	25	75
2,8-dihydroxyadénine	100	750
Guanine	25	50
Dihydrouracile	500	3 000
β-uréidopropionate	75	500
5-hydroxyméthyluracile	50	500
Uracile	25	250
Acide urique	5 000	30 000
Hypoxanthine	50	250
AICAR	25	25
Dihydroorotate	500	1 000
Xanthine	25	250
β-uréidoisobutyrate	250	1 000
Uridine	25	100
Oxypurinol	75	500
Dihydrothymine	250	750
Adénosine	10	25
Thymine	100	750
2-désoxyadénosine	25	25
Allopurinol	50	250
Orotidine	10	250
2-désoxyuridine	75	250
Acide orotique	250	750
Guanosine	25	50
Inosine	10	25
2-désoxyguanosine	25	50
2-désoxyinosine	25	75
SAICAR	10	75
Thymidine	100	500
N6-succinyladénosine	250	750

Source : données du demandeur.

Les données de linéarité, réplicabilité, répétabilité, recouvrement (ou récupération) et stabilité sont rapportées dans le tableau 14. À titre de contrôle, des fractions d'urine ont été fortifiées avec différentes concentrations de métabolites standards (20, 100, 500 µmol/L). Ces échantillons fortifiés ont été quantifiés à 6 reprises le même jour pour déterminer la réplicabilité et au cours de 5 journées différentes (en duplicata) pour déterminer la répétabilité. Pour chaque analyse, le CV de l'essai est calculé et exprimé en pourcentage. Chaque CV présenté dans le tableau 14 est la moyenne des CVs obtenus avec les trois niveaux de fortification pour un métabolite donné.

Tableau 14 Évaluation de la linéarité, réplicabilité, répétabilité, récupération et stabilité de la méthode LC-MS/MS

Métabolite	Linéarité (r ²) n = 6	Réplicabilité cv (%) n = 18	Répétabilité cv (%) n = 30	Recouvrement (%)		Stabilité : 3 jours à 23°C (%) n = 2
				Intra-jour n = 18	Inter-jour n = 30	
Créatinine	0,99972	3,4	3,0	97,4	99,1	100,6
Adénine	0,99981	3,8	2,4	98,5	99,0	99,2
2,8-dihydroxyadénine	0,99967	3,6	6,1	93,9	94,5	94,1
Guanine	0,99977	5,1	4,3	101,0	99,2	84,7
Dihydrouracile	0,99986	3,0	2,7	99,7	99,2	103,1
β-uréidopropionate	0,99962	3,6	3,1	102,0	102,7	98,3
5-hydroxyméthyluracile	0,99986	3,1	2,4	100,2	99,2	100,4
Uracile	0,99974	2,8	2,6	98,0	98,6	100,4
Acide urique	0,99988	2,1	1,4	99,7	100,1	100,4
Hypoxanthine	0,99989	2,6	1,1	98,4	99,3	93,8
AICAR	0,99967	2,9	4,3	104,9	103,4	102,6
Dihydroorotate	0,99958	4,4	3,3	92,5	97,1	102,6
Xanthine	0,99960	5,1	5,7	98,7	97,7	98,1
β-uréidoisobutyrate	0,99983	5,7	3,7	99,7	98,8	99,3
Uridine	0,99924	2,6	3,7	96,5	98,0	95,7
Oxypurinol	0,99934	4,5	2,3	96,1	98,0	105,3
Dihydrothymine	0,99920	4,2	5,2	98,2	95,7	99,4

Source : données fournies par le demandeur (procédure opérationnelle normalisée).

Abréviations : CV : coefficient de variation

Tableau 14 Évaluation de la linéarité, réplicabilité, répétabilité, récupération et stabilité de la méthode LC-MS/MS (suite)

Métabolite	Linéarité (r ²) n = 6	Réplicabilité cv (%) n = 18	Répétabilité cv (%) n = 30	Recouvrement (%)		Stabilité : 3 jours à 23°C (%) n = 2
				Intra- jour n = 18	Inter- jour n = 30	
Adénosine	0,99937	4,6	4,7	97,8	96,7	104,4
Thymine	0,99923	3,6	3,5	94,4	97,2	102,6
2 désoxyadénosine	0,99984	3,0	3,1	99,3	98,3	100,6
Allopurinol	0,99968	3,3	3,2	98,4	99,1	101,0
Orotidine	0,99970	2,6	1,5	97,8	98,1	107,3
2 désoxyuridine	0,99986	1,5	1,7	97,9	98,1	99,9
Acide orotique	0,99971	2,2	1,4	98,0	100,2	103,0
Guanosine	0,99994	2,0	1,6	99,6	98,8	98,9
Inosine	0,99990	2,1	2,4	99,5	97,8	100,3
2 désoxyguanosine	0,99993	1,7	1,1	97,8	98,2	97,9
2 désoxyinosine	0,99957	1,8	2,7	98,2	100,6	99,2
SAICAR	0,99961	6,2	8,3	112,9	100,4	81,5
Thymidine	0,99967	1,0	1,2	96,6	96,5	100,8
N6-succinyladénosine	0,99971	1,8	3,7	98,8	99,4	98,6

Source : données du demandeur (procédure opérationnelle normalisée). Abréviations : CV : coefficient de variation

Recouvrement : De même, le pourcentage de recouvrement a été calculé en utilisant des échantillons d'urine fortifiée avec différentes concentrations de métabolites standards (20, 100, 500 µmol/l). Ces échantillons ont été quantifiés 6 fois le même jour et au cours de 5 journées différentes (en duplicata). La moyenne des résultats obtenus pour une urine fortifiée est comparée à la concentration théorique (concentration moyenne dans l'urine non fortifiée + la concentration du standard ajouté à cette urine). Le recouvrement a été exprimé en pourcentage. Chaque valeur de recouvrement présentée dans le tableau 14 est la moyenne des recouvrements obtenus avec les trois niveaux de fortification pour un métabolite donné.

L'analyse d'une série d'échantillons cliniques est accompagnée par un contrôle de SKML⁶, qui comporte des solutions aqueuses à concentration déterminée de métabolites. Les résultats obtenus pour les différents métabolites sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 Comparaison entre les résultats de contrôle de qualité d'un laboratoire externe et de celui du demandeur

Métabolite	Valeurs et statistiques fournies par skml		Résultats du demandeur (n = 155)	
	Concentration calculée (IC 95 %) (µmol/l)	Résultats attendus (µmol/l)	Moyenne ± écart-type (µmol/l)	CV%
Créatinine	3,310 (3,2 à 3,4)	2,9 à 3,7	3,249 ± 0,1	2,5
Adénine	28 (26 à 30)	15 à 41	29,7 ± 1,2	4,1
Dihydrouracile	65,1 (57 à 73)	30 à 101	67,4 ± 2,6	3,8
5-hydroxyméthyluracile	49,7 (46 à 53)	31 à 68	56,1 ± 2,0	3,6
Uracile	71,8 (69 à 74)	54 à 90	73,3 ± 2,7	3,7
Acide urique	279 (271 à 287)	233 à 325	277,2 ± 8,7	3,1
Hypoxanthine	116 (112 à 120)	91 à 141	116,8 ± 3,8	3,2
AICAR	52,5 (48 à 57)	32 à 73	52,9 ± 1,9	3,6
Xanthine	95,9 (91 à 101)	60 à 132	98,2 ± 4,5	4,6
Dihydrothymine	70,5 (64 à 77)	44 à 97	69,8 ± 4,0	5,7
Adénosine	34,8 (34 à 36)	26 à 43	34,9 ± 1,7	4,8
Thymine	39,5 (37 à 42)	23 à 56	41,3 ± 2,0	4,7
Désoxyadénosine	38 (36 à 40)	22 à 54	38,1 ± 1,9	4,9
Orotidine	14 (13 à 15)	6 à 22	13,7 ± 0,7	5,5
2 Désoxyuridine	43,1 (41 à 45)	32 à 54	43,5 ± 1,3	3,1
Acide orotique	80 (76 à 84)	51 à 109	81,6 ± 2,7	3,3
Guanosine	56,4 (54 à 58)	43 à 70	55,5 ± 1,5	2,6
Inosine	50 (48 à 52)	37 à 63	49,9 ± 1,6	3,2
2 Désoxyguanosine	37,9 (36 à 40)	24 à 52	36,7 ± 0,9	2,4
2 Désoxyinosine	38,4 (37 à 40)	28 à 49	39,5 ± 2,0	5,0
Thymidine	22,8 (22 à 24)	15 à 31	21,8 ± 0,5	2,3

Source : données du demandeur.

Abréviations : CV : coefficient de variation

Le laboratoire a participé à un contrôle de qualité externe piloté par « European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism » (ERNDIM). Afin d'évaluer la reproductibilité de la méthode développée, le laboratoire demandeur a analysé à l'aveugle 8 échantillons dont les résultats sont comparés à ceux obtenus par d'autres

⁶ SKML sont des contrôles standardisés utilisés lors de la détection des produits du métabolisme des purines et pyrimidines dans l'urine des patients (<https://www.skml.nl/en/home>; distribués par MCA Laboratory, Pays-Bas).

laboratoires. Les résultats obtenus pour 17 analytes surlignés en vert ont été jugés satisfaisants (Annexe B). Le demandeur a rapporté une erreur de retranscription de résultat pour l'analyte AICAR (Annexe B). En dehors des coefficients de variation qui fluctuent entre les laboratoires, la linéarité, le pourcentage de récupération et la moyenne de précision sont comparables.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse permettant le dosage des purines et des pyrimidines urinaires par LC-MS/MS. Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée au tableau 16. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- ✓ L'analyse proposée cible principalement les patients avec suspicion de maladies rénales, neurologiques ou de troubles de développement.
- ✓ L'analyse serait réalisée en remplacement du test permettant de doser les purines et les pyrimidines par HPLC-UV. Ce test figure actuellement au *Répertoire* (code 50605; VP : 63).
- ✓ En 2016-17, le demandeur a effectué 697 analyses des purines et des pyrimidines par HPLC-UV. Environ 95 % de ces analyses sont réalisés pour le Québec. Pour 2017-2018, ce nombre d'analyses était estimé à 650.
- ✓ L'analyse proposée n'a fait l'objet d'aucun envoi hors Québec au cours des dernières années.
- ✓ Ainsi, il est anticipé que 650, 675 et 700 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement.
- ✓ La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 15,77.
- ✓ À la suite de l'introduction de cette analyse au *Répertoire*, aucune modification de la prise en charge des patients n'est anticipée puisqu'il s'agit d'un rehaussement technologique.

Tableau 16 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS.

	An 1	An 2	An 3	Total
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS au <i>Répertoire</i>				
Analyses HPLC-UV	650	675	700	2 025
Coûts	40 950 \$	42 525 \$	44 100 \$	127 575 \$
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS au <i>Répertoire</i>				
Analyses LC-MS/MS	650	675	700	2 025
Coûts	10 250 \$	10 645 \$	11 039 \$	31 934 \$
Impact net	-30 700 \$	-31 880 \$	-33 061 \$	-95 641 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, réduction de coûts la plus élevée			-99 183 \$
	Pour 3 ans, réduction de coûts la plus faible			-92 099 \$

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS au *Répertoire* pourrait générer une réduction de coûts d'environ 96 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

L'utilisation du système LC-MS/MS dans un laboratoire clinique devrait tenir compte des enjeux suivants :

- ✓ **La spécificité et la rapidité de l'intervention** : La technologie LC-MS/MS permet d'analyser environ 30 métabolites en 17 minutes [La Marca *et al.*, 2006a].
- ✓ **L'interprétation des données** : Il est important de noter que l'interprétation des données obtenues pourrait requérir une expertise pointue dans le domaine des cascades biochimiques ainsi qu'une ouverture à découvrir de nouveaux métabolites [Jurecka, 2009].
- ✓ **Le prélèvement d'échantillons d'urine chez les nouveau-nés** : Bien que l'urine représente un milieu adéquat pour la détection des métabolites anormalement produits, la miction pourrait présenter un défi chez les nouveau-nés et les enfants. De ce fait, l'utilisation de papier filtre imbibé d'urine et asséché serait une option de prélèvement d'échantillons à envisager [Ito *et al.*, 2000].
- ✓ **Le transport et la conservation des échantillons** : Le transport et la conservation des échantillons d'urine constitueraient des enjeux qui, à long terme, pourraient affecter les coûts associés à ce type d'analyse [Ito *et al.*, 2000].
- ✓ **La corrélation entre les valeurs de référence et l'âge** : Il est également à noter que les valeurs de référence des différents métabolites pourraient varier en fonction de l'âge du patient [Cyr *et al.*, 2002].

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

En 2013, le collège américain de génétique et génomique médicale a suggéré une analyse des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines à partir de l'acide urique contenu dans le sérum et l'urine des patients atteints de troubles du spectre de l'autisme. Il émet toutefois des réserves concernant une recommandation de l'analyse comme test de routine [Schaefer et Mendelsohn, 2013].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS

La recommandation de l'INESSS

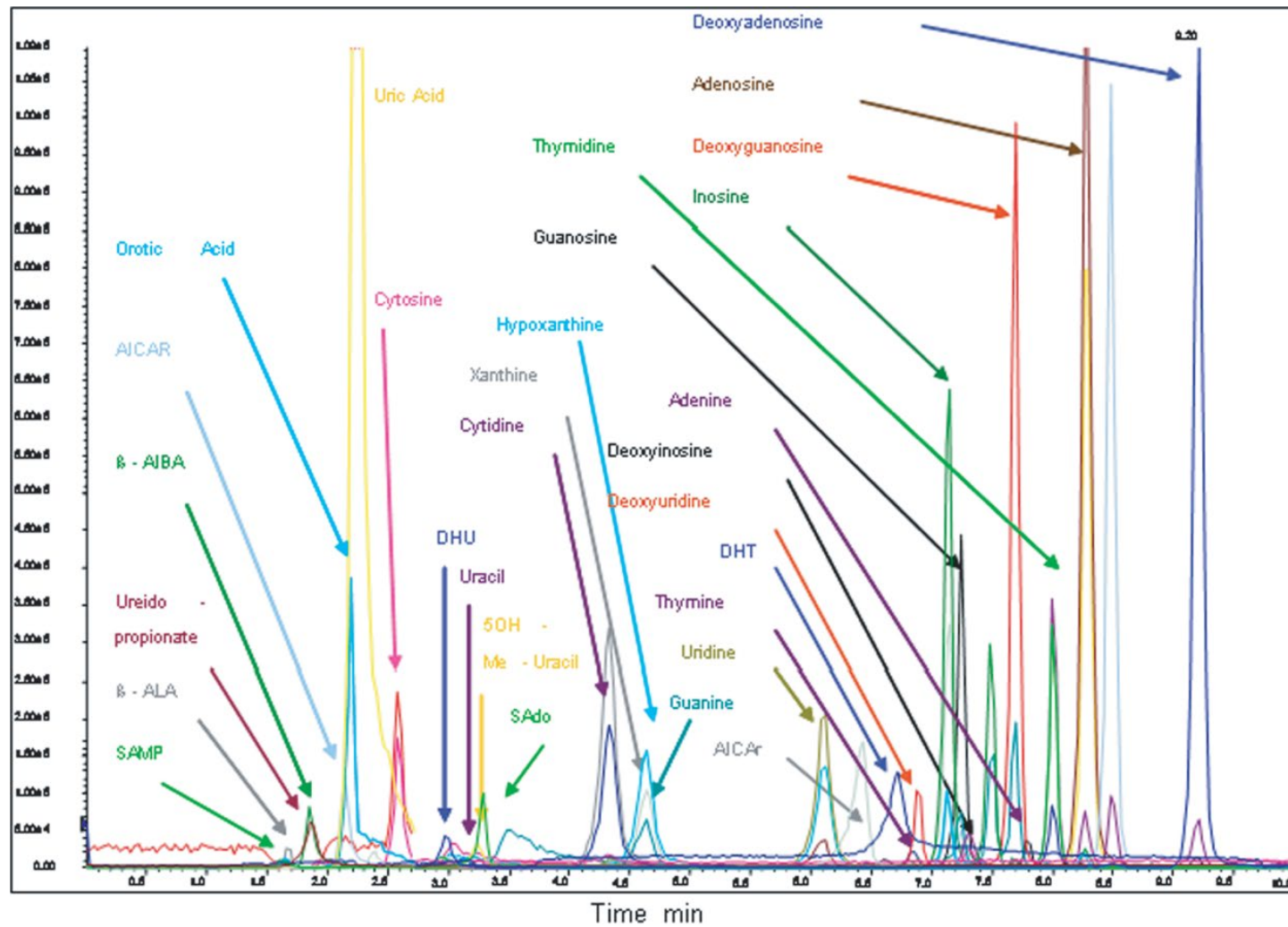
- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Le CSABM recommande que le laboratoire poursuive prospectivement la collecte de données de validation analytique.

ANNEXE A

Chromatogrammes de différents ions extraits d'un mélange standard



Source : La Marca *et al.*, 2006a.

ANNEXE B

Comparaison de performance entre les laboratoires participants au programme externe de contrôle de la qualité, ERNDIM (www.erndimqa.nl)



ERNDIMQA - ANNUAL REPORT

Purines & Pyrimidines 2017

ERN0467 - C.H.U.S - Genetics

Methodset : Puy/Pyr

Analyte	Accuracy (mean)		Precision (CV% duplicates)		Linearity (r)		Recovery (%added analyte)		Data All Labs	
	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	n	Interlab CV
5-OH methyluracil	21.6	19.3	8.1%	15.8%	0.998	0.984	103%	88%	25	20.6%
Adenine	19.5	18.8	1.0%	13.4%	0.997	0.988	91%	88%	37	28.7%
Adenosine	20.8	21.0	1.8%	9.3%	0.999	0.995	96%	97%	42	13.3%
AICAR	22.9	21.5	32.8%	8.3%	0.914	0.996	82%	97%	28	18.4%
Deoxy-adenosine	21.1	19.6	2.1%	9.4%	1.000	0.992	99%	91%	39	22.9%
Deoxy-guanosine	21.4	22.6	3.0%	11.4%	0.999	0.987	100%	100%	37	19.9%
Deoxy-inosine	21.6	20.9	2.9%	11.6%	1.000	0.988	101%	98%	36	17.9%
Deoxy-uridine	20.9	20.0	7.6%	11.0%	0.998	0.991	96%	94%	34	19.2%
Dihydro-thymine	46.8	46.8	10.9%	9.4%	0.996	0.995	89%	92%	17	19.0%
Dihydro-uracil	45.5	47.8	19.0%	12.7%	0.986	0.986	80%	91%	16	22.1%
Guanosine	21.4	21.0	3.2%	11.5%	0.999	0.993	102%	99%	43	18.9%
Hypoxanthine	65.2	65.2	0.5%	9.4%	0.999	0.994	97%	95%	46	11.7%
Inosine	37.0	35.8	2.5%	7.8%	0.999	0.988	98%	95%	42	14.4%
Orotic Acid	37.4	36.9	4.9%	6.6%	0.998	0.995	98%	96%	42	10.5%
Pseudo-uridine		75.9		9.0%		0.988		96%	24	10.5%
Thymidine	20.2	20.3	2.2%	12.8%	1.000	0.991	95%	95%	42	21.0%
Thymine	40.5	41.0	3.8%	7.0%	0.997	0.997	88%	91%	43	16.6%
Uracil	73.0	69.3	9.3%	10.9%	0.993	0.994	98%	92%	42	15.2%
Xanthine	32.6	28.8	10.5%	15.6%	0.996	0.982	106%	79%	46	33.5%
Overall	32.7	34.3	7.0%	10.7%	0.993	0.991	96%	93%	36	18.7%

RÉFÉRENCES

- Bakker JA et Bierau J. Purine and pyrimidine metabolism: Still more to learn. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2012;37(1):3-6.
- Cyr D, Giguère R, Lemieux B. Des anomalies génétiques sous-diagnostiquées... *Le Clinicien* 2002;17(8):69-77.
- Deville M, Dubois N, Pirard C, Charlier C. Évaluation de l'effet matrice lors de l'analyse de stupéfiants par LC-MS-MS [affiche présentée au 21ème Congrès de la SFTA - 51ème Congrès de la STC. Saint-Malo, France, juin 2013]. Liège, Belgique : Centre Hospitalier Universitaire de Liège; 2013. Disponible à : <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/161667/1/Poster%20SFTA%20-%20Evaluation%20de%20l%27effet%20matrice%20lors%20de%20l%27analyse%20de%20stup%27a9fiants%20par%20LC-MS-MS.ppt>.
- Duran M, Dorland L, Meuleman EE, Allers P, Berger R. Inherited defects of purine and pyrimidine metabolism: Laboratory methods for diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 1997;20(2):227-36.
- Hartmann S, Okun JG, Schmidt C, Langhans CD, Garbade SF, Burgard P, et al. Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52(6):1127-37.
- Ito T, van Kuilenburg AB, Bootsma AH, Haasnoot AJ, van Cruchten A, Wada Y, van Gennip AH. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin Chem* 2000;46(4):445-52.
- Jurecka A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009;32(2):247-63.
- La Marca G, Casetta B, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples. *J Mass Spectrom* 2006a;41(11):1442-52.
- La Marca G, Malvagia S, Casetta B, Pasquini E, Pela I, Hirano M, et al. Pre- and post-dialysis quantitative dosage of thymidine in urine and plasma of a MNGIE patient by using HPLC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 2006b;41(5):586-92.
- Mamedov IS, Zolkhina IV, Sukhorukov VS. Investigation of levels of purines and pyrimidines in children's urine. *Adv Tech Biol Med* 2017;5:247.
- Nyhan WL. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab* 2005;86(1-2):25-33.
- Schaefer GB et Mendelsohn NJ. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med* 2013;15(5):399-407.

- Schmidt C, Hofmann U, Kohlmüller D, Mürdter T, Zanger UM, Schwab M, Hoffmann GF. Comprehensive analysis of pyrimidine metabolism in 450 children with unspecific neurological symptoms using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 2005;28(6):1109-22.
- Simmonds HA. When and how does one search for inborn errors of purine and pyrimidine metabolism? *Pharm World Sci* 1994;16(2):139-48.
- Simmonds HA, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB. When to investigate for purine and pyrimidine disorders. Introduction and review of clinical and laboratory indications. *J Inher Metab Dis* 1997;20(2):214-26.
- Sun Q. Urine purine metabolite determination by UPLC-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:227-35.
- Van Gennip AH. Defects in metabolism of purines and pyrimidines. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1999;24(3):171-5.

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

Avis de réévaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Hôpital du Saint-Sacrement Québec

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

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

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

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

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

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

Avis de réévaluation

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

1.4. Retour sur l'évaluation du 2 avril 2013

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

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

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

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

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

La demande de réévaluation vise les patients avec :

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

2. RÉSUMÉ

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

Valeur diagnostique

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

Valeur pronostique

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

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

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

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

Validité analytique

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

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

Impacts budgétaires

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

Autre enjeu

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

Positions ou orientations d'organisations d'intérêt

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

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

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

3.2. Description de la méthode

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

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

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

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

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

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

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

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

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

3.4. Société ou concepteur

Roche Molecular Systems, Inc.

3.5. Homologation

La trousse Linear Array^{MC} a été homologuée par Santé Canada le 17 novembre 2006 et porte le numéro 68149⁷. La trousse a été homologuée sur la base de tests réalisés sur des cellules cervicales humaines collectées dans le milieu de prélèvement PCR Cell Collection Media de Cobas^{MC} ou PreservCyt de Hologic^{MC}, Inc.

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

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

3.6. Valeur pondérée : 155,73

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

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

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

4.2. Description de la maladie visée

D'après la Société canadienne du cancer, 1335 Canadiens ont reçu un diagnostic de cancer de l'oropharynx lié au VPH et 372 Canadiens sont décédés de ce type de cancer en 2012 [SCC, 2016]. Le cancer de l'oropharynx prend le plus souvent naissance dans les cellules pavimenteuses qui tapissent l'intérieur de l'oropharynx⁸.

⁷ Santé Canada. Liste des instruments médicaux homologués en vigueur (MDALL) [site Web], disponible à : <https://produits-sante.canada.ca/mdall-limh/index-fra.jsp>.

⁸ Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques sur le cancer du pharynx [site Web], disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/oropharyngeal/statistics/?region=nb> (consulté le 6 août 2018).

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

Les signes et symptômes d'un CEO sont : mal de gorge, impression que quelque chose est coincé dans la gorge, difficulté à mâcher ou à avaler, mauvaise haleine constante, prothèses dentaires qui deviennent mal ajustées, masse dans le cou, douleur à l'oreille, difficulté à parler, perte d'appétit, fatigue, perte de poids, saignement dans la gorge ou la bouche, incapacité à bouger la langue, difficulté à ouvrir la mâchoire et changement de la voix⁹.

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

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

4.4. Situation actuelle

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

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

4.5. Données médico administratives

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

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

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

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

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

⁹ *Ibid.*

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

4.7. Assurance qualité

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

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

5. DONNÉES PUBLIÉES

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

5.1. Valeur diagnostique

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2. Valeur pronostique

Valeur pronostique du statut VPH dans les carcinomes épidermoïdes oropharyngés

Revue systématique avec méta-analyse

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Abréviations : N : Nombre; SG : Survie globale.

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

5.3. Valeur thérapeutique

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

5.4. Validité analytique

Trousse Linear Array^{MC}

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

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

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

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

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

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

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

Études de validation analytique

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

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

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

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

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

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

5.5. Données fournies par le demandeur

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

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

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

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

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

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

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

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

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

La recommandation de l'INESSS

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

Précisions accompagnant la recommandation

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

ANNEXE A

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

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

Baldassarri <i>et al.</i> , 2015 Étude prospective États-Unis	L'objectif de cette étude est de valider l'efficacité du Cobas HPV ^{MC} à détecter et génotyper les VPH de haut risque dans des échantillons d'aspiration à l'aiguille provenant des ganglions lymphatiques de patients avec ou sans antécédents de CETC.	Période : non précisée Nature des échantillons : 42 échantillons d'aspiration à l'aiguille provenant de 37 patients et conservés dans le milieu PreservCyt^{MC}. 17 patients avaient des antécédents de CETC. Provenance des échantillons : Masses au cou : 36 Ganglions lymphatiques médiastinaux : 5 Masse parapharyngée : 1 Extraction : réalisée par le Cobas Méthodes de détection : Cobas HPV^{MC} IHC P16 Hybridation <i>In situ</i>	Diagnostic cytologique : Carcinomes épidermoïdes : 32 Suspects pour un carcinome épidermoïde : 4 Kystes kératinisés atypiques : 5 Non cancéreux : 3 Corrélation chirurgicale (31 échantillons) : 3 non cancéreux : validés 1 atypique : kyste Autres : validé cancéreux Cobas HPV^{MC} : VPH-16 : 16 VPH-18 : 0 VPH-HR : 4 Négatifs : 21 Non valide : 1 Corrélation entre le statut VPH des patients (37) et la localisation de la tumeur primaire : VPH+ : 18 (tous) de l'oropharynx VPH- : 2 de l'oropharynx, 15 d'origine autre. Non valides : 2 (1 non valide par Cobas HPV^{MC} et 1 discordant entre Cobas HPV^{MC} et laboratoire de référence. 20 échantillons testés par IHC P16, corrélation avec Cobas HPV^{MC} : VPH-HR+ : 11 IHC P16+ 9 VPH-HR- : 11 IHC P16- Aucune des 15 aspirations à l'aiguille de patients avec un CETC provenant d'ailleurs que de l'oropharynx n'était positive pour un VPH-HR (test de Fisher, $P < 0,001$). Statut VPH-HR comme marqueur de CEO : SE : 90,0 % (IC95 % : 66,9 à 98,2 %) SP : 100 % (IC95 % : 74,7 à 100 %)	Discussion : Dans cette étude, les échantillons d'aspiration à l'aiguille dans lesquels a été identifié un VPH de haut risque, étaient tous des carcinomes épidermoïdes oropharyngés. 90 % des métastases provenant de CEO ont été testées positives pour un VPH de haut risque. Aucune discordance n'a été rencontrée entre les résultats sur les échantillons cytologiques et histologiques. Conclusion : L'étude démontre que le Cobas HPV^{MC} est une méthode efficace pour déterminer le statut de VPH de haut risque et le génotype dans les métastases ganglionnaires de CETC à partir d'aspiration à l'aiguille. Un statut VPH-HR positif a présenté une corrélation forte avec un CEO primaire chez les patients avec un CETC. Une telle information serait utile pour diriger les analyses diagnostiques et la prise en charge des patients.
Yasui <i>et al.</i> , 2014	Améliorer la compréhension	Volet rétrospectif Période : 2005 à 2010	Volet rétrospectif : CEO : 6/15 VPH+	Discussion : Cette étude démontre que :

Étude à 2 volets Japon	clinique du statut VPH des métastases ganglionnaires provenant de cancer dont la tumeur primaire est inconnue. Investigation du statut VPH, incluant la présence d'ADN du VPH, du génotype et du statut physique dans des paires d'échantillons provenant de tumeurs primaires et de métastases de CETC.	Provenance des échantillons : 28 paires d'échantillons provenant de CETC primaires et de métastases ganglionnaires d'origine inconnue. Nature des échantillons : FFEP Extraction : DNeasy tissue kit (QIAGEN) Volet prospectif Période : 2010 à 2012 Provenance des échantillons : 53 métastases ganglionnaires de CETC Nature des échantillons : non fixés Extraction : QIAamp Mini Kit (QIAGEN) Méthodes de détection : IHC P16 PCR nichée pour VPH-HR et séquençage	Autres CETC : 0/13 VPH+ COI : 6/17 VPH+ Le statut VPH correspondait entre les tumeurs et les métastases associées à 28/28 ($p < 0,0001$). Parmi les CEO, 1/6 VPH+ et 3/9 VPH- avaient de multiples métastases et le statut de celles-ci correspondait au statut VPH du CEO. Volet prospectif : CEO : 13/22 VPH+ Autres CETC : 0/18 VPH+ COI : 4/10 VPH+ Analyse par PCR non valide : 3 Le statut VPH correspondait entre les tumeurs et les métastases associées à 40/40 ($p < 0,0001$). Génotypes : CEO VPH+ : 18 VPH16, 1 VPH33 Le génotype correspondait entre les tumeurs et les métastases associées à 19/19 ($p < 0,0001$). COI VPH+ : 8 VPH16, 2 VPH18 Carcinomes d'origine inconnue : Sur 27 COI (rétro. et prosp.), 19 (5 VPH+, 14 VPH-) ont eu une amygdalectomie et une dissection au cou qui ont révélé une tumeur aux amygdales chez 6/19 (3 VPH+, 3 VPH-). L'IHC P16 et le statut VPH correspondaient entre la tumeur, les métastases et les tumeurs repérées ($P = 0,01$). La différence de distribution des tumeurs P16/VPH était significative entre les COI avec et sans tumeur repérée ($p = 0,0004$) :	Les métastases ganglionnaires VPH+ sont spécifiques aux CEO. Le statut VPH et le génotype concordent entre la tumeur primaire et les métastases ganglionnaires associées. Le statut P16 et VPH demeure inchangé lorsque la tumeur génère des métastases. En présence d'un COI avec des métastases ganglionnaires VPH+, le site de la tumeur primaire est l'oropharynx. L'amygdalectomie n'a permis d'identifier la tumeur primaire d'aucun COI P16-/VPH-. Conclusion : Le statut VPH de la tumeur demeure inchangé après le développement de métastases. En présence d'un COI VPH+, la tumeur primaire est probablement localisée dans l'oropharynx. Les CEO et COI VPH+ tendent à former des kystes métastatiques dans les ganglions. L'analyse par PCR d'une aspiration permet la détection de l'ADN du VPH sans intervention chirurgicale, ce qui peut faciliter le diagnostic différentiel entre un kyste métastatique au ganglion et un kyste de la fente branchiale.
-----------------------------------	---	--	---	--

			Pas de tumeur : 10 P16-/VPH-, 1 P16+/VPH-, 2 P16+/VPH+ Avec une tumeur : 3 P16+/VPH-, 3 P16+/VPH+ La probabilité de trouver une tumeur à la dissection était significativement supérieure si IHC P16+ : RC : 39,0 IC95 % : 1,4 à 377,9; P = 0,02.	
Weiss et al., 2011 Allemagne	Déterminer la prévalence du VPH16 dans les métastases ganglionnaires de CETC et son impact sur les caractéristiques clinico-pathologiques.	Période : 2001 à 2009 Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : CETC de 131 patients avec des métastases ganglionnaires. Le statut VPH16+ a été validé sur les métastases de 20 de ces patients. Le statut P16 et la localisation de la tumeur primaire de 13 de ces patients. Extraction : QIAamp DNA Mini Kit Méthodes : PCR en temps réel pour VPH16 IHC P16	Statut VPH16 et localisation de la tumeur primaire Amygdales et base de la langue (CEO) : 77 dont 33 VPH16+ Autres emplacements (CENO) : 53 dont 2 VPH16+ (Un carcinome de la paroi pharyngée postérieure et un carcinome des 2/3 antérieurs de la langue). COI : 1 VPH- Statut VPH16+ est associé au CEO : $p < 0,000001$ Statut P16 et localisation de la tumeur primaire CEO : 30 P16+ CENO : 5 P16+ COI : 0 P16+ Statut P16 est associé aux CEO : $P = 0,0001$ Statut P16+/VPH16+ : 28 tumeurs Statut VPH16+ des métastases de tumeurs primaires P16+/VPH16+ (11 base de la langue et 9 amygdales) a été validé : 20/20 Carcinomes d'origine inconnue 13 patients se sont initialement présentés avec des métastases des ganglions lymphatiques cervicaux, mais sans tumeur primaire apparente. Localisation de la tumeur primaire : Amygdales : 7 patients (VPH16+) base de la langue : 5 patients (VPH16+)	Discussion/Conclusion : Dans cette étude, 27 % des CETC sont VPH16+. Les carcinomes des amygdales et de la base de la langue avaient la plus forte corrélation avec la présence d'ADN du VPH16. Il n'y avait pas de forte corrélation entre le statut VPH16 et l'âge, l'alcool et la consommation de tabac. L'étude démontre que les patients VPH16+ ont un meilleur pronostic en analyse univariée et multivariée. Les statuts VPH16+ et P16+ sont des marqueurs indépendants de pronostic favorable quant à la survie globale et à la survie sans progression. En excluant les COI, le statut VPH16+ des métastases de 20 CETC a pu être validé (20/20). Le statut VPH16 de 13 COI et la localisation de la tumeur primaire associée ont pu être déterminés. L'amygdalectomie et la biopsie de la base de la langue ont été suffisantes pour identifier la tumeur primaire dans 12 cas, qui étaient tous VPH16+.

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

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

ANNEXE B

Limite de détection du Linear Array^{MC}

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

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

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

ANNEXE C

Limite de détection du Linear Array^{MC}

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

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

ANNEXE D

Reproductibilité du Linear Array^{MC}

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

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

ANNEXE E

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

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

ANNEXE F

Caractéristiques des études de validation analytique retenues

Études	Buts et objectifs	Période, Échantillons Extraction, Méthodes d'analyse	Résultats	Discussion Conclusion
Pettus <i>et al.</i> , 2017 États-Unis	Étude de validation de la détection des VPH de haut risque à partir de tissus FFEP provenant de CEO par Cobas HPV ^{MC} *	Période : non précisée Nature des échantillons : FFEP Échantillons : 28, de 25 patients, dont : 16 CEO primaires 2 métastases ganglionnaires de CEO primaire 3 papillomes 1 cancer de la langue 1 cancer pulmonaire 1 cancer du col de l'utérus 1 cancer de l'utérus Extraction : 6 par Qiacube, 22 par Puregene Méthodes en place dans le laboratoire : - Immunohistochimie P16 - Linear Array^{MC}	CEO et métastases de CEO : 2 non valides par Cobas HPV^{MC} 15 concordants 1 discordant (VPH-33 par LA, négatif par Cobas HPV^{MC}, IHC+) Concordance 15/16 = 93,8 % Autres échantillons : 3 papillomes : VPH-11 par LA et négatif par Cobas HPV^{MC} 4 autres cancers : concordants Concordance totale : 25/26 = 96,2 % Concordance pour VPH-16 et VPH-18 : 100 %	Discussion : Les résultats négatifs ou non valides obtenus par Cobas HPV^{MC} pourraient être validés en 2^e ligne par Linear Array^{MC}. Utiliser le Cobas HPV^{MC}, en 1^{re} ligne pourrait réduire significativement le délai de réponse, le temps technique et les coûts associés à la stratégie actuelle (Linear Array^{MC}). Conclusion : Cette étude documente le développement avec succès d'une méthode d'identification des CEO associés à un VPH à partir de tissus FFEP en utilisant la méthode automatisée Cobas 4800 HPV^{MC}. Cette méthode pourrait être utilisée de routine dans les laboratoires cliniques de pathologie moléculaire.
Ambulos <i>et al.</i> , 2016 États-Unis	Comparer la capacité du NGS HPV par ion torrent [†] à celle du Linear Array ^{MC} , à géotyper adéquatement des VPH dans des échantillons de CETC et CC FFEP archivés.	Période : non précisée Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : 29 CEO 13 CC 2^e analyse : géotypage de 266 cc Extraction : QIAamp DNA FFEP Tissue Kit Méthodes de détection : - Ion torrent NGS HPV (2 sites) - Linear Array^{MC} - PCR VPH-16 - IHC P16	CEO : - Négatifs : 10 - VPH-16 : 10 - VPH-35 : 2 - VPH-26, 33, 58 : 1 fois chacun - VPH-6 + VPH-59 : 1 Discordants : 3 Les 3 résultats discordants avec le Linear Array^{MC} étaient discordants entre les 2 sites par NGS HPV : a) VPH-16 identifié 2 fois par le 1^{er} site, mais négatif au 2^e site, au Linear Array^{MC} et à la PCR. b) VPH-33 identifié 1 fois au 2^e site, mais négatif au 1^{er} site ainsi qu'au Linear Array^{MC}. Concordance du Linear Array^{MC} : 1^{er} site : 27/29 = 93,1 % 2^e site : 28/29 = 96,5 %	Discussion : Bien que le Linear Array^{MC} soit sensible et spécifique, il est cher à l'unité et demande beaucoup de temps technique, ce qui le rend impraticable pour réaliser des études sur de nombreux échantillons. Ces données démontrent que le Linear Array^{MC} peut produire des résultats faux positifs.

			PCR (identification du VPH-16) : 29/29 Cancers du col, concordance pour le cancer du col : 1 ^{er} site : 8/8 2 ^e site : 12/13	
Shanesmith <i>et al.</i> , 2011 États-Unis	2 essais commerciaux de Reverse line blot par PCR ont été comparés pour évaluer la présence d'ADN du VPH dans des biopsies cliniques de CETC envahissants.	Période : 2005 à 2010 Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : 135 CETC (oraux et oropharyngés) Extraction : DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen Méthodes comparées : INNO-LiPA HPV Genotyping Extra ^{MC} de Innogenetics Linear Array ^{MC} de Roche	Amplification : 135 par LA, 131 par INNO-LiPA Sur 131 échantillons amplifiés par les 2 méthodes : négatifs : 18 mêmes génotypes identifiés : 51 VPH+ ; ≥ 1 génotype en commun : 13 VPH+ de génotypes différents : 11 VPH+ par 1 seule méthode : 38 VPH positifs : 61,1 % par LA et 82,4 % par INNO-LiPA VPH-16 : 92,5 % des VPH+ par LA, 83,3 % des VPH+ par INNO-LiPA et 90,6 % des 64 VPH+ concordants pour ≥ 1 génotype VPH-16 identifiés : Linear Array ^{MC} : 74 INNO-LiPA ^{MC} : 90 Concordants : 58 sur 106 = 54,7 % VPH de haut risque identifiés (16,18, 31, 33, 35, 45, 52) : Linear Array ^{MC} : 88 INNO-LiPA ^{MC} : 106 Concordants : 63 sur 131 = 48,1 % Concordance : Statut VPH+ : 93/131 = 71,0 %, $K = 0,32$ Statut VPH-16 : 83/131 = 63,4 %, $K = 0,23$ Concordance exacte (positifs et négatifs) : 69/131 = 52,7 %	Discussion : Les 2 méthodes présentent un niveau de concordance globale faible (52,7 %) pour 131 échantillons FFEP provenant de CETC. La concordance n'était que légèrement supérieure en tenant compte des échantillons concordants pour au moins 1 génotype (62,6 %). Le Linear Array ^{MC} a identifié significativement moins de cas avec des VPH de haut risque que le INNO-LiPA. Conclusion : Un haut degré de concordance était attendu entre les 2 méthodes, étant donné l'utilité documentée des 2 méthodes à amplifier des séquences d'ADN de VPH dans les échantillons FFEP et le spectre relativement restreint de génotypes de VPH présents dans les CETC. Cette étude montre une faible concordance entre les méthodes, dans des échantillons FFEP.
Kingma <i>et al.</i> , 2010 États-Unis	Cette étude évalue l'habilité de 6 différents protocoles moléculaires à caractériser le statut VPH d'une série de biopsies de CETC FFEP et tente de déterminer l'utilité diagnostique de chaque technique.	Période : 2005 à 2007 (patients consécutifs) Nature des échantillons : FFEP Provenance des échantillons : 52 CEO invasifs 16 CETC 10 AINC Extraction : DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen Méthodes comparées : Linear Array ^{MC} PCR VPH-16 E6	Amplification 78/78 sauf Invader HPV 16/18 : 69/78 (8 résultats non valides en dépit d'analyses répétées et 1 échantillon dont l'ADN était insuffisant). Prévalence : LinearArray HPV ^{MC} : VPH+ : 48 (61,5 %) VPH-16 : 45 (57,7 %) VPH-18 : 5 (6,4 %) Méthode avec la prévalence la plus élevée : VPH+ : Linear Array ^{MC} (61,5 %) VPH-16 : PCR VPH-16 E7 (60,3 %) VPH-18 : PCR VPH-18 E6 (12,8 %)	Discussion / Conclusion : Le Linear Array ^{MC} , TaqMan, les PCR VPH-16 E6 et E7 ont montré une concordance excédant 90 %, ce qui porte à croire qu'ils sont cliniquement utiles à la détection des VPH de haut risque dans les CETC FFEP. Une validation plus approfondie des méthodes testées, y compris la reproductibilité, la sensibilité et les paramètres de spécificité, est requise afin d'en démontrer pleinement l'utilité clinique.

		PCR VPH-16 E7 PCR VPH-18 E6 TaqMan VPH-16 E7 Invader HPV16/18	Concordance du Linear Array ^{MC} avec le consensus des différentes méthodes : VPH+ : VPH-16 : 70/76 (92,1 %) VPH-18 : 76/76 (100 %) Concordance entre les méthodes pour la détection : VPH-16 : $K = 0,72$ VPH-18 : $K = 0,43$ Concordance avec le consensus pour le VPH-16 : PCR VPH-16 E6 : 98,7 %; $K = 0,97$ TaqMan : 93,4 %; $K = 0,87$ Linear Array ^{MC} : 92,1 %; $K = 0,84$ Concordance avec le consensus pour le VPH-18 : Linear Array ^{MC} : 100 %; $K = 1,0$ PCR VPH-18 E6 : 94,7 %; $K = 0,69$ Invader : 94,2 %; $K = 0,32$	
--	--	--	--	--

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

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

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

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

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

ANNEXE G

Plan de validation fourni par le demandeur

Plan de validation

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

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

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

ANNEXE H

Algorithme diagnostique du CAP

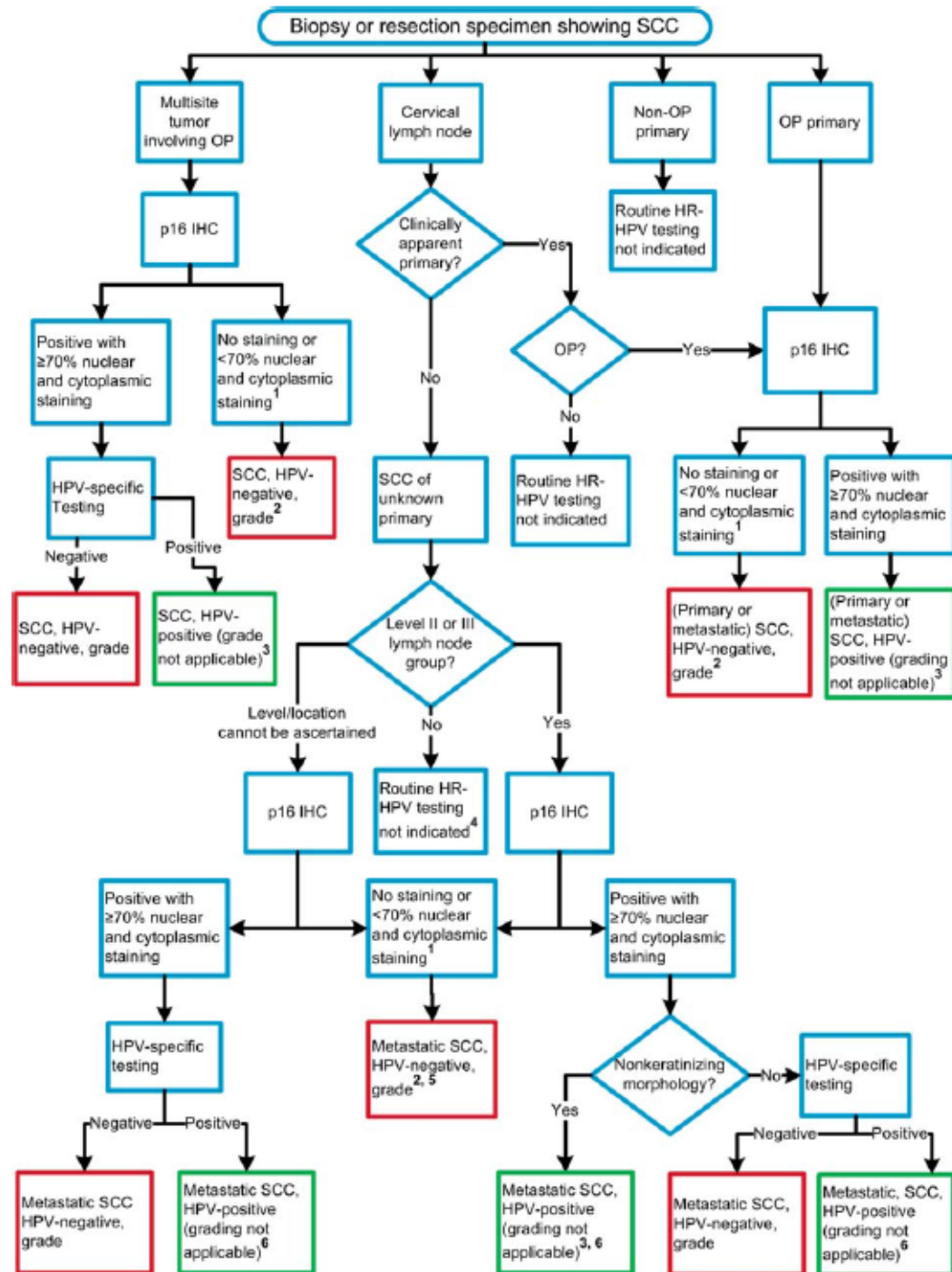
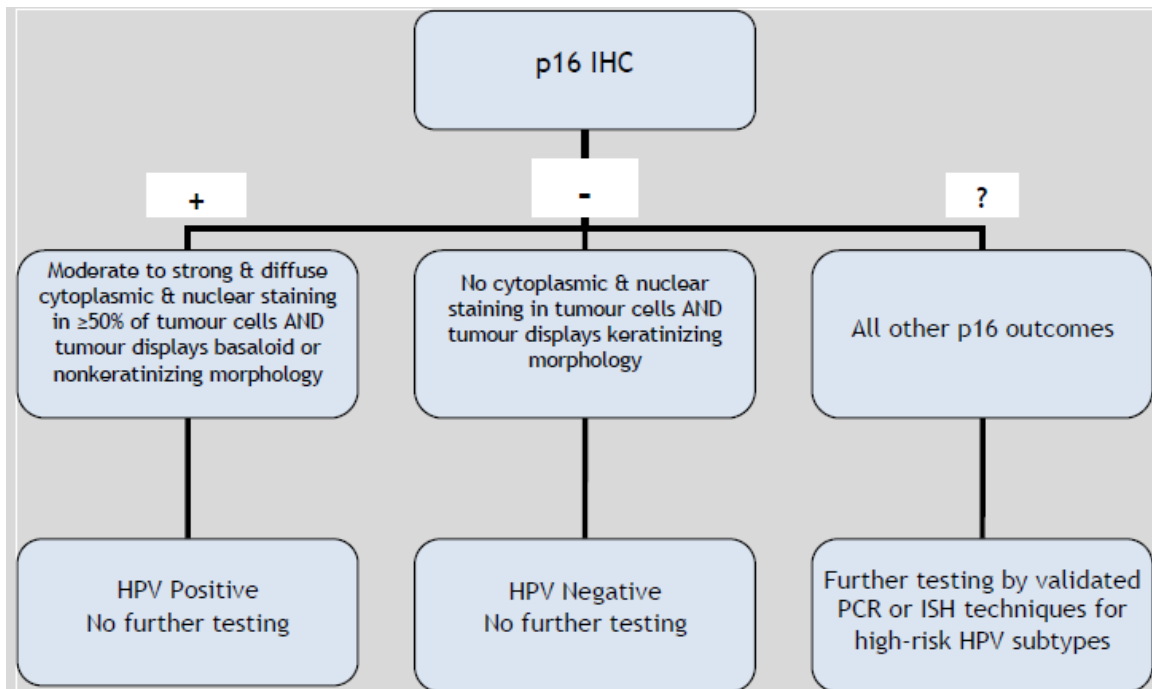


Figure 1. High-risk human papillomavirus (HR-HPV) testing in head and neck squamous cell carcinomas (SCCs). Abbreviations: IHC, immunohistochemistry; OP, oropharyngeal. ¹Consider HR-HPV-specific testing for equivocal p16 results (50%–70% nuclear and cytoplasmic staining). ²May also be reported as p16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

ANNEXE I

Algorithme diagnostique du CCO



RÉFÉRENCES

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

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

PANEL SCLÉRODERMIE (RÉFÉRENCE°– 2018.01.004)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Centre hospitalier de l'Université de Montréal

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

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

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

Le Dr Louis Gaboury n'a pas participé aux délibérations et s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

- D^{re} Alexandra Albert, rhumatologue au CHU de Québec – Université Laval.
- D^r David Philibert, néphrologue au CHU de Québec – Université Laval.
- D^{re} Marianne Lévesque, pneumologue au Centre hospitalier de l'Université de Montréal.
- D^r Kevin Pehr, dermatologue au Centre universitaire de santé McGill et à l'Hôpital général juif.

2. RÉSUMÉ

Le panel sclérodermie a pour objectif la détection des autoanticorps (AAC) humains de classe IgG dirigés contre 13 antigènes pour diagnostiquer la sclérose systémique (ScS). Selon le demandeur, le panel permet de :

- ✓ diagnostiquer la sclérodermie avec une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité par rapport aux autres tests (ELISA et immunofluorescence indirecte);
- ✓ cibler les phénotypes cliniques spécifiques à la ScS;
- ✓ dépister de façon précoce les AAC spécifiques de la ScS au début des lésions cutanées, avant l'apparition des atteintes des organes internes, et amorcer une prise en charge personnalisée;
- ✓ faire le diagnostic différentiel avec d'autres maladies auto-immunes;
- ✓ éviter les envois hors Québec ou hors réseau.

Utilité et validité clinique

Les études retenues ont démontré une association significative entre la présence des AAC spécifiques à la ScS, dépistés par le test Euroline, et les caractéristiques cliniques des patients atteints de cette maladie. La validité analytique du test a été démontrée par deux études qui ont comparé les performances du test Euroline à celles des techniques conventionnelles combinées (TCC)¹⁰ ou des techniques conventionnelles (TC)¹¹ dans le dépistage des AAC associés à la ScS. Une concordance de 92,4 % a été observée entre l'Euroline et les techniques conventionnelles combinées dans le dépistage des AAC. De plus, une concordance variant de 96 à 100 % a été observée entre le test Euroline et l'ELISA pour le dépistage des anti-PM-Scl100, des ATA et des anti-CENP-B. Par contre, la concordance entre le test Euroline et l'immunofluorescence indirecte était de 0,77 et 0,81 pour le dépistage des anti-CENP-A et des anti-CENP-B.

Positions ou orientations d'organisations d'intérêts

Plusieurs organisations ont souligné l'importance du dépistage des anticorps antinucléaires associés à la ScS :

- ✓ La Haute Autorité de Santé;
- ✓ Le Collège américain de rhumatologie et la Ligue européenne contre le rhumatisme pour la sclérose systémique;
- ✓ Les Lignes directrices européennes de dermatologie.

Cependant, ils ne font aucune mention du panel sclérodermie.

¹⁰ TCC : l'immunofluorescence indirecte, le western blot, l'immunoprécipitation, la double immunodiffusion, l'INNO-LIATM ANA [Bonroy *et al.*, 2012a].

¹¹ TC : ELISA et immunofluorescence indirecte [Low *et al.*, 2012].

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

Panel Sclérodermie

L'analyse Euroline Sclérose Systémique (Nucléoles) (IgG) a pour objectif la détection des autoanticorps humains de classe IgG dirigés contre 13 antigènes (Scl-70, CENP-A, CENP-B, RP11, RP155, fibrillarine, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52) pour diagnostiquer la sclérose systémique.

3.2. Description de la méthode

L'analyse consiste à détecter 13 antigènes par immunobuvardage réalisé à l'aide d'une trousse commerciale. Des bandelettes contenant des antigènes purifiés sont utilisées comme support solide. Chaque antigène est fixé sur une partie de membrane séparée et localisée dans une position définie. Les bandelettes sont incubées en présence du sérum ou du plasma du patient dilué à 1 : 101 qui contient potentiellement des autoanticorps de type IgG dirigés contre un antigène spécifique. La formation d'un complexe immun est révélée par l'ajout d'un anti-IgG humain couplé à la phosphatase alcaline. La réaction peut être lue automatiquement à l'aide du système EUROBlotScan, qui mesure l'intensité du complexe immun formé.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Le spécimen prélevé sera acheminé au laboratoire central du CHUM pour centrifugation et le sérum récolté sera congelé à -20 degrés Celsius, jusqu'à l'analyse. L'analyse sera réalisée au laboratoire d'immunologie humorale du CHUM et le temps de réponse attendu est d'une semaine.

3.4. Société ou concepteur

La trousse est fabriquée par la compagnie EUROIMMUN.

3.5. Homologation

La trousse EUROLINE^{MC} Profil Sclérose Systémique (Nucléoles) (IgG) a été homologuée par Santé Canada le 3 juin 2010 (no : 82972).

Cette trousse n'a pas été homologuée par la *Food and Drugs Administration*.

3.6. Valeur pondérée : 59,19

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

L'analyse est destinée aux patients (adultes et enfants) :

- ✓ présentant des lésions cutanées sclérodermiques (sclérodermie limitée, sclérodermie diffuse et syndrome de chevauchement);
- ✓ suspectés de sclérose systémique, sans atteinte cutanée ou *sine sclerodermia*;
- ✓ positifs aux anticorps antinucléaires suggérant une maladie auto-immune.

4.2. Description de la maladie visée

La sclérodermie systémique (ScS) est une maladie auto-immune chronique d'étiologie inconnue, caractérisée par des anomalies microvasculaires, une fibrose cutanée et viscérale. Les autoanticorps (AAC) sériques dirigés contre de multiples antigènes intracellulaires sont observés chez environ 95 % des patients et sont considérés comme une caractéristique de la ScS. Ils sont utiles au diagnostic précoce et à la définition des formes cliniques, et fournissent des informations pronostiques sur la ScS [Wielosz *et al.*, 2014]. Cliniquement, la ScS est une maladie hétérogène présentant un large éventail de manifestations cutanées, gastro-intestinales, rénales, cardiovasculaires et pulmonaires. Les patients sont classés selon la forme clinique :

- ✓ La ScS cutanée diffuse se caractérise par une atteinte cutanée étendue et précoce ainsi que par des complications pulmonaires (fibrose pulmonaire), rénales (crise hypertensive rénale) et cardiaques. Les AAC associés sont surtout des anti-topoisomérase I (15 à 42 % des cas), des anti-fibrillarine (4 à 10 %) et des anti-ARN polymérase III (5 à 31 % des cas) [Kayser et Fritzler, 2015].
- ✓ La ScS cutanée limitée se caractérise par un épaissement cutané réduit, accompagné d'une atteinte pulmonaire moins grave et plus tardive (hypertension artérielle pulmonaire). Les AAC associés sont surtout les anti-centromère ou les anti-CENP (20 à 38 % des cas) et les anti-Th/To (1 à 13 % des cas) [Kayser et Fritzler, 2015].
- ✓ Le syndrome de chevauchement est une forme ScS hétérogène avec la présence concomitante d'au moins deux maladies du tissu conjonctif et des AAC spécifiques, comme les anti-PM-Scl (17 % des cas), les anti-CENP (15 % des cas) ou les anti-ATA (13 % des cas) [Moinzadeh *et al.*, 2015].
- ✓ La ScS sans atteinte cutanée (*sine sclerodermia*) est une forme rare de la ScS cutanée limitée, avec un profil d'AAC qui lui ressemble : les anti-CENP observés dans 50 % des cas et les ATA dans 16,7 % des cas. Les anti-ARNPIII ne sont pas observés dans cette forme de ScS [Diab *et al.*, 2014].

Les AAC observés varient dans les cohortes de ScS étudiées en fonction de l'origine ethnique, de la région géographique, des marqueurs immunogénétiques, des autoantigènes recherchés et de la méthode de détection utilisée [Peterson *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2015]. Les AAC dépistés dans d'autres maladies auto-immunes (lupus érythémateux systémique, syndrome Sjögren, arthrite rhumatoïde, poly/dermatomyosite), comme les anti-Ku, les anti-U1-RNP, les anti-PM-Scl70, les anti-Ro 52, les anti-NOR 90 ou l'anti-PDGFR peuvent également être présents dans la ScS [Liaskos *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2015; Villalta *et al.*, 2012; Mierau *et al.*, 2011; Hanke *et al.*, 2009].

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Selon le demandeur, le nombre d'analyses attendues pour la province de Québec est d'environ 200 par année.

4.4. Situation actuelle

Au Québec, le panel sclérodermie n'est pas inscrit dans le *Répertoire* et l'analyse est envoyée hors Québec (tableau 1).

Tableau 1 Panel sclérodermie : envois hors Québec*

Années	Nombre d'analyses	Coût (\$)
2013-2014	24	1 849
2014-2015	62	4 965
2015-2016	108	9 619
2016-2017	124	11 637
TOTAL	318	28 070

*Laboratoires : Mitogen Advanced Diagnostic Laboratory Calgary, Alberta et Mayo Medical Laboratories, Rochester, MN, États-Unis.

4.5. Données médico administratives

Cette analyse est complémentaire au dépistage des AAC sur lame de cellules Hep-2 par immunofluorescence indirecte (IFI) ou par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), dont les anomalies orientent vers des phénotypes et des AAC spécifiques de la sclérodermie (tableau 2).

Tableau 2 Dépistage des anticorps antinucléaires spécifiques de la sclérose systémique par immunofluorescence indirecte ou par ELISA au Québec, en 2016-2017

Année	Type anticorps	Code	Nombre analyses	VP	Coût (\$)
2016-2017	Anti-ADN (ELISA)	20682	29 300	5,2	152 360
	Anti-ADN (IF)	20683	3 692	6,0	22 152
	Antinucléaires (ANA) (dépistage par IF) (par dilution)	20717	177 451	8,4	1 491 442
	Antinucléaires (ENA) (dépistage par ELISA)	20719	27 815	6,8	189 571
	Anti-ScL 70 (topoisomérase)	20711	10 628	7,2	76 521
	Anti-centromère	20685	886	4,6	4 075
	Anti-centromère Protein B (CENP-B)	20020	2 168	8,5	18 428
Total			251 940		1 954 549

Données du Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale.

Abréviations : ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay; IFI : immunofluorescence indirecte.

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

Selon le demandeur, l'analyse permettrait de :

- ✓ Diagnostiquer la sclérodermie avec une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité par rapport aux autres tests;
- ✓ Cibler les phénotypes cliniques de la sclérose systémique, dont 3 groupes particuliers :
 - -ACA (anti-centromère) associés à l'hypertension pulmonaire;
 - -ATA I (anti-ARN polymérase I) associés à la pneumopathie interstitielle;
 - -RNAP III (anti-ARN polymérase III) associés à la crise rénale sclérodermique et à une forte incidence de cancer.
- ✓ Faire un dépistage précoce des autoanticorps, au début des lésions cutanées, avant l'apparition des atteintes des organes internes;
- ✓ Anticiper les complications systémiques graves (valeur pronostique) et en amorcer la prise en charge personnalisée;
- ✓ Faire le diagnostic différentiel avec d'autres maladies auto-immunes (la polymyosite, la dermatomyosite, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé);
- ✓ Diminuer le temps de réponse et les coûts associés aux envois hors Québec.

4.7. Assurance qualité

Actuellement, il n'y a pas de programme d'assurance qualité dédié spécifiquement au panel sclérodermie. Toutefois, le laboratoire demandeur effectue des contrôles de qualité en vérifiant la corrélation entre leurs résultats et les résultats du laboratoire Mitogen (Calgary, Alberta), chez des patients avec ScS. Un exemple de tableau de corrélation entre les résultats du CHUM et Mitogen (Calgary, Alberta) est présenté à l'annexe A. Le laboratoire demandeur est inscrit à l'Institut Qualitätssicheburg (Lübeck, Allemagne) pour l'assurance qualité de la trousse Euroimmun.

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

La recherche documentaire a permis de repérer deux études démontrant la capacité du test Euroline à dépister les AAC spécifiques à la ScS, afin de prédire ou de préciser le diagnostic de ScS [Low *et al.*, 2012; Villalta *et al.*, 2012].

Performance du test Euroline dans le dépistage des autoanticorps spécifiques de la sclérose systémique et à la prédiction de l'atteinte cutanée

L'étude de Villalta et ses collaborateurs [2012] avait comme objectif d'évaluer les performances du test Euroline dans la détection de 13 différents AAC associés à la ScS.

Les auteurs ont analysé le sérum de 210 patients caucasiens diagnostiqués avec ScS avec atteinte cutanée diffuse ou limitée. Le sérum des patients a été testé pour des anticorps antinucléaires (AAN) par immunofluorescence indirecte (IFI) et par Euroline pour les 13 autoanticorps associés à la ScS. De plus, le sérum de 150 témoins diagnostiqués avec des maladies du tissu conjonctif¹² a été analysé.

Les résultats ont montré que parmi les 210 patients avec ScS, 188 (89 %) étaient AAN positifs, selon l'IFI, aux anticorps anti-centromère observés dans 30 % des cas, suivis par les anti-ATA observés dans 19,5 % des cas. L'analyse Euroline a montré que parmi les 210 patients atteints de ScS, 159 (75,7 %) étaient positifs à au moins un de 13 autoanticorps dépistés et que les anti-CENP-A et les anti-CENP-B étaient les plus fréquemment observés, suivis par les ATA et les anti-PM-Scl-75. La performance du test Euroline dans le dépistage des AAC est présentée dans le tableau 3.

¹² 150 témoins : 32 patients avec lupus érythémateux systémique, 25 avec syndrome de Sjögren, 19 avec maladies de tissu conjonctif non différencié, 40 avec arthrite rhumatoïde, 9 avec polymyosite/dermatomyosite, 10 avec syndrome de chevauchement et 15 avec cryoglobulinémie.

Tableau 3 Performance du test Euroline dans le dépistage des autoanticorps chez les patients atteints de sclérose systémique

Autoanticorps	Sensibilité % (IC 95 %)	Spécificité % (IC 95 %)	Rapport de cote (IC 95 %)
ATA	20,0 (14,8 - 26,1)	99,3 (96,3 - 99,9)	25,1 (4,9 - 129,9)
CENP-B	30,5 (24,3 - 37,2)	97,3 (93,3 - 99,3)	16,0 (5,7 - 45,0)
CENP-A	29,5 (23,0 - 25,7)	96,0 (91,5 - 98,5)	9,1 (4,0 - 21,8)
RP-11	5,2 (2,6 - 9,2)	100 (96,3 - 100)	5,8 (1,1 - 32,1)
RP-155	5,7 (2,9 - 9,8)	99,3 (96,3 - 99,9)	9,0 (1,2 - 70,3)
AAF	0,48 (0,1 - 2,6)	100 (96,3 - 100)	0,7 (0,04 - 7,0)
NOR-90	4,8 (2,3 - 8,6)	96,7 (92,4 - 98,9)	1,5 (0,5 - 4,3)
Th/To	3,3 (1,3 - 6,7)	98,7 (95,2 - 99,9)	2,6 (0,5 - 12,5)
PMScl-75	10,9 (7,1 - 15,9)	93,3 (88,1 - 96,7)	1,7 (0,8 - 3,7)
PMScl-100	6,7 (3,6 - 10,9)	98,0 (94,3 - 99,6)	3,5 (1,0 - 12,4)
Ku	4,7 (2,3 - 8,6)	96,0 (91,5 - 98,5)	1,2 (0,4 - 3,4)
PDGFR	0,95 (0,12 - 3,4)	100 (96 - 100)	1,4 (0,2 - 16,1)
Ro-52	18,1 (13,1 - 23,9)	50,0 (41,7 - 58,2)	0,22 (0,1 - 0,4)

Source : Villalta *et al.*, 2012. Abréviations : SE : sensibilité; SP : spécificité; RC : rapports de cotes; les ATA (anticorps anti-topoisomérase I), les anti-CENP-A et les anti-CENP-B (anti-centromère A et B), les anti-ARNP III (ARN polymérase III) avec les deux formes RP-11 et RP-155, les anti-AAF (anti-fibrillarine), les anti-NOR-90, les anti-Th/To, les anti-PM-Scl avec les deux formes anti-PM-Scl-100 et les anti-PM-Scl-75, les anti-Ku, les anti-PDGFR et les anti-Ro-52. ATA : anti-topoisomérase I; AAF : anticorps anti-fibrillarine.

Les auteurs concluent que le test Euroline possède une bonne spécificité pour le dépistage de chacun des autoanticorps spécifiques à la ScS, mais que la sensibilité est basse. Les rapports de cotes démontrent que la probabilité d'être diagnostiqué avec la ScS est plus élevée chez ceux qui présentent les ATA, les CENP-A, les CENP-B, les RP-11, les RP-155 et les PMScl-100.

L'association entre les types d'AAC dépistés par le test Euroline et les formes cliniques de ScS avec une atteinte cutanée limitée et diffuse est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4 Performance du test Euroline dans le dépistage des autoanticorps spécifiques de la sclérose systémique et la prédiction de l'atteinte cutanée

Autoanticorps	SCSCL N=146	SCSCD N=64	SE %	SP %	Rapport de cotes	Valeur P*
ATA	10	32	50	93,1	13,6	0,00001
CENP-B	61	3	41,8	95,3	14,6	0,00001
CENP-A	58	3	39,7	95,3	13,4	0,00001
RP-11	5	6	9,4	96,6	2,9	0,08
RP-155	5	7	10,9	96,6	3,5	0,03
AAF	1	0	0,7	98,4	0,5	0,59
NOR-90	9	1	6,2	98,4	4,1	0,11
Th/To	6	1	4,1	98,4	2,7	0,31
PMScl-75	16	7	10,0	89,0	1,0	0,99
PMScl-100	10	4	6,8	93,7	1,1	0,87
Ku	6	4	4,1	93,7	0,64	0,51
PDGFR	0	2	3,1	100	4,7	0,10
Ro-52	28	10	19,1	77,2	0,8	0,60

Source : Villalta *et al.*, 2012. Abréviations : ScScl : sclérose systémique cutanée localisée; ScScd : sclérose systémique cutanée diffuse; les anti-CENP-A et les anti-CENP-B (anti-centromère), les ATA (anti-topoisomérase I), les anti-PMScl (polymyosite scléroderma antigène) avec les deux formes anti-PMScl-100 et les anti-PM-Scl-75; les anti-ARNP III (ARN polymérase III) avec les deux formes RP-11 et RP-155, les anti-NOR-90, les anti-Ku, les anti-Th/To; les anti-PDGFR (récepteur recombinant PDGF), les anti-AAF (anti-fibrillarine) et les anti-Ro-52.

* p<0,05 significatif.

Ces résultats indiquent que les anti-CENP-A et les anti-CENP-B sont associés de façon significative à la ScS cutanée localisée, tandis que les ATA et les RP-155 sont associés de façon significative à la ScS diffuse.

Selon les auteurs, le test Euroline est capable de dépister un grand nombre d'autoanticorps simultanément et représente une approche pratique et efficace dans le diagnostic de la ScS en précisant l'association spécifique des AAC aux formes cliniques de la ScS [Villalta *et al.*, 2012].

Performance du test Euroline dans le dépistage des autoanticorps chez les patients atteints de sclérose systémique

Low et ses collaborateurs [2012] ont évalué la performance du test Euroline dans le dépistage concomitant de 13 autoanticorps liés à la ScS. Pour atteindre leur objectif, les auteurs ont analysé les sérums de 68 patients atteints de ScS, de 49 patients atteints de lupus érythémateux systémique, de 41 patients atteints d'ostéoarthrite et de 32 témoins en santé. La performance du test Euroline (spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative) a été évaluée en comparant les patients atteints de ScS aux autres patients ci-dessus mentionnés.

Parmi les 68 patients atteints de ScS, les formes diffuses et localisées ont chacune été observées dans 48,5 % des cas, alors que la forme *sine sclerodermia* et le syndrome de chevauchement ont respectivement été observés dans 2,9 % et 25 % des cas. La performance diagnostique du test Euroline est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5 Performance du test Euroline dans le dépistage des anticorps spécifiques de la sclérose systémique

AUTOANTI-CORPS	SCS contre OA/TS			SCS contre LES		
	SP %	VPP %	VPN %	SP %	VPP %	VPN %
Scl-70	100	100	37	100	100	51
CENP-A	100	100	54	94	83	46
CENP-B	100	100	54	96	89	47
RP11	99	100	49	98	50	42
RP155	100	100	49	100	100	43
AAF	100	100	49	100	100	42
NOR90	99	50	48	98	50	42
Th/To	100	100	49	100	100	42
PM-Scl-100	100	100	49	98	50	42
PM-Scl-75	97	50	52	98	67	42
Ku	100	100	52	96	33	41
PDGFR	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Ro-52	97	93	37	63	60	43

Source : Low *et al.*, 2012. Abréviations : ScS contre OA/TS : patients avec sclérose systémique ont été évalués en comparaison des patients avec ostéoarthrite et témoins sains; ScS contre LES : patients avec sclérose systémique ont été évalués en comparaison des patients avec lupus érythémateux systémique; SP : spécificité; VPP : valeur prédictive positive; VPN : valeur prédictive négative; NE : non évalué.

En résumé, les auteurs ont conclu que le test Euroline a démontré une très bonne spécificité pour le dépistage de la majorité des AAC et une excellente VPP pour environ la moitié des deux groupes à l'étude [Low *et al.*, 2012].

5.2. Valeur pronostique

La recherche documentaire a permis de repérer trois études démontrant l'association entre le profil d'AAC dépisté par le test Euroline et les caractéristiques cliniques et les complications des organes internes spécifiques de la ScS [Foocharoen *et al.*, 2017; Patterson *et al.*, 2015; Wodkowski *et al.*, 2015].

Association entre le profil d'autoanticorps dépisté par le test Euroline et les caractéristiques cliniques de la sclérose systémique

La première étude retenue [Foocharoen *et al.*, 2017] était une étude de cohorte rétrospective menée sur 285 patients thaïlandais de 18 ans et plus, diagnostiqués avec la ScS. La majorité des cas (190/285 soit 66,7 %) présentait la forme de ScS diffuse, 57 cas (20 %) présentaient le syndrome de chevauchement et l'association ScS/polymyosite était observée dans 41 cas (soit 14,4 %).

Les auteurs ont conclu que les patients positifs aux ATA présentaient davantage de chance d'avoir la forme de ScS diffuse, de présenter une difformité de la main et un phénomène Raynaud. De plus, ceux qui présentent des anti-Ku positifs ont davantage de chance de présenter le syndrome de chevauchement polymyosite/ScS.

Les autres AAC dépistés par le test Euroline n'ont pas présenté une relation statistiquement significative avec les caractéristiques cliniques spécifiques à la ScS comme les troubles intestinaux (reflux œsophagien, dysphagie, atteinte de l'estomac ou de l'intestin), la fibrose pulmonaire interstitielle, l'hypertension artérielle pulmonaire, la crise sclérodermique rénale ou l'atteinte cardiaque [Foocharoen *et al.*, 2017].

La seconde étude retenue est une étude de cohorte menée auprès de 505 patients australiens diagnostiqués avec la ScS [Patterson *et al.*, 2015]. Quatre groupes distincts

de patients ont été analysés selon les types des AAC positifs spécifiques de la ScS (anti-CENP, anti-RP11, anti-RP155 et ATA).

Les auteurs ont démontré que la sous-classification fondée uniquement sur la présence d'AAC spécifiques à la ScS a révélé des associations statistiquement significatives avec des caractéristiques cliniques et des complications des organes internes liés à la ScS [Patterson *et al.*, 2015].

La troisième étude retenue [Wodkowski *et al.*, 2015] a été menée auprès de 1 574 patients diagnostiqués avec la ScS d'une cohorte internationale (Canada, Australie et États-Unis). Les sérums ont été testés pour les anticorps antinucléaires par l'immunofluorescence indirecte et par Euroline pour les AAC suivants : les ATA, les anti-CENP, les anti-ARNPIII, les anti-PM-Scl-75 et les anti-PM-Scl-100.

Parmi les 1 574 patients analysés, la majorité a présenté un seul type d'AAC. Ainsi, il y avait 487 patients (30,9 %) positifs aux anti-CENP, 252 patients (15,9 %) positifs aux ATA, 206 patients (13,1 %) positifs aux anti-ARNPIII et 48 patients (3,0 %) positifs aux anti-PM-Scl-75 et les anti-PM-Scl-100. Cependant, 92 patients (5,8 %) ont présenté plus d'un AAC.

Cette étude a démontré que les anti-ARNPIII et les ATA sont associés à la ScS diffuse, tandis que les anti-CENP sont associés à la ScS limitée. La crise rénale hypertensive a été associée aux anti-ARNPIII, la maladie pulmonaire interstitielle aux ATA et les anti-CENP à l'hypertension artérielle pulmonaire. Une analyse de survie a montré une meilleure survie dans les groupes des patients positifs aux anti-PM-Scl100 et aux anti-CENP, par rapport aux groupes positifs aux anti-ARNPIII et aux anti-ATA [Wodkowski *et al.*, 2015].

En conclusion, les trois études ont démontré une association significative entre la présence des AAC spécifiques de la ScS et les caractéristiques cliniques et les complications liées à la ScS.

5.3. Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de permettre le choix ou la modification d'un traitement.

5.4. Validité analytique

La recherche documentaire a permis de repérer deux études dont l'objectif était de comparer les performances du test Euroline à celles des techniques conventionnelles (TC) dans le dépistage des AAC associés à la ScS [Bonroy *et al.*, 2012b; Low *et al.*, 2012].

Concordance entre les résultats du test Euroline et ceux des techniques conventionnelles combinées

La première étude retenue a analysé le sérum de 145 patients diagnostiqués avec la ScS (qui présentaient les formes *sine sclerodermia*, cutanée limitée et cutanée diffuse) et de 277 témoins diagnostiqués avec des maladies de tissu conjonctif¹³. La présence des AAC associés à la ScS a été décelée par le test Euroline et comparée au dépistage des AAC par les techniques conventionnelles (immunofluorescence indirecte, Western blot, ARN immunoprécipitation, double immunodiffusion avec l'antigène topoisomérase-I, INNO-LIA™ ANA¹⁴ et protéine radio-immunoprécipitation.

Le test Euroline a détecté des AAC chez 110/145 patients (soit 76 %) et chez 19/277 témoins (soit 6,9 %), tandis que les techniques conventionnelles ont détecté des AAC chez 113/145 (soit 78 %) patients de ScS. La comparaison des performances du test Euroline à celles des TCC pour chaque AAC associé à la ScS et pour le total d'AAC et leur concordance a été évaluée avec le coefficient kappa (κ) de Cohen (tableau 6).

Tableau 6 Performance et concordance du test Euroline et des techniques conventionnelles combinées dans le dépistage des autoanticorps spécifiques à la sclérose systémique

TCC N=145		EUROLINE N=145			Coefficient $\kappa^{\dagger}$
Autoanticorps	SE %	Autoanticorps	SE %	SP %	
Anti-CENP	50	CENP-A ou B	49	97	0,848
		CENP-A et -B	41	>99	0,820
ATA	18	ATA	19	98	0,909
ARNPIII	7,6	RP 11 ou RP155	10	96	0,831
		RP11 et RP155	7,6	100	1,000
PM-Scl	2,8	PM-Scl-75 ou PM-Scl-100	17	88	0,167
		PM-Scl-75 et PM-Scl-100	2,1	>99	0,854
Th/To	2,7	Th/To	2,1	98	0,146
TOTAL			76	93	0,787 (IC 95 % : 0,618-0,884)

Source : Bonroy *et al.*, 2012b. Abréviation : TCC : les techniques conventionnelles combinées; SE : sensibilité; SP : spécificité.

$\dagger$ Concordance entre l'Euroline et les TCC.

L'Euroline et les techniques conventionnelles ont montré une concordance supérieure à 0,80 pour la plupart des AAC.

En conclusion, les auteurs ont souligné que le test Euroline est une alternative fiable pour les techniques conventionnelles, en particulier pour la détection des anti-CENP, des ATA, des anti-ARNPIII et des anti-PM/Scl [Bonroy *et al.*, 2012b].

La seconde étude retenue [Low *et al.*, 2012] a comparé les performances du test Euroline à celles des techniques conventionnelles (ELISA et l'IFI) dans le dépistage des AAC associés à la ScS. Lors de l'étude, les sérums de 68 patients atteints de ScS ont

¹³ 90 patients avec arthrite rhumatoïde, 58 avec lupus érythémateux systémique, 50 avec spondyloarthropathie, 49 avec ostéoarthrite, 18 avec polymyalgia rhumatica et 12 avec vasculite et ANCA positifs.

¹⁴ INNO-LIATM ANA Update line immunoassay : ce test contient 13 antigènes, parmi lesquels se trouvent trois antigènes communs à Euroline systemic sclérosis : le centromère-B, la topoisomérase I, le Ro52.

été analysés. Pour évaluer la concordance entre le test Euroline et les techniques conventionnelles, le coefficient kappa (k) de Cohen et l'analyse de Bland-Altman ont été utilisés. La concordance entre le test Euroline et les techniques conventionnelles est présentée dans le tableau 7

Tableau 7 Concordance entre Euroline et les techniques conventionnelles dans le dépistage des autoanticorps spécifiques à la sclérose systémique

Autoanticorps	k*	Valeur p	Accord [†] N/N [‡] (%)
EUROLINE contre ELISA			
ATA / ATA	0,97	< 0,001	67/68 (98,5)
CENP-B / CENP-B	0,96	< 0,001	67/68 (98,5)
CENP-A / CENP-B	0,83	< 0,001	64/68 (94,1)
PM-Scl100 / PM-Scl	1,00	< 0,001	68/68 (100,0)
EUROLINE contre IFI			
CENP-B/AAN	0,77	< 0,001	62/67 (92,5)
CENP-A/AAN	0,81	< 0,001	63/67 (94,0)

Source : Low *et al.*, 2012. Abréviations : ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay; IFI : immunofluorescence indirecte; AAN : anticorps antinucléaires.

*Concordance entre le test Euroline et les techniques conventionnelles (ELISA et IFI).

†Accord : la quantification de l'accord (ou la concordance) entre les deux méthodes quantitatives de mesure utilisées dans l'étude : Euroline contre ELISA et Euroline contre IFI, selon l'approche d'Altman et Bland.

‡N/N : nombre des sérums positifs sur le total des sérums analysés.

Les auteurs estiment qu'il y avait une très bonne concordance entre les tests Euroline et ELISA pour le dépistage des anti-PMScl100, des ATA et des anti-CENP-B. Par contre, la concordance entre les tests Euroline et l'IFI était plus basse, pour le dépistage des anti-CENP-A et des anti-CENP-B [Low *et al.*, 2012].

5.5. Données fournies par le demandeur

Le laboratoire demandeur effectue des contrôles de qualité en vérifiant la corrélation entre leurs résultats et les résultats du laboratoire Mitogen (Calgary, Alberta) chez des patients avec ScS. Un exemple de tableau de corrélation entre les résultats du CHUM et Mitogen (Calgary, Alberta) est présenté dans l'annexe A.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du panel sclérodermie utilisé pour diagnostiquer la sclérose systémique. Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts.

L'évaluation des coûts est présentée au tableau 8. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- ✓ L'analyse proposée cible des patients (adultes et enfants) présentant des lésions cutanées sclérodermiques (sclérodermie limitée, sclérodermie diffuse et syndrome de chevauchement). Elle vise aussi les patients suspectés de sclérose systémique sans atteinte cutanée ou *sine sclerodermia* de même que les patients positifs aux anticorps antinucléaires suggérant une maladie auto-immune.
- ✓ En 2016-17, l'analyse proposée a fait l'objet de 124 envois hors Québec, pour un coût total de 11 637 \$. Cela représente un coût moyen de 93,85 \$ par analyse. Le rapatriement de l'ensemble de ces envois hors Québec est prévu dès la première année suivant l'ajout de l'analyse au *Répertoire*.
- ✓ Selon l'augmentation du nombre d'envois hors Québec observée au cours des dernières années, il est estimé que 166, 201 et 235 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement. Ces projections sont conformes aux estimations (200 analyses par année en moyenne) du demandeur.
- ✓ La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 63.
- ✓ À la suite de l'introduction de cette analyse au *Répertoire*, aucune modification de la prise en charge des patients n'est anticipée.

Tableau 8 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* du panel sclérodermie

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout du panel sclérodermie au <i>Répertoire</i>				
Analyses hors Québec	166	201	235	602
Coûts	15 579 \$	18 864 \$	22 055 \$	56 498 \$
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout du panel sclérodermie au <i>Répertoire</i>				
Analyses panel sclérodermie	166	201	235	602
Coûts	10 458 \$	12 663 \$	14 805 \$	37 926 \$
Impact net	-5 121 \$	-6 201 \$	-7 250 \$	-18 572 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, réduction de coûts la plus élevée			-18 698 \$
	Pour 3 ans, réduction de coûts la plus faible			-13 973 \$

Ainsi, l'ajout au *Répertoire* du panel sclérodermie utilisé pour diagnostiquer la sclérose systémique pourrait générer une réduction de coûts d'environ 19 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Certains enjeux organisationnels sont liés à la présente analyse. À ce titre, la détection des AAC spécifiques à la ScS par les techniques conventionnelles prend beaucoup de temps. Le test Euroline constitue une alternative fiable et rapide aux techniques conventionnelles, en particulier pour la détection des anti-CENP, des ATA, des anti-ARNPIII et des anti-PM/Scl.

Il y a cinq AAC spécifiques à la ScS (anti-CENP, ATA, anti-ARNP-III, anti-Th/To et anti-fibrillarine) qui représentent 75 à 80 % des AAC observés dans la ScS. Les autres AAC comme les anti-PM/Scl, anti-Ku, anti-Ro et anti-NOR90 ne sont pas spécifiques à la ScS, mais sont associés à la ScS et présentent un degré varié de signification clinique. Les tests les plus largement disponibles sont ELISA pour la détection des anti-Scl-70 et l'immunofluorescence indirecte ou ELISA pour la détection des anti-CENP. Cependant, 40 % des patients atteints de ScS sont négatifs aux deux AAC. La disponibilité d'un essai tel qu'Euroline, qui permet la détection simultanée des 13 AAC, est utile pour identifier de tels patients.

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

Le Collège américain de rhumatologie et la Ligue européenne contre le rhumatisme pour la sclérose systémique soulignent que la présence des autoanticorps spécifiques (anti-centromère [anti-CENP-A et anti-CENP-B]), anti-Scl70 [anti-topoisomérase I] et anti-ARN-polymérase III [anti-RP11 et anti-RP155]) doit être prise en compte dans la classification de la sclérose systémique [Van den Hoogen *et al.*, 2013]. Cependant, ils ne font aucune mention du panel sclérodermie.

Des lignes directrices européennes en dermatologie soulignent que :

- ✓ pour les cas de sclérodermie localisée, le dépistage des anticorps antinucléaires de routine n'est pas recommandé, sauf pour confirmer ou exclure la ScS;
- ✓ pour les patients chez qui il y a suspicion de ScS précoce, le dépistage des anticorps spécifiques de la ScS constitue un bon moyen de prédiction de l'évolution de la maladie;
- ✓ pour les patients présentant un syndrome de chevauchement de la ScS avec les maladies auto-immunes, le dépistage des AAC associés à chaque maladie auto-immune est recommandé pour les différencier [Knobler *et al.*, 2017]. Cependant, il n'est fait aucune mention du test proposé par le demandeur.

La Haute Autorité de Santé (HAS) souligne que la recherche d'AAC constitue un des examens complémentaires de première intention réalisés au stade de suspicion de la ScS. L'immunofluorescence indirecte est mentionnée comme analyse de recherche d'AAC [HAS, 2017].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Panel sclérodermie

La recommandation de l'INESSS

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

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Le comité recommande l'introduction du panel, mais uniquement sur la base des 5 anticorps suivants, dont la pertinence a été démontrée (anti-CENP, ATA, anti-ARNP-III, anti-TH/To et anti-fibrillarine). La pertinence de rapporter les résultats pour les autres anticorps pourra être réévaluée lorsque des données supplémentaires seront disponibles.
- ✓ La recommandation d'introduction est conditionnelle à ce que le laboratoire demandeur :
- ✓ présente un algorithme de prise en charge plus précis;
- ✓ produise un plan complet et détaillé de validation analytique et fournisse les résultats lorsqu'ils seront disponibles.

ANNEXE A

Corrélation entre les résultats du test Euroline analysés au CHUM et les résultats du test Euroline analysés chez Mitogen Laboratory Calgary (Alberta)

# Patients		Sci-70	CENP A	CENP B	RP11	RP155	Fibrillarin	NOR90	Th/To	PM-Scl100	PM-Scl75	Ku	PDGFR	Ro52	
1) 17-193-05637	D	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
2) 17-216-04623	G	0	0	0	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
3) 17-180-06148	A	0	+++	+++	0	0	++	0	0	0	0	0	0	++	Mitogen
		0	+++	+++	0	0	+++	0	0	0	0	0	0	+++	CHUM
4) 17-199-06211	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
5) 17-242-05347	E	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	CHUM
6) 17-243-06207	H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
7) 17-236-05948	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
8) 17-230-02931	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
# Patients		Sci-70	CENP A	CENP B	RP11	RP155	Fibrillarin	NOR90	Th/To	PM-Scl100	PM-Scl75	Ku	PDGFR	Ro52	
1) 17-249-06588		0	0	0	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
2) 17-269-06799		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	CHUM
3) 17-272-05063		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	CHUM
4) 17-275-06868		0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	CHUM
5) 17-270-06447		0	0	0	+++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
6) 17-208-05781		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
7) 17-261-06783		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-019-04211		0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	++	0	0	CHUM
18-024-04761		0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-029-05638		0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-031-05327		0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	+++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
# Patients		Sci-70	CENP A	CENP B	RP11	RP155	Fibrillarin	NOR90	Th/To	PM-Scl100	PM-Scl75	Ku	PDGFR	Ro52	
17-339-05529		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	CHUM
17-341-04999		0	0	++	0	+	0	0	0	0	++	0	0	0	Mitogen
		0	0	+++	0	++	0	0	0	0	+++	0	0	0	CHUM
17-333-05363		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	CHUM
18-025-05231		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	CHUM
18-044-05757		0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
17-336-05615		0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	++	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	+++	CHUM
18-044-02027		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-024-04761		0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-052-05372		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-025-05410		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
17-331-04704		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
18-059-01811		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Mitogen
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CHUM
Analyses Chez Mitogen Lab. Calgary															
Analyses au CHUM															

RÉFÉRENCES

- Bonroy C, Smith V, Van Steendam K, Van Praet J, Deforce D, Devreese K, De Keyser F. Fluoroenzymeimmunoassay to detect systemic sclerosis-associated antibodies: Diagnostic performance and correlation with conventional techniques. *Clin Exp Rheumatol* 2012a;30(5):748-55.
- Bonroy C, Van Praet J, Smith V, Van Steendam K, Mimori T, Deschepper E, et al. Optimization and diagnostic performance of a single multiparameter lineblot in the serological workup of systemic sclerosis. *J Immunol Methods* 2012b;379(1-2):53-60.
- Chang WS, Schollum J, White DH, Solanki KK. A cross-sectional study of autoantibody profiles in the Waikato systemic sclerosis cohort, New Zealand. *Clin Rheumatol* 2015;34(11):1921-7.
- Diab S, Dostrovsky N, Hudson M, Tatibouet S, Fritzler MJ, Baron M, Khalidi N. Systemic sclerosis sine scleroderma: A multicenter study of 1417 subjects. *J Rheumatol* 2014;41(11):2179-85.
- Foocharoen C, Watcharenwong P, Netwijitpan S, Mahakkanukrauh A, Suwannaroj S, Nanagara R. Relevance of clinical and autoantibody profiles in systemic sclerosis among Thais. *Int J Rheum Dis* 2017;20(10):1572-81.
- Hanke K, Bruckner CS, Dahnrich C, Huscher D, Komorowski L, Meyer W, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2009;11(1):R22.
- Haute Autorité de Santé (HAS). Sclérodémie systémique. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS). Saint-Denis La Plaine, France : HAS; 2017. Disponible à : https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-11/pnds__sclerodemie_web.pdf.
- Kayser C et Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis: Unanswered questions. *Front Immunol* 2015;6:167.
- Knobler R, Moinzadeh P, Hunzelmann N, Kreuter A, Cozzio A, Mouthon L, et al. European dermatology forum S1-guideline on the diagnosis and treatment of sclerosing diseases of the skin, Part 2: Scleromyxedema, scleredema and nephrogenic systemic fibrosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017;31(10):1581-94.
- Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, et al. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 2017;50(7):414-21.
- Low AH, Wong S, Thumboo J, Ng SC, Lim JY, Ng X, et al. Evaluation of a new multiparallel line immunoassay for systemic sclerosis-associated antibodies in an Asian population. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(8):1465-70.
- Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: Correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther* 2011;13(5):R172.

- Moinzadeh P, Aberer E, Ahmadi-Simab K, Blank N, Distler JH, Fierlbeck G, et al. Disease progression in systemic sclerosis-overlap syndrome is significantly different from limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2015;74(4):730-7.
- Patterson KA, Roberts-Thomson PJ, Lester S, Tan JA, Hakendorf P, Rischmueller M, et al. Interpretation of an extended autoantibody profile in a well-characterized Australian systemic sclerosis (Scleroderma) cohort using principal components analysis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(12):3234-44.
- Peterson LK, Jaskowski TD, Mayes MD, Tebo AE. Detection of anti-U3-RNP/fibrillarin IgG antibodies by line immunoblot assay has comparable clinical significance to immunoprecipitation testing in systemic sclerosis. *Immunol Res* 2016;64(2):483-8.
- Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2737-47.
- Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, Lauriti C, Gabini M, Turi MC, Bizzaro N. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012;12(2):114-20.
- Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Serological profile of patients with systemic sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014;68:987-91.
- Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, et al. Clinical correlates of monospecific anti-PM75 and anti-PM100 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects. *Autoimmunity* 2015;48(8):542-51.

SÉQUENÇAGE DU GÈNE *FAH* DANS LA TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE DE TYPE 1 (RÉFÉRENCE°– 2018.02.001)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine

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

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

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

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

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

- D^r Guy Parizeault, pédiatre au CIUSSS du Saguenay-Lac-Saint-Jean.

2. RÉSUMÉ

La tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1) est une maladie autosomale récessive rare, causée par une déficience de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), le dernier enzyme du sentier catabolique de la tyrosine. Bien que l'incidence mondiale de la TH1 soit d'environ 1 sur 100 000 individus, elle s'élève à 1 sur 19 819 individus dans la population québécoise en raison d'un effet fondateur associé à la mutation c.1062+5G>A (IVS12+5G>A). Chez les individus non traités, les signes cliniques varient selon la sévérité de la maladie, qui se caractérise principalement par des dommages hépatiques (insuffisance hépatique, cirrhose, hépatocarcinome) et rénaux. Une insuffisance hépatique aigüe ou des crises neurologiques aigües peuvent causer le décès en absence de traitement. Jusqu'à présent, 102 mutations associées au phénotype clinique de la TH1 ont été identifiées sur le gène *FAH*, mais seule la mutation c.1062+5G>A (IVS12+5G>A) est inscrite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* pour la TH1.

Malgré une prédominance de la mutation c.1062+5G>A (IVS12+5G>A) au Québec (qui représente environ 90 % des allèles TH1), d'autres mutations ont été rapportées. De plus, la littérature suggère que certaines mutations spécifiques montrent une incidence élevée dans d'autres populations. L'analyse de séquençage du gène *FAH* serait donc complémentaire à l'analyse de la mutation canadienne-française pour la confirmation d'un diagnostic de TH1, le dépistage en cascade et le diagnostic prénatal dans l'ensemble de la population du Québec, de toute origine ethnique.

L'identification de mutations causales de TH1 peut présenter des enjeux psychosociaux dus au risque élevé de transmission de la maladie dans les familles affectées ayant recours au dépistage prénatal. Celles-ci sont ensuite confrontées à la décision de poursuivre ou d'interrompre une grossesse. Le statut de porteur d'une mutation de TH1 peut également influencer les décisions de couples concernant la planification familiale.

Deux groupes d'experts (l'un nord-américain, l'autre européen) expérimentés dans le soin des patients TH1 recommandent l'analyse moléculaire du gène *FAH* pour la confirmation du diagnostic de TH1, le diagnostic prénatal et le dépistage des apparentés.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

Le séquençage des exons du gène fumarylacétoacétate hydrolase (*FAH*) par la technique de Sanger a pour objectifs :

- ✓ d'identifier la ou les mutations causales de la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1) chez les patients ayant reçu un diagnostic basé sur des analyses biochimiques et qui ne sont pas homozygotes pour la mutation canadienne-française c.1062+5G>A (IVS12+5G>A);
- ✓ d'identifier les porteurs chez les apparentés;
- ✓ et de permettre le diagnostic prénatal.

3.2. Description de la méthode

Il s'agit d'une analyse maison de séquençage des exons (et des jonctions exon/intron) du gène *FAH* par la méthode de Sanger. Cette méthode implique une étape d'amplification qui génère des fragments d'ADN de différentes longueurs. Chaque fragment se termine par un fluorochrome spécifique à chacune des quatre bases de l'ADN. Les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse. La séquence des couleurs, ainsi lue, est utilisée pour transcrire le fragment dans son ensemble. La région d'intérêt est séquencée dans les deux directions. L'absence de polymorphismes connus dans les sites de liaison des amorces de même que la qualité des deux séquences sont vérifiées. Un échantillon dépourvu d'ADN sert de contrôle négatif. Les séquences sont analysées à l'aide du logiciel *Mutation Surveyor* et vérifiées manuellement par deux professionnels, de manière indépendante.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Pour les consultations au CHU Sainte-Justine, l'échantillon sera prélevé au centre de prélèvement et acheminé au laboratoire clinique de biologie moléculaire de l'établissement où l'ADN sera extrait et l'analyse de PCR-séquençage effectuée.

Pour les consultations externes, l'échantillon prélevé dans le centre local sera acheminé au laboratoire clinique de biologie moléculaire du centre demandeur, où il sera traité comme décrit pour les échantillons provenant de l'interne. Le laboratoire prévoit d'accepter les échantillons d'ADN extraits par un laboratoire externe de biologie moléculaire.

Le temps de réponse prévu pour l'analyse est de moins d'un mois, mais pourrait être ajusté à moins de 10 jours dans les cas prioritaires.

3.4. Société ou concepteur

L'analyse proposée par le centre demandeur est une analyse maison.

3.5. Homologation

Cette analyse n'a fait l'objet d'aucune homologation auprès de Santé Canada ou de la FDA.

3.6. Valeur pondérée : 325,33

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

- ✓ Les patients avec un diagnostic biochimique de TH1 (identifiés ou non par le dépistage néonatal) qui ne sont pas homozygotes pour la mutation canadienne-française prédominante;
- ✓ les apparentés;
- ✓ les couples porteurs de la mutation en cours de grossesse, envisageant le diagnostic prénatal.

4.2. Description de la maladie visée

Rôle de l'enzyme FAH dans la voie catabolique de la tyrosine

La TH1 est une maladie autosomale récessive causée par une déficience de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) (OMIM 276700) [Tanguay *et al.*, 1990; Kvittingen *et al.*, 1981; Lindblad *et al.*, 1977]. Il s'agit de l'enzyme impliqué dans la dernière étape du catabolisme de la tyrosine [Knox et Edwards, 1955]. Le blocage de la voie au niveau de la FAH cause une accumulation de métabolites, tels que le fumarylacétoacétate (FAA) et la succinylacétone (SAC), plus particulièrement au niveau du foie et des reins, les principaux sites du métabolisme de la tyrosine (figure 1).

Traitement de la TH1

La prise en charge des patients atteints de TH1 consiste en un traitement au Nitisinone^{MC15} (NTBC) accompagné d'une diète restrictive en tyrosine et en phénylalanine [Chinsky *et al.*, 2017]. Le NTBC prévient l'accumulation de métabolites en inhibant l'enzyme acide p-hydroxyphénylpyruvique dioxygénase située en amont de la FAH dans la voie de dégradation de la tyrosine (figure 1). Le traitement permet ainsi de prévenir les dommages hépatiques et rénaux ainsi que les crises neurologiques caractéristiques de la TH1 [Chinsky *et al.*, 2017; Bartlett *et al.*, 2014; Maiorana *et al.*, 2014; Mayorandan *et al.*, 2014; Larochelle *et al.*, 2012].

Le gène *FAH*

Le gène *FAH*, situé sur le chromosome 15 (15q23-25), comprend 14 exons étalés sur 35 kilobases d'ADN et code un ARN messager de 1 260 nucléotides [Awata *et al.*, 1994; Labelle *et al.*, 1993; Phaneuf *et al.*, 1991].

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le centre demandeur estime le nombre d'analyses demandées à 20 par année. Ce chiffre peut varier selon le nombre d'apparentés désirant avoir recours à l'analyse. De plus, selon le demandeur, la disponibilité de l'analyse au Québec pourrait engendrer des demandes pour des patients ayant reçu un diagnostic de TH1 et chez qui la ou les mutations causales n'ont jamais été identifiées.

4.4. Situation actuelle

Le dépistage de la TH1 est assuré par le Programme québécois de dépistage néonatal sanguin (PQDNS) instauré depuis 1970. La mesure de la succinylacétone (SAC) est l'analyse de première intention depuis 1998. Depuis 2014, elle se fait par la mesure directe du SAC plasmatique par spectrométrie de masse (MS/MS) en première intention suivie d'une mesure quantitative indirecte de SAC pour la validation [Giguère et Berthier, 2017]. La confirmation moléculaire est effectuée par la recherche de la mutation canadienne-française. Advenant un résultat négatif ou un statut non homozygote, une analyse de séquençage du gène est disponible par l'entremise des analyses hors Québec.

Dans les régions du Saguenay-Lac-Saint-Jean, de Charlevoix et la Haute-Côte-Nord, 1 individu sur 19 est porteur du gène *FAH* défectueux. Des tests pour identifier les porteurs sont offerts aux personnes à risque répondant aux conditions suivantes¹⁶ :

- ✓ avoir plus de 18 ans;
- ✓ désirer avoir des enfants;
- ✓ avoir au moins un grand-parent biologique originaire d'une des régions suivantes : le Saguenay-Lac-Saint-Jean, Charlevoix ou la Haute-Côte-Nord.

¹⁵ Le Nitisinone^{MC} est inscrit à la liste des médicaments d'exception pour le traitement de la TH1 depuis juin 2017 [INESSS, 2017].

¹⁶ Services Québec. Tyrosinémie héréditaire de type 1 [site Web], disponible à : <https://www.quebec.ca/sante/problemes-de-sante/a-z/maladies-hereditaires-recessives/tyrosinemie-hereditaire-de-type-1/> (consulté le 1er mai 2018).

Le centre demandeur propose l'algorithme diagnostique suivant :

Chez les individus symptomatiques :

- ✓ recherche de la mutation fondatrice (codes 55313/55314, non offert au centre demandeur). Arrêt des analyses moléculaires si l'individu est homozygote pour la mutation c.1062+5G>A (IVS12+5G>A). Le cas échéant (statut hétérozygote ou négatif pour la mutation);
- ✓ séquençage du gène *FAH*.

Chez les apparentés :

- ✓ recherche de la ou des mutations familiales par séquençage de l'exon ou des exons concernés.

4.5. Données médico administratives

L'analyse de séquençage des exons du gène *FAH* est envoyée hors Québec. Au cours des trois dernières années, l'analyse a fait l'objet de 45 envois à un coût unitaire variant de 250 \$ à 2 496 \$ (tableau 1). Présentement, seule la recherche de la mutation canadienne-française c.1062+5G>A (IVS12+5G>A) du gène *FAH* est inscrite dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* (ci-après nommé *Répertoire*) (tableau 2).

Tableau 1 Envois hors Québec des analyses en lien avec la recherche de mutations dans la TH1 pour les années 2014-2015, 2015-2016 et 2016-2017

Années	Nombre total d'analyses	Coût total (\$)	Laboratoires
2014-2015	18	11 416	Centogene (2) Prevention Genetics (14) Baylor College of Medicine (2)
2015-2016	12	12 232	Prevention Genetics (10) Fulgent Diagnostic (2)
2016-2017	15	14 404	n. d.

Source : données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS).

Abréviation : n.d. : non disponible.

Tableau 2 Volumétrie pour l'analyse génétique de la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TAAN) pour les années 2014-2015, 2015-2016 et 2016-2017

Années	Nombre total d'analyses	Coût total (\$)	Laboratoires
2014-2015*	766	23 746	CHU de Québec
2015-2016†	782	24 242	CHU de Québec
ANALYSE DES QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY-LAC-SAINT-JEAN			
2016-2017‡	1 970	21 670	CHU de Québec (953) CHU Sainte-Justine (1 017)

Source : données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS).

* Code 50313 : Tyrosinémie héréditaire de type 1 : FAAH (TAAN).

† Code 55310 : Tyrosinémie héréditaire de type 1 : FAAH (TAAN).

‡ Code 55314 : Analyse des quatre maladies récessives du Saguenay-Lac-Saint-Jean (ALC-SLSJ; TH1; NSM/ACC; ARSACS) (TAAN). À noter que ces données incluent la volumétrie pour la mutation recherchée pour chacune des quatre maladies. Il n'est donc pas possible de préciser le nombre d'analyses correspondant à la mutation de la tyrosinémie héréditaire de type 1 de manière individuelle.

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

- ✓ L'analyse permettrait de remplir un besoin clinique qui n'est pas couvert actuellement et serait complémentaire à la recherche de la mutation canadienne-française c.1062+5G>A.
- ✓ En combinaison avec les données biochimiques, l'analyse moléculaire permettrait de confirmer ou d'exclure un diagnostic de TH1 chez des cas ambigus au dépistage (SAC qualitatif code 50623 ou quantitatif sur sang séché code 50624). D'ailleurs, d'autres maladies peuvent présenter une élévation de succinylacétone, dont un déficit en maléylacétoacétate isomérase.
- ✓ L'analyse moléculaire permettrait le dépistage familial en cascade et le diagnostic prénatal.

4.7. Assurance qualité

La technique de séquençage de Sanger réalisée dans le laboratoire demandeur est soumise à un contrôle externe de la qualité (CAP-SEQ).

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Identification de mutations sur le gène *FAH* dans la TH1

Jusqu'à présent, 102 mutations différentes ont été identifiées sur le gène *FAH* chez des patients présentant des signes biochimiques ou cliniques de TH1 (annexe A). Comme illustré à la figure 2, ces mutations sont dispersées le long du gène, touchant les exons de même que des jonctions exons-introns. De ces mutations, 25 ont été caractérisées de défauts d'épissage, 48 de mutations faux-sens, 15 de mutations non-sens, 7 de délétions et 7 de mutations causant un changement du cadre de lecture.

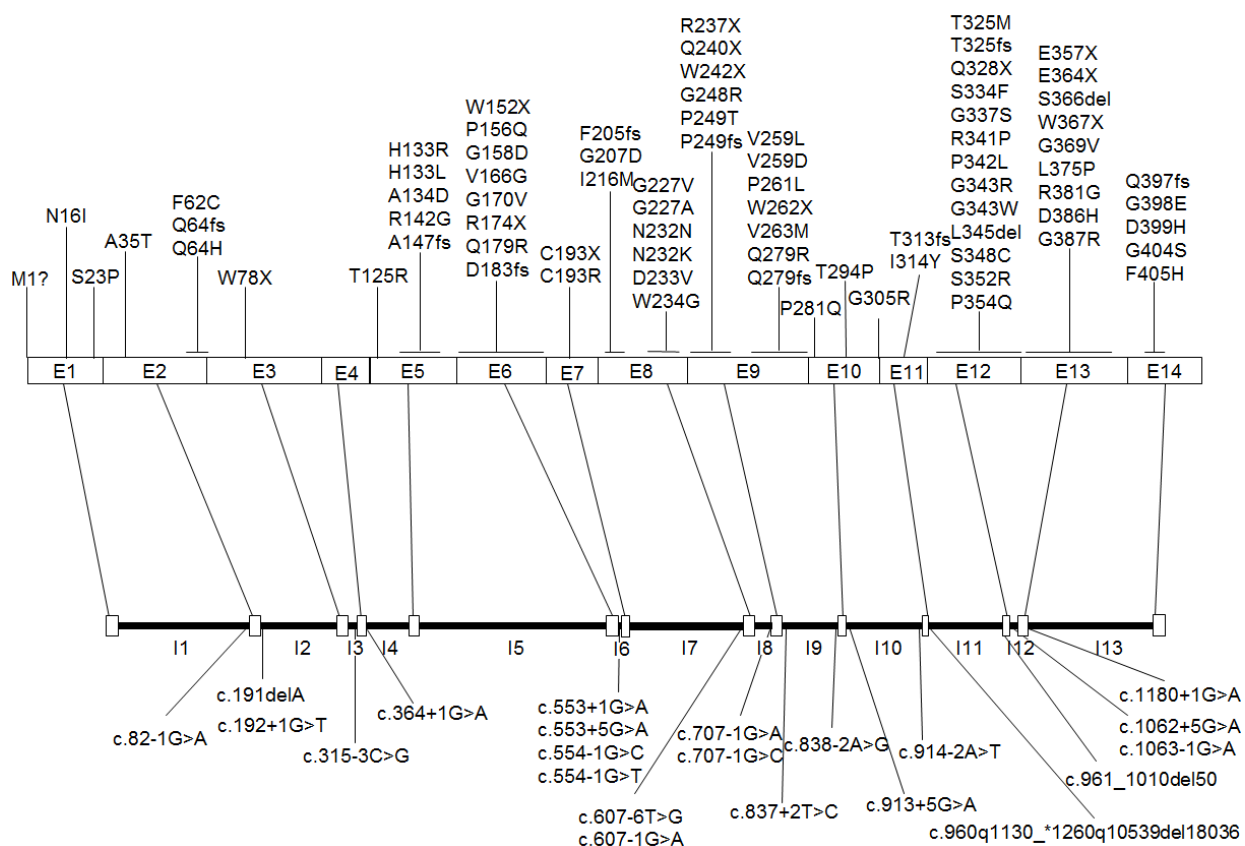


Figure 2 Représentation des 102 mutations identifiées sur le gène *FAH*

adaptée de Morrow et ses collaborateurs [2017].

Abréviations : E : exon ; I : intron.

* La variante W78X peut être causée par la mutation c. 233G>A ou c. 234G>A.

† La variante W152X peut être causée par la mutation c. 455G>A ou c. 456G>A.

* La variante G343R peut être causée par la mutation c. 1027G>C ou c. 1027G>A.

Jusqu'à présent, une seule variante du gène *FAH*, caractérisée de gène de pseudodéficiência, n'a pas été associée au phénotype clinique de TH1. Il s'agit de la mutation faux-sens c.1021C>T (p.Arg341Trp). Cette mutation a été rapportée une première fois chez une femme homozygote qui démontrait un niveau d'activité *FAH* réduit, mais légèrement supérieur à celui des patients TH1, sans aucune anomalie biochimique ou clinique suggestive de TH1 [Rootwelt *et al.*, 1994b; Kvittingen *et al.*, 1992; Kvittingen *et al.*, 1983].

Prédominance des mutations du gène *FAH* dans la TH1

Présentement, des 102 mutations répertoriées, seule la mutation canadienne-française est incluse dans le *Répertoire* pour la confirmation génétique du diagnostic de TH1. Cependant, d'autres mutations ont été répertoriées au Québec, dont les mutations : c.47A>T (p.Asn16Ile, 1 patient), c.786G>A (p.Trp262X, 1 patient), c.1069G>T (p.Glu357X, 5 patients), c.1090G>T (p.Glu364X, 7 patients) et c.1141A>G (p.Arg381Gly, 5 patients) [Angileri *et al.*, 2015]. De plus, certaines mutations démontrent une incidence plus élevée dans d'autres populations. Puisqu'environ 50 000 immigrants sont recensés annuellement au Québec (depuis les six dernières années)¹⁷, le séquençage du gène *FAH* pourrait permettre de confirmer un diagnostic chez l'ensemble des patients du Québec ne portant pas la mutation c.1062+5G>A (IVS12+5G>A).

La population québécoise, plus particulièrement celle de la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, est celle qui possède la plus forte incidence de TH1. Cette forte incidence s'explique par une prédominance de la mutation d'épissage c.1062+5G>A (IVS12+5G>A) qui représente environ 90 % des allèles TH1 au Québec [Angileri *et al.*, 2015; Poudrier *et al.*, 1996; De Braekeleer et Larochelle, 1990]. Cette mutation est également la plus commune mondialement, avec une fréquence estimée à 33 % des allèles TH1 (302/894 allèles), suivie de la mutation c.554-1G>T (IVS6-1G>T) (147/894 allèles TH1, 16 %) [Angileri *et al.*, 2015]. Ces deux mutations d'épissage, ensemble avec les mutations c.607-6T>G (IVS7-6T>G) et c.786G>A (p.Trp262X), comptent pour approximativement 60 % des allèles TH1 dans la population des États-Unis [Sniderman King *et al.*, 2006].

Une incidence élevée de TH1 est observée dans deux autres populations. Dans la région de l'Ostrobotnie¹⁸ en Finlande, l'incidence est de 1 individu sur 5 000 alors qu'elle est estimée à 1 individu sur 63 000 dans le pays entier [Mustonen *et al.*, 1997; St-Louis *et al.*, 1994]. La mutation en cause est la mutation faux-sens c.786G>A (p.Trp262X) [St-Louis *et al.*, 1994]. D'ailleurs, 40 des 53 allèles rapportés pour cette mutation ont été identifiés dans cette population [Angileri *et al.*, 2015]. De même, une prédominance de la mutation d'épissage c.192G>T (p.Gln64His) a été observée dans une population immigrante pakistanaise de la ville de Birmingham (Grande-Bretagne) [Angileri *et al.*, 2015]. Dans la région des *West Midlands* (dont fait partie Birmingham), 30 des 44 (68 %) patients ayant reçu un diagnostic de TH1 étaient d'origine pakistanaise et 5 des 12 (42 %) patients de ce groupe ethnique de la région portaient la mutation c.192G>T. La mutation n'a pas été détectée chez les patients des régions avoisinantes suggérant un effet fondateur de la région d'origine de cette population [Angileri *et al.*, 2015; Rootwelt *et al.*, 1996; Rootwelt *et al.*, 1994a].

En Norvège, la mutation prédominante du gène *FAH* est la mutation c.1062+5G>A (IVS12+5G>A) (40 %), suivie des mutations c.1009G>A (p.Gly337Ser) (27 %) et c.744delG (p.Pro249Hisfs) (14 %) [Blikrud *et al.*, 2012].

¹⁷ En 2017, Statistique Canada a recensé 52 399 immigrants [ISQ, 2018, p. 13].

¹⁸ Anciennement connue sous le nom de Pohjanmaa.

Par ailleurs, certaines mutations (en plus de la mutation c.192G>T) semblent exclusives aux individus d'une origine spécifique. Tel est le cas de la mutation c.698A>T (p.Asp233Val) rapportée en Turquie et de la mutation c.782C>T (p.Pro261Leu) identifiée chez des patients israéliens d'origine ashkénaze¹⁹ [Angileri *et al.*, 2015; Dursun *et al.*, 2011; Elpeleg *et al.*, 2002; Grenier *et al.*, 1996; Rootwelt *et al.*, 1996; Rootwelt *et al.*, 1994a].

En somme, les données épidémiologiques pourraient être utiles afin d'établir une stratégie de dépistage préférentiel pour les mutations prédominantes associées à une région ou une origine ethnique [Angileri *et al.*, 2015; De Laet *et al.*, 2013].

Utilité clinique du séquençage du gène *FAH*

La recherche documentaire a repéré trois cas de TH1 n'ayant pas été immédiatement identifiés par un dosage de SAc [Blackburn *et al.*, 2016; Cassiman *et al.*, 2009; Grenier *et al.*, 1996]. Cependant, ces cas ne représentent pas la situation actuelle au Québec, où le dépistage de la TH1 est bien établi. Les présentations de cas de Blackburn et de Cassiman et leurs collaborateurs impliquent des patients qui ont été diagnostiqués aux États-Unis alors que le cas de Grenier et ses collaborateurs date de 1996, époque depuis laquelle le dépistage et le diagnostic de la TH1 ont évolué.

Blackburn et ses collaborateurs [2016] ont décrit trois cas tardifs atypiques de TH1 survenus dans une même famille. Deux patientes avec un historique d'hépatosplénomégalie, de gonflement abdominal et de vomissements dans les premiers mois de vie ont reçu un diagnostic d'hépatocarcinome à l'âge de 12 et 13 ans. Une biopsie du foie d'une des deux patientes, à environ quatre mois de vie, a révélé une fibrose avec une augmentation de stockage de glycogène. Par conséquent, les enfants avaient reçu un diagnostic présomptif de trouble de stockage de glycogène de type III. Les deux patientes ont été suivies pendant quelques années et n'ont présenté aucune augmentation de la taille du foie ou de données de laboratoires anormales. À la suite du décès de sa sœur à 13 ans, une des deux patientes a été évaluée en prévision d'une greffe de foie. Les analyses ont montré des niveaux d'acides aminés urinaires et plasmatiques normaux et le SAc, habituellement diagnostic de TH1, n'était pas détectable dans l'urine de la patiente. Aucun autre métabolite anormal n'a été détecté. Un rétablissement a été observé chez la patiente après la greffe.

Le séquençage de l'exome complet de la patiente a révélé un statut homozygote pour une nouvelle mutation (c.424A>G, p.Arg142Gly). Les parents et un frère ont subséquemment été identifiés comme porteurs de l'altération, alors que la patiente décédée et un frère ayant montré des manifestations cliniques similaires à ses sœurs, ont été identifiés comme homozygotes.

Dans le cas de cette famille, l'analyse de SAc seule n'a pas permis de détecter les patients TH1. Un dépistage par l'analyse ciblée du gène *FAH* s'est avéré nécessaire et pourrait être justifié pour certains cas évocateurs de TH1.

L'étude de Cassiman [2009] rapporte un niveau urinaire indétectable de SAc chez un patient de quatre mois, malgré des niveaux de tyrosine et de méthionine plasmatiques fortement augmentés. Toutefois, le niveau de SAc plasmatique mesuré à ce moment était augmenté à 0,88 µmol/L comparativement aux valeurs normales (inférieures à 0,1 µmol/L). Au Québec, le dépistage néonatal est effectué sur un échantillon sanguin et

¹⁹ Désigne la population juive de l'Europe occidentale, centrale et orientale d'origine germanique.

le seuil utilisé est de 0,7 $\mu\text{mol/L}$ suggérant que ce cas aurait été détecté dans la situation actuelle [Giguère et Berthier, 2017].

Grenier et ses collaborateurs [1996] ont décrit un cas de diagnostic prénatal basé sur la mesure de SAc dans le liquide amniotique. L'analyse n'avait pas permis d'identifier le patient qui montrait pourtant des niveaux anormaux de SAc à quatre et six semaines de vie. À présent, le diagnostic prénatal se fait par une analyse génétique ciblée pour la mutation familiale connue. De plus, selon Giguère et Berthier [2017], aucun cas de TH1 n'a échappé au dépistage néonatal depuis 1998 au Québec.

5.2. Valeur pronostique

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

5.3. Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de permettre le choix ou la modification d'un traitement.

5.4. Validité analytique

Aucune étude de validation spécifique au séquençage du gène *FAH* par la technique de Sanger n'a été repérée par la recherche documentaire.

5.5. Données fournies par le demandeur

Le centre demandeur possède une certification (ISO 15189) pour la technique de séquençage de Sanger.

Les résultats de séquençage bidirectionnel fournis par le demandeur, illustrés à la figure 3, démontrent la capacité de l'analyse à différencier la séquence mutée de la séquence normale chez un patient TH1 portant deux mutations au niveau de l'exon 12 du gène *FAH*.

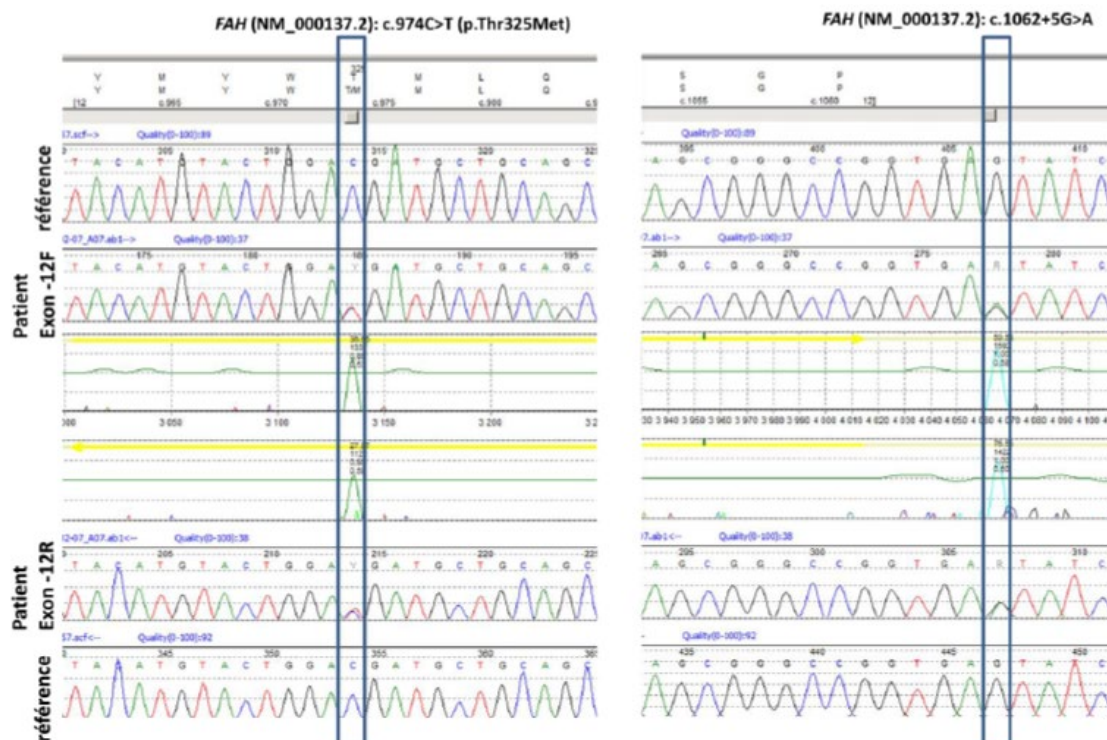


Figure 3 Séquençage de Sanger bidirectionnel de l'ADN d'un patient TH1 portant deux mutations dans l'exon 12 du gène *FAH*

Les boîtes mettent en évidence les substitutions de bases, comparativement à la séquence référence d'un individu sain, observées chez le patient TH1.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse permettant le séquençage du gène *FAH* dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1). Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée au tableau 3. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- ✓ L'analyse proposée cible les patients avec un diagnostic biochimique de TH1, identifiés ou non par un dépistage néonatal, qui ne sont pas homozygotes pour la mutation canadienne-française prédominante. Elle vise aussi les apparentés ainsi que les couples porteurs de la mutation en cours de grossesse envisageant le diagnostic prénatal.
- ✓ En 2016-17, l'analyse proposée a fait l'objet de 15 envois hors Québec pour un coût total de 14 404 \$. Cela représente un coût moyen de 960,27 \$ par analyse. Le rapatriement de l'ensemble de ces envois hors Québec est prévu dès la première année suivant l'ajout de l'analyse au *Répertoire*.
- ✓ En considérant le nombre d'envois hors Québec effectués au cours des dernières années, il est estimé que 20 analyses seraient réalisées au cours de chacune des trois prochaines années.
- ✓ La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 325,33.

- ✓ À la suite de l'introduction de cette analyse au *Répertoire*, aucune modification de la prise en charge des patients n'est anticipée.

Tableau 3 Coûts liés à l'introduction du séquençage du gène *FAH* dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1) au *Répertoire*

	An 1	An 2	An 3	Total
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout du séquençage du gène <i>FAH</i> dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1) au <i>Répertoire</i>				
Analyses hors Québec	15	15	15	45
Coûts	14 404 \$	14 404 \$	14 404 \$	43 212 \$
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout du séquençage du gène <i>FAH</i> dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1) au <i>Répertoire</i>				
Analyses séquençage gène <i>FAH</i>	20	20	20	60
Coûts	6 507 \$	6 507 \$	6 507 \$	19 521 \$
Impact net	-7 897 \$	-7 897 \$	-7 897 \$	-24 691 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, réduction de coûts le plus élevée			-34 922 \$
	Pour 3 ans, réduction de coûts le plus faible			-20 439 \$

Ainsi, l'ajout du séquençage du gène *FAH* dans la TH1 au *Répertoire* pourrait générer une réduction de coûts d'environ 25 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Planification familiale

L'identification de mutations causales de TH1 peut présenter des enjeux psychosociaux dus au risque élevé de transmission de la maladie dans les familles affectées ayant recours au dépistage prénatal. Celles-ci sont ensuite confrontées à la décision de poursuivre ou d'interrompre une grossesse.

Il existe depuis novembre 2010, dans la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean, un projet pilote de dépistage pour quatre maladies génétiques liées à un effet fondateur dont fait partie la TH1. Ce projet vise les individus qui considèrent une grossesse et les couples avec une grossesse en cours. Une étude a évalué l'expérience des couples porteurs identifiés par ce programme [Tardif *et al.*, 2018]. Cette étude a permis de décrire le processus émotionnel des couples à travers les étapes du procédé de dépistage. Les individus se sont dits d'abord peu inquiets et peu concernés avant le test. L'annonce d'un statut de couple porteur a provoqué un choc chez les individus, qui ont par la suite éprouvé des sentiments de surprise, de tristesse et de stress en lien avec des décisions de reproduction (surtout chez les couples avec une grossesse en cours). Les individus se sont ensuite adaptés à leur statut et se sont perçus plus aptes à prendre les décisions futures concernant la planification familiale. Malgré le choc initial, les couples ont reconnu l'importance du dépistage. Les huit couples présentant une grossesse à risque

élevé ont eu recours au diagnostic prénatal. Cette étude a montré l'importance de préparer les couples à un résultat positif de dépistage au cours de la session de conseil prétest.

Un diagnostic précoce permet de réduire le risque de complications chez les patients TH1

Le diagnostic prénatal (pour les grossesses de parents porteurs) et le dépistage néonatal sont fortement recommandés puisque les patients atteints de TH1 diagnostiqués tardivement ont un risque augmenté, de 2 à 13 fois selon l'âge auquel ils reçoivent un traitement, de développer un hépatocarcinome comparativement aux patients traités de manière néonatale [McKiernan, 2017]. Une étude européenne rétrospective de 168 patients a montré que les patients diagnostiqués via le dépistage sélectif sont moins fréquemment symptomatiques dans les premiers mois de vie que les patients plus âgés [Mayorandan *et al.*, 2014]. Plusieurs auteurs ont souligné l'importance d'un diagnostic et d'un traitement précoce chez les patients TH1 [Das, 2017; Zeybek *et al.*, 2015; Larochelle *et al.*, 2012].

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

Un groupe d'experts canadiens et américains expérimentés dans le soin des patients atteints de TH1 recommande l'analyse moléculaire du gène *FAH* pour la confirmation de TH1. Le groupe est d'avis que le conseil génétique devrait inclure l'accès aux analyses moléculaires ciblées pour la confirmation diagnostique, la détection de parents à risque et le diagnostic prénatal [Chinsky *et al.*, 2017].

Selon un groupe de travail européen et canadien sur la tyrosinémie, des études moléculaires génétiques peuvent être requises pour le conseil génétique, le diagnostic prénatal et le dépistage des apparentés [De Laet *et al.*, 2013].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Séquençage du gène *FAH* dans la tyrosinémie héréditaire de type 1

La recommandation de l'INESSS

- ☒ Pertinence clinique reconnue
- ☐ Pertinence clinique non reconnue

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Le laboratoire désigné devra produire un plan complet et détaillé de validation analytique et fournir les résultats lorsqu'ils seront disponibles, afin de compléter le processus d'introduction de l'analyse au Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale.

ANNEXE A

Description des 102 mutations rapportées sur le gène *FAH* chez des patients tyrosinémiques

Mutation	Protéine	Type	Caractéristiques (ARNm, protéine, activité)	Origine	Référence
c.1A>G	p.Met1Val	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Émirats arabes unis Grèce Arabie saoudite	Al-Shamsi <i>et al.</i> , 2014; Mohamed <i>et al.</i> , 2013; Imtiaz <i>et al.</i> , 2011; Georgouli <i>et al.</i> , 2010
c.47A>T	p.Asn16Ile	Faux-sens	Protéine absente	Canada français	Bergeron <i>et al.</i> , 2001; Phaneuf <i>et al.</i> , 1992
c.67T>C	p.Ser23Pro	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Asie Pakistan	Ijaz <i>et al.</i> , 2016; Heath <i>et al.</i> , 2002
c.82-1G>a	Protéine absente	Défaut d'épissage	Absence d'ARNm	Espagne	Perez-Carro <i>et al.</i> , 2014
c.103G>A	p.Ala35Thr	Faux-sens	ARNm normal Expression et activité fortement réduites	Belgique	Cassiman <i>et al.</i> , 2009
c.185T>G	p.Phe62Cys	Faux-sens	Protéine recombinante insoluble et inactive	Japon	Bergeron <i>et al.</i> , 2001; Awata <i>et al.</i> , 1994
c.191delA	p.Gln64fs	Délétion	Aucunes données expérimentales	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011
c.192G>T (IVS2-1G>T)	p.Gln64His	Défaut d'épissage	Protéine absente	Asie Inde Moyen-Orient Pakistan	Ijaz <i>et al.</i> , 2016; Angileri <i>et al.</i> , 2015; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994a
c.192+1G>T (IVS2+1G>T)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Portugal	Bergman <i>et al.</i> , 1998
c.233G>A	p.Trp78X	Non-sens	Aucunes données expérimentales sur la protéine	Espagne	Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.234G>A	p.Trp78X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Espagne	Couce <i>et al.</i> , 2011
c.315-3C>G (IVS3-3C>G)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011
c.364+1G>A (IVS4+1G>A)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Égypte/Arabie saoudite	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.374C>G	p.Thr125Arg	Faux-sens	Aucunes données	Égypte	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011

			expérimentales		
c.398A>G	p.His133Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Asie	Heath <i>et al.</i> , 2002
c.398A>T	p.His133Leu	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Espagne	Couce <i>et al.</i> , 2011
c.401C>A	p.Ala134Asp	Faux-sens	Protéine inactive	Norvège Turquie	Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994c; Labelle <i>et al.</i> , 1993
c.424A>G	p.Arg142Gly	Faux-sens	Présence de protéine en IH	États-Unis	Blackburn <i>et al.</i> , 2016
c.441_448del8	p.Ala147fs	Changement de cadre de lecture	Aucunes données expérimentales	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011
c.455G>A	p.Trp152X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Chine	Dou <i>et al.</i> , 2013; Yang <i>et al.</i> , 2012
c.456G>A	p.Trp152X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Canada français	Morrow <i>et al.</i> , 2017
c.467C>A	p.Pro156Gln	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Asie	Heath <i>et al.</i> , 2002
c.473G>A	p.Gly158Asp	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Allemagne	Bergman <i>et al.</i> , 1998
c.497T>G	p.Val166Gly	Faux-sens	Aucunes données expérimentales sur la protéine	Amérique du Nord Allemagne Iran Italie Turquie	Gokay <i>et al.</i> , 2016; Dursun <i>et al.</i> , 2011; Bergman <i>et al.</i> , 1998; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Grompe et al-Dhalimy, 1993
c.509G>T	p.Gly170Val	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Arabie saoudite	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.520C>T	p.Arg174X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Amérique du Nord Asie Turquie	Yang <i>et al.</i> , 2012; Dursun <i>et al.</i> , 2011; Heath <i>et al.</i> , 2002; Timmers et Grompe, 1996
c.548_553+20del26	p.Asp183fs	Délétion	Aucunes données expérimentales	République tchèque	Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.536A>G	p.Gln179Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Corée	Choi <i>et al.</i> , 2014
c.553+5G>A (IVS6+5G>A)	Protéine absente	Défaut d'épissage	ARNm anormal Protéine absente	Amérique	Timmers et Grompe, 1996
c.553+1G>A (IVS6+1G>A)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Canada français	Yang <i>et al.</i> , 2018
c.554-1G>C (IVS6-1G>C)	Protéine absente	Défaut d'épissage	Protéine absente	Yougoslavie	Bergman <i>et al.</i> , 1998
c.554-1G>T (IVS6-1G>T)	Aucune protéine	Défaut d'épissage	3 ARNm, chacun	Afrique	Gokay <i>et al.</i> , 2016;

	normale attendue		comportant une délétion de 5 nucléotides dans l'exon 7. Les 13 premiers nucléotides sont absents d'un transcrit et l'exon 8 est absent d'un autre transcrit.	Brésil République tchèque Europe France Hongrie Italie Maroc Amérique du Nord Grande-Bretagne Irlande Pakistan Inde Espagne Turquie Yougoslavie Grande-Bretagne	Mannion <i>et al.</i> , 2016; Angileri <i>et al.</i> , 2015; Nasrallah <i>et al.</i> , 2015; Laszlo <i>et al.</i> , 2013; Couce <i>et al.</i> , 2011; Dursun <i>et al.</i> , 2011; La Marca <i>et al.</i> , 2011; Vondrackova <i>et al.</i> , 2010; Arranz <i>et al.</i> , 2002; Kim <i>et al.</i> , 2000; Poudrier <i>et al.</i> , 1999; Bergman <i>et al.</i> , 1998; Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Timmers et Grompe, 1996
c.577T>C	p.Cys193Arg	Faux-sens	Protéine recombinante insoluble et inactive	Pays-Bas	Bergeron <i>et al.</i> , 2001; Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996
c.579C>A	p.Cys193X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	République tchèque	Vondrackova <i>et al.</i> , 2010
c.607-1G>A (IVS7-1G>A)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	ARNm avec une délétion d'un G au début de l'exon 8	Turquie	Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996
c.607G-6T>G (IVS7-6T>G)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	États-Unis	Sniderman King <i>et al.</i> , 2006
c.615delT	p.Phe205leufs	Changement de cadre de lecture	Changement de cadre de lecture menant à un codon STOP dans l'exon 8	Norvège	Blikrud <i>et al.</i> , 2012
c.620G>A	p.Gly207Asp	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Amérique du Nord	Timmers et Grompe, 1996
c.648C>G (IVS8-59C>G)	p.Ile126Met	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Inde	Sheth <i>et al.</i> , 2012
c.680G>C	p.Gly227Ala	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Égypte	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.680G>T	p.Gly227Val	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	République tchèque	Vondrackova <i>et al.</i> , 2010
c.696C>A	p.Asn232Lys	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011
c.696C>T (IVS8-11C>T)	p.Asn232Asn	Défaut d'épissage	Délétion de l'exon 8 dans l'ARNm	Pays-Bas	Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996
c.698A>T	p.Asp233Val	Faux-sens	Protéine recombinante	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011;

			inactive Expression et activité de la protéine réduites		Bergeron <i>et al.</i> , 2001; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994a
c.700T>G	p.Trp234Gly	Faux-sens	Protéine inactive	États-Unis	Bergeron <i>et al.</i> , 2001; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Hahn <i>et al.</i> , 1995
c.707-1G>A (IVS8-1G>A)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Délétion des exons 8 et 9 de l'ARNm	Égypte Arabie saoudite Espagne	Couce <i>et al.</i> , 2011; Imtiaz <i>et al.</i> , 2011; Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.707-1G>C (IVS8-1G>C)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Délétion des exons 8 et 9 de l'ARNm	Israël	Elpeleg <i>et al.</i> , 2002; Bergman <i>et al.</i> , 1998
c.709C>T	p.Arg237X	Non-sens	Niveau d'ARNm réduit	Asie Chine Maroc Pakistan Arabie saoudite Thaïlande Turquie Iran	Rafati <i>et al.</i> , 2016; Angileri <i>et al.</i> , 2015; Cao <i>et al.</i> , 2012; Dursun <i>et al.</i> , 2011; Imtiaz <i>et al.</i> , 2011; Jitraruch <i>et al.</i> , 2011; La Marca <i>et al.</i> , 2011; Heath <i>et al.</i> , 2002; Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996
c.718C>T	p.Gln240X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Iran	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.726G>A	p.Trp242X	Non-sens	Aucune protéine normale attendue	Grande-Bretagne	Angileri <i>et al.</i> , 2015
c.742G>A	p.Gly248Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Canada français	Morrow <i>et al.</i> , 2017
c.744delG	p.Pro249Hisfs	Changement de cadre de lecture	Changement de cadre de lecture menant à un codon STOP dans l'exon 10	Norvège	Blikrud <i>et al.</i> , 2012
c.745C>A	p.Pro249Thr	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Amérique du Nord	Timmers et Grompe, 1996
c.775G>C	p.Val259Leu	Défaut d'épissage	Activité FAH réduite lorsque qu'accompagnée de la mutation p.Gly398Glu	États-Unis	Timmers et Grompe, 1996
c.776T>A	p.Val259Asp	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011
c.782C>T	p.Pro261Leu	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Israël Arabie saoudite Égypte	Angileri <i>et al.</i> , 2015; Imtiaz <i>et al.</i> , 2011; Elpeleg <i>et al.</i> , 2002; Bergman <i>et al.</i> , 1998
c.786G>A	p.Trp262X	Non-sens	Protéine absente	Danemark Europe Finlande Canada français Norvège	Angileri <i>et al.</i> , 2015; Mustonen <i>et al.</i> , 1997; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994a; St-Louis <i>et al.</i> , 1994

				Pologne Grande-Bretagne États-Unis	
c.787G>A	p.Val263Met	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Arabie saoudite	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.835delC	p.Gln279Argfs	Changement de cadre de lecture	Changement de cadre de lecture menant à un codon STOP dans l'exon 10	Norvège	Blikrud <i>et al.</i> , 2012
c.836A>G (IVS9-2A>G)	p.Gln279Arg	Défaut d'épissage	Délétion des exons 8 et 9 de l'ARNm Protéine absente	Espagne États-Unis	Perez-Carro <i>et al.</i> , 2014; Heath <i>et al.</i> , 2002; Dreumont <i>et al.</i> , 2001; Kim <i>et al.</i> , 2000
c.837+2T>C (IVS9+2T>C)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Turquie	Dursun <i>et al.</i> , 2011
c.838-2A>G (IVS9-2A>G)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Grande-Bretagne Caucasienne	Angileri <i>et al.</i> , 2015; Heath <i>et al.</i> , 2002
c.843C>A (IVS9-5C>A)	p.Pro281Gln	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Arabie saoudite	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.880A>C	p.Thr294Pro	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Amérique du Nord France	Bergman <i>et al.</i> , 1998; Timmers et Grompe, 1996
c.913G>C (IVS10-1G>C)	p.Gly305Arg	Défaut d'épissage	Délétion de l'exon 10 de l'ARNm	Espagne	Perez-Carro <i>et al.</i> , 2014
c.913+5G>A (IVS10+5G>A)	p.Gly305Arg	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Corée	Choi <i>et al.</i> , 2014
c.914-2A>T (IVS10-2A>T)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Espagne	Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.938delC	p.Thr313Thrfs	Changement de cadre de lecture	Délétions des exons 12 à 14	Espagne	Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.939delC	p.Ile314Tyrfs	Changement de cadre de lecture	Aucunes données expérimentales	Espagne	Couce <i>et al.</i> , 2011
c.960q1130_*1260q10539del 18036	Aucune protéine normale attendue	Délétion	Délétion des exons 12 à 14	Corée	Park <i>et al.</i> , 2009
c.961_1010del50	p.Gly337Ser	Délétion	Deux transcrits d'ARN anormaux et un normal	Iran Europe (nord)	Prieto-Alamo et Laval, 1998; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994d
c.974C>T	p.Thr325Met	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Espagne Grande-Bretagne Caucasienne	Angileri <i>et al.</i> , 2015; Couce <i>et al.</i> , 2011; Heath <i>et al.</i> , 2002
c.974_976delCGAinsGC	p.Thr325fs	Délétion	Aucunes données	Chine	Yang <i>et al.</i> , 2012

			expérimentales		
c.982C>T	p.Gln328X	Non-sens	ARNm normal Aucunes données expérimentales sur la protéine	Espagne	Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.1001C>T	p.Ser334Phe	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Arabie saoudite	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.1009G>A	p.Gly337Ser	Faux-sens	Protéine absente	Autriche France Iran Norvège Europe (nord) Portugal Espagne	Haghighi-Kakhki <i>et al.</i> , 2014; Blikrud <i>et al.</i> , 2012; Blikrud <i>et al.</i> , 2005; Bergman <i>et al.</i> , 1998; Prieto-Alamo et Laval, 1998; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; St-Louis <i>et al.</i> , 1995; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994b; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994d
c.1022G>C	p.Arg341Pro	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Égypte	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.1025C>T	p.Pro342Leu	Faux-sens	Protéine absente	Grèce Norvège États-Unis	Radzhabova <i>et al.</i> , 2016*; Bergman <i>et al.</i> , 1998; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994c
c.1027G>T	p.Gly343Trp	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Espagne	Arranz <i>et al.</i> , 2002
c.1027G>A	p.Gly343Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Chine	Dou <i>et al.</i> , 2013; Yang <i>et al.</i> , 2012
c.1027G>C	p.Gly343Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Égypte	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.1035_1037del	p.Leu345del	Délétion	Aucunes données expérimentales	Chine	Mak <i>et al.</i> , 2013
c.1043C>G	p.Ser348Gly	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Europe (nord)	Prieto-Alamo et Laval, 1998
c.1056C>A	p.Ser352Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Asie	Heath <i>et al.</i> , 2002
c.1061C>A	p.Pro354Gln	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Norvège	Blikrud <i>et al.</i> , 2005
c.1062+5G>A (IVS12+5G>A)	p.Ser348Gly	Défaut d'épissage	Aucun ARNm normal Protéine absente	Asie Canada République tchèque Danemark Europe Finlande Canada français	Ijaz <i>et al.</i> , 2016; Mannion <i>et al.</i> , 2016; Angileri <i>et al.</i> , 2015; Perez-Carro <i>et al.</i> , 2014; Couce <i>et al.</i> , 2011; Dursun <i>et al.</i> , 2011; Imtiaz <i>et al.</i> , 2011; Vondrackova <i>et al.</i> , 2010; Ferrer-Bolufier

				France Allemagne Inde Iran Israël Mexique Pays-Bas Norvège Pakistan Portugal Espagne Turquie Grande-Bretagne Irlande États-Unis	<i>et al.</i> , 2009; Arranz <i>et al.</i> , 2002; Elpeleg <i>et al.</i> , 2002; Heath <i>et al.</i> , 2002; Bergman <i>et al.</i> , 1998; Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996; Poudrier <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Timmers et Grompe, 1996; Hahn <i>et al.</i> , 1995; Grompe <i>et al.</i> , 1994; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994d; Grompe et al-Dhalimy, 1993
c.1063-1G>A (IVS12-1G>A)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Les auteurs suggèrent qu'un site d'épissage accepteur est perdu (basé sur une analyse <i>in silico</i>)	Chine	Mak <i>et al.</i> , 2013
c.1069G>T	p.Glu357X	Non-sens	Protéine absente	Canada français Pays-Bas Norvège Pologne Grande-Bretagne Irlande Caucasienne	Mannion <i>et al.</i> , 2016; Angileri <i>et al.</i> , 2015; Heath <i>et al.</i> , 2002; Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; St-Louis <i>et al.</i> , 1995; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994d; Grompe et al-Dhalimy, 1993
c.1090G>T	p.Glu364X	Non-sens	Protéine absente	Canada français Grande-Bretagne États-Unis Pays-Bas Belgique	Poudrier <i>et al.</i> , 1999; Bergman <i>et al.</i> , 1998; Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996; Rootwelt <i>et al.</i> , 1996; Timmers et Grompe, 1996; Grompe <i>et al.</i> , 1994; Rootwelt <i>et al.</i> , 1994d; Grompe et al-Dhalimy, 1993
c.1097_1099delCGT	p.Ser366del	Délétion en cadre de lecture	Aucunes données expérimentales	Italie Pays-Bas	Bergman <i>et al.</i> , 1998
c.1100G>A	p.Trp367X	Non-sens	Aucunes données expérimentales	Chine	Yang <i>et al.</i> , 2012
c.1106G>T	p.Gly369Val	Faux-sens	ARNm normal Aucunes données expérimentales sur la protéine	Maroc	Ploos van Amstel <i>et al.</i> , 1996

c.1124T>C	p.Leu375Pro	Faux-sens	ARNm normal	Chine	Cao <i>et al.</i> , 2012
c.1141A>G	p.Arg381Gly	Faux-sens	Protéine absente	Canada français Portugal	St-Louis <i>et al.</i> , 1995
c.1156G>C	p.Asp386His	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Émirats arabes unis	Al-Shamsi <i>et al.</i> , 2014
c.1159G>A	p.Gly387Arg	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Inde	Sheth <i>et al.</i> , 2012
c.1180+1G>A (IVS13+1G>A)	Aucune protéine normale attendue	Défaut d'épissage	Aucunes données expérimentales	Canada français	Morrow <i>et al.</i> , 2017
c.1190delA	p.Glu397fs	Changement de cadre de lecture	Protéine allongée de 41 acides aminés	Égypte	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.1193G>A	p.Gly398Glu	Faux-sens	Protéine absente	Canada français	Morrow <i>et al.</i> , 2017
c.1195G>C	p.Asp399His	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Arabie saoudite	Imtiaz <i>et al.</i> , 2011
c.1210G>A	p.gly404Ser	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Irlande	Mannion <i>et al.</i> , 2016
c.1213_1214delTTinsCA	p.Phe405His	Faux-sens	Aucunes données expérimentales	Portugal	Bergman <i>et al.</i> , 1998

* La référence de Radzhabova et ses collaborateurs [2016] correspond à un résumé de conférence.

RÉFÉRENCES

- Al-Shamsi A, Hertecant JL, Al-Hamad S, Souid AK, Al-Jasmi F. Mutation spectrum and birth prevalence of inborn errors of metabolism among Emiratis: A study from Tawam Hospital Metabolic Center, United Arab Emirates. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2014;14(1):e42-9.
- Angileri F, Bergeron A, Morrow G, Lettre F, Gray G, Hutchin T, et al. Geographical and ethnic distribution of mutations of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in hereditary tyrosinemia type 1. *JIMD Rep* 2015;19:43-58.
- Arranz JA, Piñol F, Kozak L, Perez-Cerda C, Cormand B, Ugarte M, Riudor E. Splicing mutations, mainly IVS6-1(G>T), account for 70% of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) gene alterations, including 7 novel mutations, in a survey of 29 tyrosinemia type I patients. *Hum Mutat* 2002;20(3):180-8.
- Awata H, Endo F, Tanoue A, Kitano A, Nakano Y, Matsuda I. Structural organization and analysis of the human fumarylacetoacetate hydrolase gene in tyrosinemia type I. *Biochim Biophys Acta* 1994;1226(2):168-72.
- Bartlett DC, Lloyd C, McKiernan PJ, Newsome PN. Early nitisinone treatment reduces the need for liver transplantation in children with tyrosinaemia type 1 and improves post-transplant renal function. *J Inherit Metab Dis* 2014;37(5):745-52.
- Bay A, Karaoglu O, Sivasli E, Leblebisatan G, Keskin M. An infant with prolonged circumcision bleeding and unexplained coagulopathy. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2012;28(3):181-3.
- Bergeron A, D'Astous M, Timm DE, Tanguay RM. Structural and functional analysis of missense mutations in fumarylacetoacetate hydrolase, the gene deficient in hereditary tyrosinemia type 1. *J Biol Chem* 2001;276(18):15225-31.
- Bergman AJ, van den Berg IE, Brink W, Poll-The BT, Ploos van Amstel JK, Berger R. Spectrum of mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of tyrosinemia type 1 patients in northwestern Europe and Mediterranean countries. *Hum Mutat* 1998;12(1):19-26.
- Blackburn PR, Hickey RD, Nace RA, Giama NH, Kraft DL, Bordner AJ, et al. Silent tyrosinemia type I without elevated tyrosine or succinylacetone associated with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat* 2016;37(10):1097-105.
- Bliksrud YT, Brodtkorb E, Backe PH, Woldseth B, Rootwelt H. Hereditary tyrosinaemia type I in Norway: Incidence and three novel small deletions in the fumarylacetoacetase gene. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72(5):369-73.
- Bliksrud YT, Brodtkorb E, Andresen PA, van den Berg IE, Kvittingen EA. Tyrosinaemia type I—De novo mutation in liver tissue suppressing an inborn splicing defect. *J Mol Med (Berl)* 2005;83(5):406-10.
- Cao YY, Zhang YL, Du J, Qu YJ, Zhong XM, Bai JL, Song F. Compound mutations (R237X and L375P) in the fumarylacetoacetate hydrolase gene causing tyrosinemia type I in a Chinese patient. *Chin Med J (Engl)* 2012;125(12):2132-6.

- Cassiman D, Zeevaert R, Holme E, Kvittingen EA, Jaeken J. A novel mutation causing mild, atypical fumarylacetoacetase deficiency (Tyrosinemia type I): A case report. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:28.
- Castilloux J, Laberge AM, Martin SR, Lallier M, Marchand V. "Silent" tyrosinemia presenting as hepatocellular carcinoma in a 10-year-old girl. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44(3):375-7.
- Chinsky JM, Singh R, Ficicioglu C, van Karnebeek CDM, Grompe M, Mitchell G, et al. Diagnosis and treatment of tyrosinemia type I: A US and Canadian consensus group review and recommendations. *Genet Med* 2017;19(12)
- Choi HJ, Bang HI, Ki CS, Lee SY, Kim JW, Song J, et al. Two novel FAH gene mutations in a patient with hereditary tyrosinemia type I. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44(3):317-23.
- Couce ML, Dalmau J, del Toro M, Pintos-Morell G, Aldamiz-Echevarria L. Tyrosinemia type 1 in Spain: Mutational analysis, treatment and long-term outcome. *Pediatr Int* 2011;53(6):985-9.
- Das AM. Clinical utility of nitisinone for the treatment of hereditary tyrosinemia type-1 (HT-1). *Appl Clin Genet* 2017;10:43-8.
- De Braekeleer M et Larochelle J. Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Saguenay-Lac-St-Jean. *Am J Hum Genet* 1990;47(2):302-7.
- De Laet C, Dionisi-Vici C, Leonard JV, McKiernan P, Mitchell G, Monti L, et al. Recommendations for the management of tyrosinaemia type 1. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:8.
- Dou LM, Fang LJ, Wang XH, Lu W, Chen R, Li LT, et al. [Mutation analysis of FAH gene in patients with tyrosinemia type 1] (article en chinois). *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2013;51(4):302-7.
- Dreumont N, Poudrier JA, Bergeron A, Levy HL, Baklouti F, Tanguay RM. A missense mutation (Q279R) in the fumarylacetoacetate hydrolase gene, responsible for hereditary tyrosinemia, acts as a splicing mutation. *BMC Genet* 2001;2:9.
- Dursun A, Ozgöl RK, Sivri S, Tokatli A, Guzel A, Mesci L, et al. Mutation spectrum of fumarylacetoacetase gene and clinical aspects of tyrosinemia type I disease. *JIMD Rep* 2011;1:17-21.
- Elpeleg ON, Shaag A, Holme E, Zughayar G, Ronen S, Fisher D, Hurvitz H. Mutation analysis of the FAH gene in Israeli patients with tyrosinemia type I. *Hum Mutat* 2002;19(1):80-1.
- Ferrer-Bolufer I, Dalmau J, Quiroga R, Oltra S, Orellana C, Monfort S, et al. Tyrosinemia type 1 and Angelman syndrome due to paternal uniparental isodisomy 15. *J Inherit Metab Dis* 2009;32(Suppl 1):S349-53.
- Forget S, Patriquin HB, Dubois J, Lafortune M, Merouani A, Paradis K, Russo P. The kidney in children with tyrosinemia: Sonographic, CT and biochemical findings. *Pediatr Radiol* 1999;29(2):104-8.

- Georgouli H, Schulpis KH, Michelakaki H, Kaltsa M, Sdogou T, Kossiva L. Persistent coagulopathy during Escherichia coli sepsis in a previously healthy infant revealed undiagnosed tyrosinaemia type 1. *BMJ Case Rep* 2010;2010:bcr0720103150.
- Giguère Y et Berthier MT. Newborn screening for hereditary tyrosinemia type I in Québec: Update. *Adv Exp Med Biol* 2017;959:139-46.
- Gokay S, Ustkoyuncu PS, Kardas F, Kendirci M. The outcome of seven patients with hereditary tyrosinemia type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2016;29(10):1151-7.
- Grenier A, Cederbaum S, Laberge C, Gagné R, Jakobs C, Tanguay RM. A case of tyrosinaemia type I with normal level of succinylacetone in the amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1996;16(3):239-42.
- Grompe M et al-Dhalimy M. Mutations of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in four patients with tyrosinemia, type I. *Hum Mutat* 1993;2(2):85-93.
- Grompe M, St-Louis M, Demers SI, al-Dhalimy M, Leclerc B, Tanguay RM. A single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I. *N Engl J Med* 1994;331(6):353-7.
- Haghighi-Kakhki H, Rezazadeh J, Ahmadi-Shadmehri A. Identification of a combined missense/splice-site mutation in FAH causing tyrosinemia type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27(7-8):795-8.
- Hahn SH, Krasnewich D, Brantly M, Kvittingen EA, Gahl WA. Heterozygosity for an exon 12 splicing mutation and a W234G missense mutation in an American child with chronic tyrosinemia type 1. *Hum Mutat* 1995;6(1):66-73.
- Heath SK, Gray RG, McKiernan P, Au KM, Walker E, Green A. Mutation screening for tyrosinaemia type I. *J Inher Metab Dis* 2002;25(6):523-4.
- Hutchesson AC, Hall SK, Preece MA, Green A. Screening for tyrosinaemia type I. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;74(3):F191-4.
- Ijaz S, Zahoor MY, Imran M, Afzal S, Bhinder MA, Ullah I, et al. Direct sequencing of FAH gene in Pakistani tyrosinemia type 1 families reveals a novel mutation. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2016;29(3):327-32.
- Imtiaz F, Rashed MS, Al-Mubarak B, Allam R, El-Karakasy H, Al-Hassnan Z, et al. Identification of mutations causing hereditary tyrosinemia type I in patients of Middle Eastern origin. *Mol Genet Metab* 2011;104(4):688-90.
- Institut de la statistique du Québec (ISQ). Tableau statistique canadien. Québec, Qc : ISQ; 2018. Disponible à : <http://www.stat.gouv.qc.ca/statistiques/economie/comparaisons-economiques/interprovinciales/tableau-statistique-canadien.pdf>.
- Institut d'excellence en santé et en services sociaux (ISQ). Orfadin^{MC} – Tyrosinémie héréditaire de type 1. Québec, Qc : INESSS; 2017. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Aout_2017/Orfadin_2017_08.pdf.

- Jitraruch S, Treepongkaruna S, Teeraratkul S, Wattanasirichaigoon D, Leelaudomlapi S, Sornmayura P, et al. Long-term outcome of living donor liver transplantation in a Thai boy with hereditary tyrosinemia type I: A case report. *J Med Assoc Thai* 2011;94(10):1276-80.
- Kim SZ, Kupke KG, Ierardi-Curto L, Holme E, Greter J, Tanguay RM, et al. Hepatocellular carcinoma despite long-term survival in chronic tyrosinaemia I. *J Inherit Metab Dis* 2000;23(8):791-804.
- Knox WE et Edwards SW. Enzymes involved in conversion of tyrosine to acetoacetate. *Methods Enzymol* 1955;2:287-300.
- Kvittingen EA, Rootwelt H, van Dam T, van Faassen H, Berger R. Hereditary tyrosinemia type I: Lack of correlation between clinical findings and amount of immunoreactive fumarylacetoacetase protein. *Pediatr Res* 1992;31(1):43-6.
- Kvittingen EA, Halvorsen S, Jellum E. Deficient fumarylacetoacetate fumarylhydrolase activity in lymphocytes and fibroblasts from patients with hereditary tyrosinemia. *Pediatr Res* 1983;17(7):541-4.
- Kvittingen EA, Jellum E, Stokke O. Assay of fumarylacetoacetate fumarylhydrolase in human liver-deficient activity in a case of hereditary tyrosinemia. *Clin Chim Acta* 1981;115(3):311-9.
- La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Cavicchi C, Morrone A, Ciani F, et al. Newborn screening for tyrosinemia type I: Further evidence that succinylacetone determination on blood spot is essential. *JIMD Rep* 2011;1:107-9.
- Labelle Y, Phaneuf D, Leclerc B, Tanguay RM. Characterization of the human fumarylacetoacetate hydrolase gene and identification of a missense mutation abolishing enzymatic activity. *Hum Mol Genet* 1993;2(7):941-6.
- Laberge C. Hereditary tyrosinemia in a French Canadian isolate. *Am J Hum Genet* 1969;21(1):36-45.
- Larochelle J, Alvarez F, Bussi res JF, Chevalier I, Dallaire L, Dubois J, et al. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Québec. *Mol Genet Metab* 2012;107(1-2):49-54.
- Laszlo A, Rozsa M, Sallay E, Tiszlavicz L, Janovszky A, Varkonyi A, et al. The fate of tyrosinaemic Hungarian patients before the NTBC era. *Ideggyogy Sz* 2013;66(11-12):415-9.
- Lindblad B, Lindstedt S, Steen G. On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(10):4641-5.
- Maiorana A, Malamisura M, Emma F, Boenzi S, Di Ciommo VM, Dionisi-Vici C. Early effect of NTBC on renal tubular dysfunction in hereditary tyrosinemia type 1. *Mol Genet Metab* 2014;113(3):188-93.
- Mak CM, Lam CW, Chim S, Siu TS, Ng KF, Tam S. Biochemical and molecular diagnosis of tyrosinemia type I with two novel FAH mutations in a Hong Kong chinese patient: Recommendation for expanded newborn screening in Hong Kong. *Clin Biochem* 2013;46(1-2):155-9.

- Mannion MA, Smith A, Mayne P, Monavari AA. Type 1 Tyrosinaemia. *Ir Med J* 2016;109(6):426.
- Mayorandan S, Meyer U, Gokcay G, Segarra NG, de Baulny HO, van Spronsen F, et al. Cross-sectional study of 168 patients with hepatorenal tyrosinaemia and implications for clinical practice. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:107.
- McKiernan P. Liver transplantation for hereditary tyrosinaemia type 1 in the United Kingdom. *Adv Exp Med Biol* 2017;959:85-91.
- Mohamed S, Kambal MA, Al Jurayyan NA, Al-Nemri A, Babiker A, Hasanato R, Al-Jarallah AS. Tyrosinemia type 1: A rare and forgotten cause of reversible hypertrophic cardiomyopathy in infancy. *BMC Res Notes* 2013;6:362.
- Morrow G, Angileri F, Tanguay RM. Molecular aspects of the FAH mutations involved in HT1 disease. *Adv Exp Med Biol* 2017;959:25-48.
- Mustonen A, Ploos van Amstel HK, Berger R, Salo MK, Viinikka L, Simola KO. Mutation analysis for prenatal diagnosis of hereditary tyrosinaemia type 1. *Prenat Diagn* 1997;17(10):964-6.
- Nasrallah F, Hammami MB, Ben Rhouma H, Fradj SH, Azzouz H, Omar S, et al. Clinical and biochemical profile of tyrosinemia type 1 in Tunisia. *Clin Lab* 2015;61(5-6):487-92.
- Park HD, Lee DH, Choi TY, Lee YK, Kim JW, Ki CS, Lee YW. Clinical, biochemical, and genetic analysis of a Korean neonate with hereditary tyrosinemia type 1. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(8):930-3.
- Perez-Carro R, Sanchez-Alcudia R, Perez B, Navarrete R, Perez-Cerda C, Ugarte M, Desviat LR. Functional analysis and in vitro correction of splicing FAH mutations causing tyrosinemia type I. *Clin Genet* 2014;86(2):167-71.
- Phaneuf D, Lambert M, Laframboise R, Mitchell G, Lettre F, Tanguay RM. Type 1 hereditary tyrosinemia. Evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in a French Canadian patient. *J Clin Invest* 1992;90(4):1185-92.
- Phaneuf D, Labelle Y, Bérubé D, Arden K, Cavenee W, Gagné R, Tanguay RM. Cloning and expression of the cDNA encoding human fumarylacetoacetate hydrolase, the enzyme deficient in hereditary tyrosinemia: Assignment of the gene to chromosome 15. *Am J Hum Genet* 1991;48(3):525-35.
- Ploos van Amstel JK, Bergman AJ, van Beurden EA, Roijers JF, Peelen T, van den Berg IE, et al. Hereditary tyrosinemia type 1: Novel missense, nonsense and splice consensus mutations in the human fumarylacetoacetate hydrolase gene; variability of the genotype-phenotype relationship. *Hum Genet* 1996;97(1):51-9.
- Poudrier J, Lettre F, St-Louis M, Tanguay RM. Genotyping of a case of tyrosinaemia type I with normal level of succinylacetone in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1999;19(1):61-3.
- Poudrier J, St-Louis M, Lettre F, Gibson K, Prévost C, Larochelle J, Tanguay RM. Frequency of the IVS12 + 5G→A splice mutation of the fumarylacetoacetate

- hydrolase gene in carriers of hereditary tyrosinaemia in the French Canadian population of Saguenay-Lac-St-Jean. *Prenat Diagn* 1996;16(1):59-64.
- Prieto-Alamo MJ et Laval F. Deficient DNA-ligase activity in the metabolic disease tyrosinemia type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(21):12614-8.
- Radzhabova GM, Baydakova GV, Melikyan LP, Bychkov IO, Dzhunidova LL, Zakharova EY. High prevalence of tyrosinemia type I in Chechen Republic in Russia. *J Inherit Metab Dis* 2016;39(Suppl 1):S119 [abstract P-210].
- Rafati M, Mohamadhashem F, Hoseini A, Ramandi SD, Ghaffari SR. Prenatal diagnosis of tyrosinemia type 1 using next generation sequencing. *Fetal Pediatr Pathol* 2016;35(4):282-5.
- Rootwelt H, Høie K, Berger R, Kvittingen EA. Fumarylacetoacetase mutations in tyrosinaemia type I. *Hum Mutat* 1996;7(3):239-43.
- Rootwelt H, Berger R, Gray G, Kelly DA, Coskun T, Kvittingen EA. Novel splice, missense, and nonsense mutations in the fumarylacetoacetase gene causing tyrosinemia type 1. *Am J Hum Genet* 1994a;55(4):653-8.
- Rootwelt H, Brodtkorb E, Kvittingen EA. Identification of a frequent pseudodeficiency mutation in the fumarylacetoacetase gene, with implications for diagnosis of tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet* 1994b;55(6):1122-7.
- Rootwelt H, Chou J, Gahl WA, Berger R, Coskun T, Brodtkorb E, Kvittingen EA. Two missense mutations causing tyrosinemia type 1 with presence and absence of immunoreactive fumarylacetoacetase. *Hum Genet* 1994c;93(6):615-9.
- Rootwelt H, Kristensen T, Berger R, Høie K, Kvittingen EA. Tyrosinemia type 1 – Complex splicing defects and a missense mutation in the fumarylacetoacetase gene. *Hum Genet* 1994d;94(3):235-9.
- Sheth JJ, Ankleshwaria CM, Pawar R, Sheth FJ. Identification of novel mutations in FAH gene and prenatal diagnosis of tyrosinemia in Indian family. *Case Rep Genet* 2012;2012:428075.
- Sniderman King L, Trahms C, Scott CR. Tyrosinemia type I. Dans : Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., réd. *GeneReviews* [Internet]. Seattle, WA : University of Washington; 2006. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301688>.
- St-Louis M, Poudrier J, Phaneuf D, Leclerc B, Laframboise R, Tanguay RM. Two novel mutations involved in hereditary tyrosinemia type I. *Hum Mol Genet* 1995;4(2):319-20.
- St-Louis M, Leclerc B, Laine J, Salo MK, Holmberg C, Tanguay RM. Identification of a stop mutation in five Finnish patients suffering from hereditary tyrosinemia type I. *Hum Mol Genet* 1994;3(1):69-72.
- Tanguay RM, Valet JP, Lescault A, Duband JL, Laberge C, Lettre F, Plante M. Different molecular basis for fumarylacetoacetate hydrolase deficiency in the two clinical forms of hereditary tyrosinemia (type I). *Am J Hum Genet* 1990;47(2):308-16.

- Tardif J, Pratte A, Laberge AM. Experience of carrier couples identified through a population-based carrier screening pilot program for four founder autosomal recessive diseases in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Prenat Diagn* 2018;38(1):67-74.
- Timmers C et Grompe M. Six novel mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of patients with hereditary tyrosinemia type I. *Hum Mutat* 1996;7(4):367-9.
- Van Spronsen FJ, Thomasse Y, Smit GP, Leonard JV, Clayton PT, Fidler V, et al. Hereditary tyrosinemia type I: A new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment. *Hepatology* 1994;20(5):1187-91.
- Vondrackova A, Tesarova M, Magner M, Docekalo D, Chrastina P, Prochazkova D, et al. [Clinical, biochemical and molecular characteristics in 11 Czech children with tyrosinemia type I] (article en tchèque). *Cas Lek Cesk* 2010;149(9):411-6.
- Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J Pediatr* 1976;88(3):434-8.
- Yang H, Rossignol F, Cyr D, Laframboise R, Wang SP, Soucy JF, et al. Mildly elevated succinylacetone and normal liver function in compound heterozygotes with pathogenic and pseudodeficient FAH alleles. *Mol Genet Metab Rep* 2018;14:55-8.
- Yang N, Han LS, Ye J, Qiu WJ, Zhang HW, Gong ZW, et al. [Analysis of clinical data and genetic mutations in three Chinese patients with tyrosinemia type I] (article en chinois). *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012;29(6):648-52.
- Zeybek AC, Kiykim E, Soyucen E, Cansever S, Altay S, Zubarioglu T, et al. Hereditary tyrosinemia type 1 in Turkey: Twenty year single-center experience. *Pediatr Int* 2015;57(2):281-9.

STRATIFICATION PRONOSTIQUE DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES AIGÜES PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION – PANEL DE GÈNES – AJOUT DU GÈNE ASXL1 (RÉFÉRENCE°–°2015.01.003)

Avis d'évaluation — Addenda concernant l'ajout du gène ASXL1

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal

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

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

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

Le Dr Busque n'a pas participé aux délibérations et s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

- D^r Olivier LaRoche, hémato-oncologue au CHU de Québec – Université Laval.
- D^r Sébastien Chénier, généticien au CHUS – Hôpital Fleurimont.

2. INTRODUCTION

L'avis intitulé *Stratification des leucémies myéloïdes aiguës par séquençage de nouvelle génération – Panel de gènes* a été transmis au ministre de la Santé et des Services sociaux le 2 mai 2016 et publié le 30 juin suivant. Cet avis avait pour objectif d'évaluer l'ajout au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* d'une nouvelle analyse permettant de stratifier le pronostic des leucémies myéloïdes aiguës (LMA) par séquençage de nouvelle génération (SNG) avec un panel de gènes. La population ciblée par cette analyse concerne des patients nouvellement diagnostiqués avec la LMA, âgés de 65 ans et moins, et qui sont admissibles à une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

La stratification pronostique des LMA par SNG a pour objectif de préciser, en combinaison avec l'analyse cytogénétique, le pronostic des patients souffrant de LMA, présentant un caryotype normal et classés dans la catégorie « à risque intermédiaire ».

Dans son avis, l'INESSS a recommandé de regrouper dans le même panel d'analyse les gènes *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *KIT*, *RUNX1* et *TP53*, et d'effectuer une veille documentaire pour les gènes *TET2*, *IDH2* et *ASXL1*.

Depuis la publication de l'avis, de nouvelles recommandations de l'European LeukemiaNet (ELN) sont parues en janvier 2017 et incluent dorénavant le gène *ASXL1* dans la liste des gènes susceptibles de contribuer à la stratification des LMA. Dans ce sens, de nouvelles études ont également été publiées à propos de l'effet pronostique des mutations du gène *ASXL1*.

L'objectif du présent addenda est donc d'actualiser, à la lumière des plus récentes données de la littérature, l'ajout du gène *ASXL1* dans le panel de gènes dédié à la stratification des LMA par SNG.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) est réalisé à l'aide du système Ion Torrent^{MC} PGM (Life Technologies). La recherche de mutations est effectuée avec le panel de gènes Ion AmpliSeq^{MC} AML (Life Technologies) qui compte 19 gènes, dont *ASXL1* et les 6 gènes recommandés dans l'avis de juin 2016 (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *KIT*, *RUNX1* et *TP53*).

4. DONNÉES PUBLIÉES

4.1. Valeur pronostique

Depuis la parution de l'avis *Stratification des leucémies myéloïdes aiguës par séquençage de nouvelle génération – Panel de gènes* en juin 2016, trois études de cohorte [Papaemmanuil *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2016; Paschka *et al.*, 2015] et des recommandations d'un groupe d'experts internationaux reconnus en leucémie aiguë [Döhner *et al.*, 2017] ont été repérées.

Les mutations du gène *ASXL1* sont plus fréquentes chez les patients plus âgés

Parmi leur cohorte âgée de 18 à 61 ans, Paschka et ses collaborateurs ont montré que la présence de mutations du gène *ASXL1* est associée ($p < 0,0001$) à l'augmentation de l'âge des patients diagnostiqués avec une LMA (tableau 1). L'étude de Tsai a également montré que les mutations du gène *ASXL1* sont plus communes chez les patients plus âgés, avec 18 % chez les 60 à 90 ans par rapport à 7 % chez les 15 à 59 ans, $p < 0,001$ (tableau 2). En effet, les patients plus âgés montrent une moins bonne survie médiane globale que les plus jeunes, soit 10 mois pour les patients de 60 ans et plus contre 61 mois pour les patients de moins de 60 ans, $p < 0,001$ (tableau 2). Bien que les auteurs incluent *ASXL1* parmi les gènes menant à un pronostic défavorable, les analyses multivariées de la survie globale et de la survie sans événement ne démontrent pas qu'*ASXL1* est un facteur pronostic indépendant (tableau 2).

Les mutations du gène *ASXL1* sont associées à une survie globale réduite

Les études de Papaemmanuil et Paschka ont montré que les mutations du gène *ASXL1* sont associées à une survie globale réduite. Paschka et ses collaborateurs ont montré qu'après 5 ans, 30 % des patients présentant des mutations du gène *ASXL1* et 46 % des patients n'ayant pas de mutation de ce gène étaient toujours vivants, $p = 0,0004$ (tableau 1). Chez les patients présentant le gène *ASXL1* muté, la survie médiane globale s'avère plus courte que chez les patients sans mutation de ce gène (22 mois contre 40 mois, $p = 0,0004$). Papaemmanuil et ses collaborateurs ont évalué la survie globale en effectuant un suivi médian de 5,9 ans. L'analyse univariée montre qu'elle est inférieure ($p = 0,04$) chez les patients dont le gène *ASXL1* est muté par rapport à ceux dont le gène est sauvage (tableau 1). Par contre, l'analyse multivariée ne montre pas de différence significative. Aucune de ces études n'a pu démontrer un effet négatif indépendant des mutations d'*ASXL1* sur la survie globale.

Tableau 1 Effet pronostique des mutations somatiques du gène ASXL1

Étude	Cohorte n, âge	Diagnostic n	Mutations détectées	Issue clinique (muté c. non muté)			Effet pronostique
				RÉM-C	SSE	SG	
Paschka et al., 2015	n = 1 696 Âge médian : 48 ans (18-61)	LMA <i>de novo</i> : 1 529 LMA-s : 74 LMA-t : 88	Muté n = 103 (6,1 %) Âge médian : 53 ans (36- 61) Non muté n = 1 593 (93,9 %) Âge médian : 48 ans (16- 61) p < 0,0001	56,3 % c. 74,2 % p = 0,0002 RC = 0,77 [IC 95 % : 0,46-1,29] p = 0,32	SSE 5 ans : 15,9 % c. 29,0 % p = 0,02 RRI = 0,8 8 [IC 95 % : 0,67- 1,15] p = 0,35	SG 5 ans : 30,3 % c. 45,7 % p = 0,0004 SG médiane : 21,6 mois c. 39,6 mois	Non significatif lorsque la mutation est seule Défavorable lorsque la mutation coexiste avec celle du gène <i>RUNX1</i>
Papaemmanuil et al., 2016	n = 1 540 3 études : n = 627 AML-HD98A : 18-65 ans n = 740 AMLSG-07- 04 : 18-61 ans n = 173 AML-HD98B : 58-84 ans	LMA <i>de novo</i> : 1 409 LMA-s : 61 LMA-t : 68	Muté : 70 (4,5 %)	n. d.	n. d.	SG 5,9 ans (suivi médian) : RRI = 1,3 [IC 95 % : 1,0-1,6] p = 0,04 (n.s. par analyse multivariée)	Défavorable, influencé par le contexte génomique

Abréviations : IC : intervalle de confiance; LMA : leucémie myéloïde aiguë; LMA-s : leucémie myéloïde aiguë secondaire; LMA-t : leucémie myéloïde aiguë consécutive au traitement; n.d. : non disponible; n.s. : non significatif; RC : rapport de cotes (*odds ratio*); RÉM-C : rémission complète; RRI : rapport des risques instantanés (*hazard ratio*); SG : survie globale; SSE : survie sans événement.

L'effet pronostique des mutations du gène ASXL1 est influencé par le contexte génomique

L'étude de Paschka et ses collaborateurs a montré plusieurs associations entre les mutations d'*ASXL1* et d'autres gènes mutés. Un de ces gènes, *RUNX1*, lorsqu'il est muté, est plus fréquemment associé ($p = 0,007$) au gène *ASXL1* muté que sauvage. De ce fait, 22 patients présentaient à la fois les gènes *ASXL1* et *RUNX1* mutés et parmi eux, 15 étaient des patients nouvellement diagnostiqués LMA. D'ailleurs, dans cette étude, les patients ayant des mutations du gène *ASXL1* ont tendance à présenter, de façon concomitante, d'autres facteurs de mauvais pronostic déjà connus comme par exemple des anomalies cytogénétiques. Cependant, la prévalence des mutations d'*ASXL1* n'est pas significativement plus grande dans la catégorie des patients dits « à risque intermédiaire » ($p = 0,08$). Tout comme l'étude de Paschka, Papaemmanuil et ses collaborateurs ont aussi observé que la présence de mutations concomitantes des gènes *ASXL1* et *RUNX1* confère un pronostic défavorable.

Tableau 2 Effet de l'âge chez les patients ayant des mutations somatiques du gène *ASXL1*

Étude	Cohorte n, âge	Diagnostic n	Mutations détectées	Issue clinique selon l'âge			Effet pronostique
				RÉM-C	SSE	SG	
Tsai <i>et al.</i> , 2016	n = 462 Âge médian : 51 ans (15-90) Groupe 60-90 ans : n = 177 Âge médian : 71 ans Groupe 15-59 ans : n = 285 Âge médian : 40 ans	LMA <i>de novo</i> : 462	Groupe 60-90 ans : 17,6 % Groupe 15-59 ans : 6,7 % p < 0,001	56,5 % c. 81,9 % p < 0,001	SSE 2 ans (médiane) : 3 mois c. 9 mois (p = 0,001) RR = 0,958 [IC 95 % : 0,553-1,660] p = 0,878 (analyse multivariée)	SG 2 ans (médiane) : 10 mois c. 61 mois (p < 0,001) RR = 1,298 [IC 95 % : 0,727-2,317] p = 0,377 (analyse multivariée)	Défavorable, surtout à ≥ 60 ans

Abréviations : IC : intervalle de confiance; LMA : leucémie myéloïde aiguë; RÉM-C : rémission complète; RR : risque relatif; SG : survie globale; SSE : survie sans événement.

Conclusion

À l'intérieur d'un même groupe de patients normalement jugés « à risque intermédiaire », la présence d'une mutation du gène *ASXL1* est associée à la survenue d'effets indésirables. Toutefois, les études retenues ne montrent pas que le statut d'*ASXL1* possède de valeur pronostique significative indépendante. Aucune étude présentant des analyses multivariées démontrant l'impact pronostique indépendant des mutations d'*ASXL1* n'a été repérée. Or, de manière générale, les études présentées arguent que la présence de mutations du gène *ASXL1* confère un pronostic défavorable, particulièrement lorsque les mutations sont concomitantes avec celles d'autres gènes, comme *RUNX1*; le contexte génomique module l'effet pronostique. De manière générale, les auteurs suggèrent qu'*ASXL1* devrait faire partie des gènes pris en considération pour établir un pronostic, parce qu'il peut exercer une influence notable sur l'issue clinique.

5. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Les mutations du gène *ASXL1* sont d'ores et déjà recherchées et dépistées par le panel utilisé actuellement pour effectuer la stratification des LMA par séquençage de nouvelle génération. Les résultats du gène *ASXL1* sont présentement masqués dans les rapports émis aux cliniciens.

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

L'European LeukemiaNet (ELN) a inclus en 2017 les mutations du gène *ASXL1* à la liste des anomalies génétiques de la catégorie « à risque défavorable » pour la stratification des LMA par SNG [Döhner *et al.*, 2017].

7. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Stratification pronostique des leucémies myéloïdes aiguës par séquençage de nouvelle génération – Panel de gènes

ADDENDA concernant l'ajout du gène ASXL1

La recommandation de l'INESSS ☒ Introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> (ajout du gène au panel) ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i>
Précisions accompagnant la recommandation ✓ Le comité recommande au laboratoire demandeur de transmettre des données de validation analytique.

RÉFÉRENCES

- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424-47.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(23):2209-21.
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: A study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica* 2015;100(3):324-30.
- Tsai CH, Hou HA, Tang JL, Liu CY, Lin CC, Chou WC, et al. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30(7):1485-92.

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

Québec 

Siège social

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

Bureau de Montréal

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

inesss.qc.ca

