

Avis

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

Transmission au ministre : 31 octobre 2014

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

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 validité clinique;
- 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*.

Équipe de projet

Direction

Alicia Framarin, médecin, M.Sc.

Michel LeBrun, M.B.A., Ph. D.

Scientifique principal au soutien à la pratique clinique

Jean-Marie Moutquin, M.D., M. Sc., FRCSC

Professionnels scientifiques

Frédéric Breton

Faïza Boughrassa, M.D., M. Sc.

Andrée Fortin

Anne Fortin

Nathalie Girard, M. Sc., Ph. D.

Phuong Hua, M. Sc.

Éric Potvin, Ph. D.

Recherche d'information scientifique

Caroline Dion, MBSI, *bibl. prof*

Mathieu Plamondon, MSI

Soutien documentaire

Micheline Paquin, *tech. doc.*

Édition

Responsable

Renée Latulippe

Coordination

Patricia Labelle

Révision linguistique

Révision Littera Plus

Mise en pages

Marie-Andrée Houde

Vérification bibliographique

Denis Santerre

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2014

Bibliothèque et Archives Canada, 2014

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF)

ISBN 978-2-550-72152-9 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2014

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 douze analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Québec, Qc : INESSS; 2013. 248 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 de conflit d'intérêts

Tous les membres du comité scientifique ont rempli un formulaire de déclaration de conflit d'intérêts. Aucun conflit à signaler.

COMITÉ SCIENTIFIQUE – ANALYSES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Président

M. Jean-Marie Moutquin, M.D., FRCSC

- Scientifique principal – soutien à la pratique clinique, Institut national d'excellence en santé et en services sociaux

Membres

Lambert Busque, M.D., FRCPC

- Hématologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Lorraine Caron

- Consultante en éthique

Guy Fink, Ph. D.

- Biochimiste clinique, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

Louis Gaboury, M.D., Ph. D.

- Anatomo-pathologiste, Hôtel-Dieu du CHUM

Annie-Claude Labbé, M.D., FRCPC

- Microbiologiste infectiologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

David Rosenblatt, M.D., FRCPC

- Pédiatre, généticien, Hôpital général de Montréal

François Rousseau, M.D., FRCPC

- Médecin biochimiste, CHU de Québec

Maude Saint-Jean, M.D.

- Pédiatrie, microbiologie médicale et infectiologie, maladies infectieuses, Hôpital Fleury

Membre citoyen

Suzanne K. Bédard

- Conseillère en évaluation des technologies, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

LISTE DES ANALYSES

TABLEAU-SYNTHESE DES RECOMMANDATIONS	i
SÉQUENÇAGE DE L'ÉLÉMENT DE RÉPONSE AU FER (IRE) DU GÈNE L-FERRITINE (FTL) (RÉFÉRENCE – 2014.02.01).....	1
RECHERCHE DE PARÉCHOVIRUS PAR RT-PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL (RÉFÉRENCE – 2014.02.001)	22
DÉTECTION DE L'ANTIRÉCEPTEUR GLUTAMATE (NMDA) (RÉFÉRENCE – 2014.02.02).....	42
ANALYSE MUTATIONNELLE DU DOMAINE KINASE DE LA PROTÉINE DE FUSION <i>BCR-ABL</i> (RÉFÉRENCE – 2014.02.002)	55
DOSAGE DE LA 3-MÉTHOXYTYRAMINE PLASMATIQUE PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE - 2014.02.03)	81
RECHERCHE DE MUTATIONS CIBLÉES DANS LES TUMEURS CÉRÉBRALES PÉDIATRIQUES (K27M ET G34V/R DANS H3.3, K27M DANS H3.1 ET V600E DANS BRAF) (RÉFÉRENCE – 2014.02. 04).....	96
DOSAGE DU LINÉZOLIDE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC-DAD) (RÉFÉRENCE – 2014.02.06)	117
PANEL LEUCÉMIE PRÉDISPOSITION FAMILIALE : SÉQUENÇAGE DES GÈNES <i>RUNX1 (AML1)</i> , <i>PAX5</i> ET <i>TP53</i> (RÉFÉRENCE – 2014.02.07)	139
ANALYSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL ET DES COMPLEXES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE (RÉFÉRENCE – 2014.02.09)	160
DOSAGE DU FACTEUR DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES 23 (FGF-23) (RÉFÉRENCE – 2014.02.11) ...	190
SÉQUENÇAGE DE <i>MECP2</i> DANS LE SYNDROME DE RETT (RÉFÉRENCE – 2014.02.12).....	209
SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>SYNGAP1</i> DANS LA DÉFICIENCE INTELLECTUELLE NON SYNDROMIQUE (RÉFÉRENCE – 2014.02.13)	235

TABLEAU-SYNTHESE DES RECOMMANDATIONS

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.02.01	Séquençage de l'élément de réponse au fer (IRE) du gène <i>L-Ferritine</i> (FTL)	Établie	Introduction	<p>Il s'agit d'une analyse discriminante importante pour le diagnostic différentiel de l'hémochromatose, ce qui préviendra des traitements inappropriés.</p> <p>Il est important d'explorer davantage, dans le cadre d'une recherche, la possibilité d'une mutation à effet fondateur au Québec et, si la démonstration est faite, de s'assurer que l'analyse ciblera cette mutation de façon spécifique. Bien que souhaitable, cela n'est pas une condition d'introduction de l'analyse.</p>
2014.02.001	RT-PCR quantitatif paréchovirus humain	Établie	Introduction conditionnelle à la préparation d'un algorithme associé à la recherche d'entérovirus. Il y a lieu de bien établir si l'analyse sera faite en séquence ou en parallèle avec le TAAN entérovirus (code 40061). Dans les deux cas, il faudrait vérifier si les valeurs pondérées doivent être modifiées du fait que le processus d'extraction est le même pour les deux analyses.	La disponibilité sur le marché des trousse combinant la recherche des deux types de virus à l'intérieur de panels est également à considérer.
2014.02.02	Détection de l'antirécepteur glutamate (NMDA)	Établie	Introduction	<p>Il s'agit d'une analyse qui présente plusieurs avantages. Elle permet :</p> <ul style="list-style-type: none"> • le diagnostic d'une maladie rare • un meilleur suivi de la maladie • un traitement approprié <p>La disponibilité de l'analyse au Québec permettrait un temps de réponse plus rapide que l'envoi des échantillons hors Québec.</p>
2014.02.002	Analyse mutationnelle du domaine kinase de la protéine de fusion <i>BCR-ABL</i>	Établie	Introduction	

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.02.03	Dosage de la 3-méthoxytyramine plasmatique par LC-MS/MS	Établie	Introduction conditionnelle à l'utilisation des codes déjà existants dans le répertoire pour les catécholamines (30112 et 30113)	
2014.02.04	Recherche de mutations ciblées dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (K27M et G34V/R dans H3.3, K27M dans H3.1 et V600E dans BRAF)	Établie	Réévaluation (considérant que la détection de la mutation V600E BRAF est déjà dans le répertoire [code 60034]) lorsqu'on aura obtenu : <ul style="list-style-type: none"> • Une démonstration de la corrélation clinico-pathologique • Une justification de la valeur ajoutée associée à la recherche de ces mutations ensemble • Des précisions concernant l'accessibilité à la thérapie ciblée 	
2014.02.06	Dosage du linézolide par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC)	Établie	Réévaluation lorsque : <ul style="list-style-type: none"> • Les valeurs de référence seront établies • L'utilité clinique sera mieux étayée • Le contrôle de la qualité externe sera précisé • La demande sera complétée avec des données de validation locale 	Cette analyse est sûrement pertinente pour des cas particuliers.
2014.02.07	Panel leucémie prédisposition familiale : Séquençage des gènes <i>RUNX1</i> , <i>PAX5</i> et <i>TP53</i>	Établie	Introduction	
2014.02.09	Analyse de l'ADN mitochondrial et des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale	Établie	Introduction	

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.02.11	Dosage du facteur de croissance des fibroblastes 23 (FGF-23)	Établie mais, pour le dosage du FGF-23, il reste encore un questionnement quant au statut de la technologie pour doser le cFGF-23 et l'iFGF-23.	Réévaluation lorsqu'on aura obtenu plus d'information sur : <ul style="list-style-type: none"> • le statut de la technologie pour le cFGF-23 versus l'iFGF-23 • l'assurance du contrôle de la qualité externe 	Le besoin clinique est évident.
2014.02.12	Séquençage de <i>MeCP2</i> dans le syndrome de Rett	Établie	Introduction conditionnelle à la présentation d'un algorithme de sélection des patients	Analyse pertinente d'un point de vue clinique. Les enfants naissent sans signe clinique, mais ils éprouvent des problèmes de développement pendant l'enfance. Le diagnostic du syndrome de Rett permet le conseil génétique. Possibilité de surutilisation si les critères de diagnostic et de prescription de l'analyse ne sont pas bien définis. Il sera important de s'assurer que le volume ne dépassera pas les prévisions annuelles du demandeur.
2014.02.13	Séquençage du gène <i>SYNGAP1</i> dans la déficience intellectuelle non syndromique	Établie	Réévaluation lorsque des données plus complètes sur l'utilité et la validité cliniques seront disponibles	Il s'agit d'une découverte très récente, ce qui explique la rareté des données cliniques. L'intérêt clinique est clair, mais les preuves de l'association entre le gène et la déficience intellectuelle non syndromique sont encore insuffisantes. On peut se demander pour quelle raison il est important d'offrir la recherche de mutations dans ce gène comme test unique comparativement à son inclusion dans un panel de gènes, par exemple. Un algorithme décisionnel basé sur les preuves scientifiques permettrait de mieux appuyer l'utilité clinique.

SÉQUENÇAGE DE L'ÉLÉMENT DE RÉPONSE AU FER (IRE) DU GÈNE L-FERRITINE (FTL) (RÉFÉRENCE – 2014.02.01)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur : Hôpital Maisonneuve-Rosemont
- 1.2 Date de transmission de la demande d'examen au MSSS : 28 novembre 2011
- 1.3 Date de réception de la demande à l'INESSS : 4 juin 2014
- 1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Séquençage de type Sanger avec résolution par électrophorèse sur capillaires à l'aide du Genetic Analyzer 3130XL de Life Technologies

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le séquençage de l'élément de réponse au fer (*Iron response element* ou IRE) situé dans la région non traduite en 5' (5' UTR) du gène *FTL* (*Ferritin light chain*) permet de détecter la présence de mutations causant le syndrome d'hyperferritinémie-cataracte (SHFC).

Selon l'information fournie par le demandeur, la région d'intérêt est amplifiée à l'aide d'une trousse maison par réaction de PCR (*polymerase chain reaction*). Après la purification du produit grâce à la trousse Qiaquick de Qiagen, une réaction de séquence cyclique de type Sanger est effectuée (trousse Big Dye Terminator v3.1 de Life technologies). Les produits de réaction purifiés à l'aide de la trousse DyeEx 2.0 de Qiagen sont alors migrés et la séquence est résolue et analysée avec le Genetic analyzer 3130XL (Life Technologies) et le programme Sequencher (Genes Codes Corporation).

2.3 Société ou développeur

Les réactions de PCR et de séquençage sont réalisées à l'aide d'amorces maison. La réaction de séquençage est effectuée à l'aide de la trousse Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies).

Les trousse de purification du produit de PCR (Qiaquick) et de la réaction de séquence (DyeEx 2.0) sont commercialisées par Qiagen.

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Ce test n'a fait l'objet d'aucune homologation.

2.7 Valeur pondérée : 123,0

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

L'analyse est effectuée chez des patients présentant une hyperferritinémie et une saturation de la transferrine normale. Les antécédents familiaux permettent parfois de soutenir le diagnostic.

3.2 Description de la maladie visée

Le syndrome d'hyperferritinémie-cataracte (SHFC) est un désordre rare caractérisé par un excès de ferritine dans le sang et les tissus, accompagné par la détérioration progressive de la vision et l'apparition de cataractes bilatérales dues à des opacités nucléaires et corticales pulvérulentes. Ces cataractes progressent généralement vers une configuration en tournesol caractéristique [Cazzola, 2002; Girelli *et al.*, 1995]. L'accumulation et la précipitation de ferritine dans le stroma du cristallin seraient à l'origine des opacités observées [Brooks *et al.*, 2002]. Typiquement, il y a une absence de surcharge en fer permettant la différenciation entre le SHFC et l'hémochromatose héréditaire (annexe A).

Les cataractes, souvent diagnostiquées au cours de l'enfance, représentent la seule manifestation clinique de ce syndrome et l'âge de leur apparition semble tributaire de facteurs génétiques et environnementaux [Bowes *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2002; Cazzola, 2002].

Le SHFC est causé par des mutations dans l'IRE situé dans la région 5' UTR du gène *FTL* (OMIM 134790). Ce gène code pour les chaînes légères de la ferritine (*L-ferritine*), lesquelles se fixent aux sous-unités d'H-ferritine et forment un complexe protéique ayant pour rôle de séquestrer les ions de fer intracellulaires excédentaires [Millonig *et al.*, 2010]. Chez les individus porteurs d'allèles normaux, l'absence d'une quantité suffisante de fer permet la liaison de la protéine régulatrice du fer (*iron regulatory protein* ou IRP) à l'IRE situé sur l'ARNm, inhibant ainsi la production de *L-ferritine*. Les mutations associées à la maladie modifient la stabilité ou la structure de l'IRE ou l'affinité de liaison des IRP pour l'IRE. Ces modifications conduisent à une synthèse constitutive et faiblement régulée de *L-ferritine* et, ultimement, à une hyperferritinémie qui ne reflète pas les niveaux sériques de fer [Bowes *et al.*, 2014; Cazzola, 2002; Camaschella *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1998; Cazzola *et al.*, 1997; Girelli *et al.*, 1997; Girelli *et al.*, 1995; Beaumont *et al.*, 1995]. Le diagnostic différentiel du SHFC inclut la détermination de l'absence d'états inflammatoires, auto-immuns, oncologiques, de maladies du foie et d'hémochromatose héréditaire dans le but d'éviter les explorations diagnostiques et autres interventions injustifiées, dont les phlébotomies et les biopsies [Millonig *et al.*, 2010; Ponka *et al.*, 1998; Lipschitz *et al.*, 1974].

Le SHFC est une maladie très majoritairement familiale transmise selon un mode autosomique dominant [Bonneau *et al.*, 1995; Girelli *et al.*, 1995]. Les patients porteurs de mutations homozygotes ne présentent pas nécessairement un phénotype clinique plus

sévère [Giansily-Blaizot *et al.*, 2013; Lusciati *et al.*, 2013]. Des cas de mutations acquises *de novo* ont été décrits dans la littérature [Cao *et al.*, 2010; Messa *et al.*, 2009, Phillips *et al.*, 2005; McLeod *et al.*, 2002].

3.3 Nombre de patients visés

Le SHFC est une maladie rare dont la prévalence a été évaluée à environ un cas sur 200 000 dans la population australienne [Craig *et al.*, 2003]. D'autres indiquent plutôt une prévalence inférieure à 1 cas par 1 000 000 d'habitants sans précision du lieu géographique¹. Le demandeur suggère une prévalence accrue dans la population des Laurentides, qui pourrait être associée à un effet fondateur. En effet, plusieurs patients porteurs de la mutation ont été répertoriés par le demandeur dans cette région. Environ 60 analyses devraient être effectuées annuellement, selon les statistiques des années précédentes.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Hématologie, ophtalmologie, biologie moléculaire, génétique.

3.5 Modalités d'administration du test

Aucun algorithme de prescription précis n'a été établi pour cette analyse.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Cette analyse ne remplace aucun autre test ou code existant dans le répertoire.

Elle est toutefois disponible sur le plan clinique depuis plus de huit ans auprès du centre demandeur.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

L'approche suggérée par le demandeur est celle utilisée dans les quinze centres recensés au Canada (p. ex. Molecular Diagnostic Genetics, Hamilton Regional Laboratory Medicine Program, Hamilton, Ontario²), en Europe et en Australie, qui offrent ce service en clinique.

Cette approche permet de reconnaître l'ensemble des mutations ponctuelles et les petites délétions contenues dans la région ciblée.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : cette analyse ne remplace aucun test existant.

1. Beaumont C. Syndrome d'hyperferritinémie-cataracte héréditaire [site Web]. Orphanet; 2006. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=163.

2. Site Web du Hamilton Regional Laboratory Medicine Program (HRLMP) : <http://www.hrlmp.ca>.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

La littérature rapporte que le diagnostic du SHFC est fréquemment établi à la suite de la découverte fortuite, chez la personne atteinte, d'une hyperferritinémie non expliquée pouvant s'élever jusqu'à plus de 3200 µg/l³ [McLeod *et al.*, 2002; Girelli *et al.*, 2001]. L'absence d'une surcharge en fer (évaluée par le niveau de saturation de la transferrine et le niveau de fer sérique) devrait mener à une suspicion de SHFC (annexe A). Toutefois, plusieurs groupes ont rapporté que des personnes atteintes du SHFC avaient reçu un diagnostic erroné d'hémochromatose héréditaire. La prévalence de l'hémochromatose héréditaire est supérieure à celle du SHFC⁴ et son traitement inclut des phlébotomies thérapeutiques qui mènent à des anémies causées par une déficience en fer chez les patients souffrant de SHFC et à des interventions invasives telles que des biopsies hépatiques [Millonig *et al.*, 2010; Brooks *et al.*, 2002; Girelli *et al.*, 1995].

Dans certains cas, le diagnostic peut être confirmé par la présence de cataractes bilatérales caractéristiques à un âge précoce et par des antécédents familiaux [Craig *et al.*, 2003]. Toutefois, quelques études rapportent certains cas avec une présentation clinique partielle et des cas *de novo* [Muñoz-Muñoz *et al.*, 2013; Craig *et al.*, 2003; Hetet *et al.*, 2003; McLeod *et al.*, 2002; Girelli *et al.*, 2001].

L'analyse proposée par le demandeur pourrait permettre la confirmation du diagnostic et la mise en place d'un suivi ophtalmologique approprié auprès du cas index et des membres atteints de la famille repérés à la suite de l'évaluation de leur statut mutationnel pour l'IRE en 5'UTR de *FTL*.

Les patients atteints n'ont pas besoin de traitements médicaux autres que ceux associés aux troubles visuels [Cazzola, 2002; Girelli *et al.*, 2001]. Le seul traitement pour les cas symptomatiques consiste en l'extraction chirurgicale des cataractes.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Cette analyse est utilisée à des fins diagnostiques et pronostiques.

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité		X	
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)		X	
Valeur prédictive négative (VPN)		X	
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

3. Les niveaux normaux étant situés dans des intervalles approximatifs de 22 et 340 µg/l pour les hommes et 10 et 300 µg/l pour les femmes. [Bennett *et al.*, 2013; Lusciati *et al.*, 2013]. Ces niveaux varient d'un laboratoire à un autre.

4. La prévalence est évaluée entre 1 individu sur 250 et 1 individu sur 400 dans la population d'ascendance nord-européenne [Bowes *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2005].

Deux groupes indépendants, celui de Girelli et ses collaborateurs [2001] et celui de Beaumont et ses collaborateurs [1995], ont décrit et associé le SHFC à des mutations dans la région 5' UTR du gène *FTL*. Depuis, cette maladie a été décrite dans plus de 70 familles, principalement d'ascendance européenne [Bennett *et al.*, 2013; Millonig *et al.*, 2010]. L'ensemble de la littérature, constituée largement d'études de cas et de séries de petits nombres, a démontré un degré de corrélation génotype-phénotype important au sein des familles atteintes (tableau 1).

Tableau 1 **Compilation d'études comprenant plus d'une famille ou des populations témoins**

ÉTUDE	POPULATION	NOMBRE DE FAMILLES	CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES OU CRITÈRES D'INCLUSION	TYPE DE COHORTE	NOMBRE DE SUJETS TESTÉS	NOMBRE DE SUJETS AVEC MUTATION
Beaumont <i>et al.</i> , 1995	France	1	Hyperferritinémie + cataractes	Affectés	3	3
			Membres de famille	Non affectés	3	0
			Individus non atteints	Témoins	94	0
Girelli <i>et al.</i> , 2001	Italie	14	Hyperferritinémie + cataractes	Affectés	62	62
			Hyperferritinémie	Phénotype partiel	1	1
McLeod <i>et al.</i> , 2002	Australie	2 1 <i>de novo</i>	Hyperferritinémie + cataractes bilatérales	Affectés	14	14
			Membres de famille	Non affectés	16	0
			Hyperferritinémie	Phénotype partiel	1	1
Brooks <i>et al.</i> , 2002	É.-U.	1	Hyperferritinémie + cataractes	Affectés	5	5
			Membres de famille	Non affectés	1	0
			Individus non atteints	Témoins	65	0
Hetet <i>et al.</i> , 2003 ¹	France	52 cas index	Hyperferritinémie + cataractes bilatérales précoces + histoire familiale positive	Affectés	24	24
			Hyperferritinémie + cataractes tardives dans certains cas et sans historique familial (25)	Témoins	25	0
Craig <i>et al.</i> , 2003 ²	Australie Italie	3 1 <i>de novo</i>	Hyperferritinémie + cataractes d'aspect caractéristique	Affectés	18	18
			Membres de famille	Témoins	5	0
			Hyperferritinémie	Phénotype partiel	1	1

ÉTUDE	POPULATION	NOMBRE DE FAMILLES	CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES OU CRITÈRES D'INCLUSION	TYPE DE COHORTE	NOMBRE DE SUJETS TESTÉS	NOMBRE DE SUJETS AVEC MUTATION
Lachlan <i>et al.</i> , 2004	UK	7	Hyperferritinémie et cataractes précoces	Affectés	24	24
			Membres de famille	Témoins	10	0
Papanikolaou <i>et al.</i> , 2006	Grèce	3	Hyperferritinémie + cataractes	Affectés	9	9
			Membres de famille	Témoins	ns	0
Vanita <i>et al.</i> , 2006	Inde	1	Hyperferritinémie et cataractes d'aspect caractéristique	Affectés	13	13
			Membres de famille	Témoins	14	0
			Individus non atteints	Témoins	50	0
Nonnenmacher <i>et al.</i> , 2011	Allemagne (4)	4	Hyperferritinémie + historique familial de cataractes	Affectés	4	4
Shekunov <i>et al.</i> , 2011	É.-U.	2	Diagnostic de SHFC	Affectés (53)	20	20
			Hyperferritinémie + vacuoles dans les deux lentilles		1	0
			Ferritinémie normale + vacuoles dans les deux lentilles ou opacités dans un œil		2	0
Bennett <i>et al.</i> , 2013	É.-U.	1	Cataractes bilatérales précoces (transmission autosomique dominante)	Affectés	6	6
			Membre de la famille	Témoins	7	0
			Individus atteints de cataractes associées à l'âge	Témoins	197	0
			Individus non atteints	Témoins	102	0

ÉTUDE	POPULATION	NOMBRE DE FAMILLES	CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES OU CRITÈRES D'INCLUSION	TYPE DE COHORTE	NOMBRE DE SUJETS TESTÉS	NOMBRE DE SUJETS AVEC MUTATION
Luscieti <i>et al.</i> , 2013	Allemagne (1) Espagne (1)	2	Hyperferritinémie + cataractes (ou signe de déclenchement de la maladie) sans surcharge de fer	Membres affectés	7	7
			Individus non atteints	Témoins	50	0
Muñoz-Muñoz <i>et al.</i> , 2013	Espagne	3 1 <i>de novo</i>	Hyperferritinémie + cataractes	Affectés	7	7
			<i>Cataractes sans hyperferritinémie</i>	<i>Phénotype partiel</i>	1	1
			<i>Membres de famille</i>	<i>Membres non affectés</i>	3	1

La présence de mutations dans la région 5' UTR de *FTL* a été déterminée par séquençage de type Sanger, à moins d'indication contraire.

1. Testé par électrophorèse sur gel dénaturant à double gradient.

2. Cette étude inclut les cas de l'étude de McLeod *et al.*, 2002.

Abréviation : ns = non spécifié.

Parmi les études repérées, Muñoz-Muñoz et ses collaborateurs [2013] rapportent le seul cas de discordance phénotype-génotype; malgré la présence de mutations, cet individu ne présentait aucune manifestation clinique de la maladie. Cette étude rapporte également le cas d'un patient chez qui le phénotype partiel était constitué de cataractes diagnostiquées en bas âge, sans hyperferritinémie. Quelques autres cas de phénotype partiel, sous la forme d'hyperferritinémie seule, ont été repertoriés. Le SHFC étant un trouble progressif, les auteurs de ces études mentionnent qu'il est possible que ces patients développent ultérieurement des cataractes.

L'inclusion de cohortes témoins dans les études de cas, de même que les études de dépistage du SHFC au sein de différentes cohortes (population générale, patients hyperferritinémiques, personnes atteintes de cataractes) ont permis de confirmer la corrélation entre la présence de mutations dans la région 5'UTR de *FTL* et le SHFC et de constater la prévalence faible de la maladie (tableau 2).

Tableau 2 Études de prévalence du SHFC/mutations de l'IRE de *FTL*

ÉTUDE	POPULATION	TYPE DE COHORTE (NOMBRE)	CRITÈRES D'INCLUSION OU CARACTÉRISTIQUES DES PATIENTS TESTÉS	CRITÈRES D'EXCLUSION	NOMBRE DE SUJETS TESTÉS	NOMBRE DE SUJETS AVEC MUTATION
Rosochova <i>et al.</i> , 2000	Suisse	Chirurgie pour cataractes (3000) sur une période de 4 ans 135 opérés avant 51 ans 19 opérés avant 51 ans pour cataracte bilatérale nucléaire	Chirurgie pour cataractes, patients opérés avant 51 ans + hyperferritinémie légère (267 et 435 µg/l) + antécédents familiaux de cataracte	n.s.	2	0
Bozzini <i>et al.</i> , 2003 ¹	Italie	Donneurs à une banque de sang (3246)	Ferritine ≥ 300 µg/L Opacité minimale des cristallins		13	0
		Chirurgie pour cataractes sur une période de 6 ans (11 685)	Cataracte juvénile (≤ 40 ans)	Autre étiologie (traumatisme, corticostéroïde, diabète)	15	0
		Chirurgie pour cataractes liées à l'âge sur une période d'un an (1231)	Ferritine sérique ≥ 300 µg/L	Maladie inflammatoire, cancer	26	0
Kannengiesser <i>et al.</i> , 2009	n.s.	Cas sporadiques (66)	Hyperferritinémie non expliquée		66	0
		Cas familiaux (25 cas index)	Hyperferritinémie non expliquée		25	0
		Membres des familles des cas familiaux (30)			30	0
		Témoins (528)	Statut de fer normal		528	0
Assia <i>et al.</i> , 2010 ²	n.s.	Cataractes associées à l'âge	Orientés en raison de cataractes associées à l'âge		90	0

Abréviation : n.s. : non spécifié.

La présence de mutations dans la région 5' UTR de *FTL* a été déterminée par séquençage de type Sanger, à moins d'indication contraire.

1. Testé par électrophorèse sur gel dénaturant à double gradient.

2. Les 15 mutations les plus communes ont été recherchées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/Sequenom.

Une grande variabilité entre les niveaux sériques de ferritine, l'âge d'apparition et la gravité des cataractes chez différents individus apparentés ou non et porteurs d'une même mutation ou de niveaux similaires de ferritine a été observée. Cette variabilité phénotypique suggère une contribution potentielle d'autres éléments génétiques ou épigénétiques à l'apparition et à la progression de la maladie [Vanita *et al.*, 2006; Lachlan *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 2003; Girelli *et al.*, 2001].

Les 37 mutations associées à la maladie et décrites à ce jour sont principalement des mutations ponctuelles modifiant la stabilité ou la structure de l'IRE ou l'affinité de liaison des IRP pour l'IRE. Elles conduisent à une synthèse constitutive et faiblement régulée de L-ferritine (annexes B et C). De ce nombre, 12 ont été répertoriées comme origine étiologique du SHFC dans la base de données ClinVar du National Institute of Health (NIH) (en date du 2014-07-14). Quelques délétions éliminant une partie de l'IRE et une mutation double ont également été décrites [Bowes *et al.*, 2014; Cazzola, 2002; Camaschella *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1998; Cazzola *et al.*, 1997; Girelli *et al.*, 1997; Girelli *et al.*, 1995; Beaumont *et al.*, 1995].

Les mutations associées au SHFC sont, jusqu'à présent, confinées à la région 5' UTR du gène. Par ailleurs, des mutations dans la région codante de *FTL* ont été associées à des maladies ou phénotypes différents. Kannengiesser et ses collègues [2009] ont démontré, dans des cas sporadiques et familiaux, que la présence de la mutation p.Thr30Ile dans *FTL* se traduit par une hyperferritinémie en l'absence de cataractes. Des mutations dans *FTL* ont également été associées aux neurodégénérescences avec accumulation de fer dans le cerveau (OMIM⁵ 606159) [Moutton *et al.*, 2014; Nishida *et al.*, 2014; Curtis *et al.*, 2001] et à une déficience en L-ferritine (OMIM 615604) [Cozzi *et al.*, 2013; Cremonesi *et al.*, 2004].

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité	X		
Reproductibilité		X	
Sensibilité analytique		X	
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice		X	
Concordance		X	
Corrélation entre test et comparateur		X	

Le séquençage selon la méthode de Sanger est considéré comme la méthode de référence (*gold standard*) de séquençage pour les applications cliniques [Rehm *et al.*, 2013]. Il s'agit de la méthode de détection utilisée dans la quasi-totalité des études d'association génétique et de diagnostic reliées au SHFC (tableaux 1 et 2). La compilation des études rapportant les taux de détection de mutations dans l'IRE de *FTL* au sein de cohortes atteintes et témoins suggère une spécificité et une sensibilité importantes de cette technique.

La sensibilité de détection (LoD) de cette approche technique est généralement évaluée entre 10 et 30 % [Querings *et al.*, 2011; Tsiatis *et al.*, 2010], ce qui est suffisant pour le

⁵ OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man.

reséquençage et la détection de variants ponctuels présents à l'état homozygote et hétérozygote et la détection de petites délétions telles que celles décrites dans la littérature jusqu'à présent [Giansily-Blaizot *et al.*, 2013; Lusciati *et al.*, 2013; Burdon *et al.*, 2007; Cazzola, 2002; Feys *et al.*, 2001; Girelli *et al.*, 1997].

L'analyse mise au point par le demandeur est un essai maison. Les amorces utilisées pour l'amplification de la région d'intérêt excèdent l'IRE et l'ATG constituant le point de départ de la traduction. Les amorces utilisées permettent de détecter l'ensemble des mutations rapportées dans la littérature actuelle, à l'exception de la délétion de 25 nucléotides touchant le site du début de la transcription décrite de façon anecdotique par Burdon et ses collaborateurs [2007].

Le demandeur offre cette analyse depuis plus de huit ans. Dans ce cadre, le séquençage de chacun des échantillons est effectué en duplicata et dans les deux orientations de façon à assurer la spécificité et la sensibilité de l'analyse. La spécificité des résultats obtenus est également évaluée par comparaison avec les résultats du séquençage d'une cohorte de dix témoins effectué initialement et d'un témoin additionnel séquençé systématiquement lors de chaque analyse.

Le demandeur participe à une épreuve de séquençage dans le cadre de son programme de qualité externe. L'épreuve est réalisée auprès de l'ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics). Aucun programme d'échange de spécimens spécifique au séquençage de la région 5'UTR de *FTL* n'a été mis en place.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Adams et Barton [2011] ont recommandé que le diagnostic du SHFC soit confirmé par séquençage de l'IRE du gène de la L-ferritine ou la concomitance d'hyperferritinémie et de cataractes, et par le constat qu'au moins deux membres de la famille sont atteints lorsque le séquençage n'est pas disponible.

La European Association for the Study of the Liver (EASL) [2010] a proposé un algorithme de diagnostic dans son guide de pratique clinique entourant l'hémochromatose, dans le cadre duquel, après l'élimination des causes communes d'hyperferritinémie (telles l'alcool, l'inflammation, la nécrose cellulaire et les syndromes métaboliques) et en présence d'un niveau de transferrine et de fer normal ou bas, il est suggéré qu'un test de mutation de l'IRE de la L-ferritine soit réalisé pour confirmer, s'il y a lieu, le SHFC.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

L'analyse est déjà offerte depuis plus de huit ans par le demandeur.

Comme dans le cas de toutes les analyses de séquençage, l'interprétation des résultats doit être effectuée par un personnel spécialisé compétent en bio-informatique et faisant partie d'un programme de formation continue approprié.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

L'analyse est déjà offerte depuis plus de huit ans par le demandeur.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La détection de mutations dans l'IRE situé dans la région 5'UTR du gène *FTL* permet de confirmer un diagnostic de SHFC. De plus, elle permet de repérer, au sein de familles atteintes, les individus asymptomatiques mais à risque de développer des cataractes afin d'assurer un suivi ophtalmique approprié.

De plus, la littérature rapporte plusieurs cas où des personnes atteintes de SHFC ont reçu un diagnostic erroné d'hémochromatose héréditaire. Il en résulte des phlébotomies inappropriées et des biopsies inutiles.

7.2 Validité clinique

L'association entre l'IRE situé dans la région 5'UTR du gène *FTL* et le SHFC a été démontrée par plusieurs études de cas familiaux et *de novo*.

7.3 Validité analytique

Le séquençage de type Sanger est la méthode de référence pour l'identification de variations génétiques *de novo* ou héréditaires permettant d'établir un diagnostic.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation n'a été repérée. Toutefois, un algorithme de diagnostic de l'hyperferritinémie-hémochromatose indique l'intérêt de tester les mutations du gène de la *L-ferritine* pour confirmer le diagnostic du syndrome de l'hyperferritinémie-cataracte.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Séquençage de l'élément de réponse au fer (IRE) du gène *L-ferritine* (FTL)

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

Il s'agit d'une analyse discriminante importante pour le diagnostic différentiel de l'hémochromatose, ce qui préviendra des traitements inappropriés.

Il est important d'explorer davantage, dans le cadre d'une recherche, la possibilité d'une mutation à effet fondateur au Québec et, si la démonstration est faite, de s'assurer que l'analyse ciblera cette mutation de façon spécifique. Bien que souhaitable, cela n'est pas une condition d'introduction de l'analyse.

RÉFÉRENCES

- Adams PC et Barton JC. A diagnostic approach to hyperferritinemia with a non-elevated transferrin saturation. *J Hepatol* 2011;55(2):453-8.
- Assia N, Goldenberg-Cohen N, Rechavi G, Amariglio N, Cohen Y. Mutation analysis of the ferritin L-chain gene in age-related cataract. *Mol Vis* 2010;16:2487-93.
- Beaumont C, Leneuve P, Devaux I, Scoazec JY, Berthier M, Loiseau MN, et al. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat Genet* 1995;11(4):444-6.
- Bennett TM, Maraini G, Jin C, Sun W, Hejtmancik JF, Shiels A. Noncoding variation of the gene for ferritin light chain in hereditary and age-related cataract. *Mol Vis* 2013;19:835-44.
- Bonneau D, Winter-Fuseau I, Loiseau MN, Amati P, Berthier M, Oriot D, Beaumont C. Bilateral cataract and high serum ferritin: A new dominant genetic disorder? *J Med Genet* 1995;32(10):778-9.
- Bowes O, Baxter K, Eley T, Snead M, Cox T. Hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Lancet* 2014;383(9927):1520.
- Bozzini C, Galbiati S, Tinazzi E, Aldigeri R, De Matteis G, Girelli D. Prevalence of hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in blood donors and patients with cataract. *Haematologica* 2003;88(2):219-20.
- Brooks DG, Manova-Todorova K, Farmer J, Lobmayr L, Wilson RB, Eagle RC Jr, et al. Ferritin crystal cataracts in hereditary hyperferritinemia cataract syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1121-6.
- Burdon KP, Sharma S, Chen CS, Dimasi DP, Mackey DA, Craig JE. A novel deletion in the FTL gene causes hereditary hyperferritinemia cataract syndrome (HHCS) by alteration of the transcription start site. *Hum Mutat* 2007;28(7):742.
- Camaschella C, Zecchina G, Lockitch G, Roetto A, Campanella A, Arosio P, Levi S. A new mutation (G51C) in the iron-responsive element (IRE) of L-ferritin associated with hyperferritinaemia-cataract syndrome decreases the binding affinity of the mutated IRE for iron-regulatory proteins. *Br J Haematol* 2000;108(3):480-2.
- Cao W, McMahon M, Wang B, O'Connor R, Clarkson M. A case report of spontaneous mutation (C33>U) in the iron-responsive element of L-ferritin causing hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood Cells Mol Dis* 2010;44(1):22-7.
- Cazzola M. Hereditary hyperferritinaemia/ cataract syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15(2):385-98.
- Cazzola M, Bergamaschi G, Tonon L, Arbustini E, Grasso M, Vercesi E, et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood* 1997;90(2):814-21.

- Cozzi A, Santambrogio P, Privitera D, Broccoli V, Rotundo LI, Garavaglia B, et al. Human L-ferritin deficiency is characterized by idiopathic generalized seizures and atypical restless leg syndrome. *J Exp Med* 2013;210(9):1779-91.
- Craig JE, Clark JB, McLeod JL, Kirkland MA, Grant G, Elder JE, et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: prevalence, lens morphology, spectrum of mutations, and clinical presentations. *Arch Ophthalmol* 2003;121(12):1753-61.
- Cremonesi L, Cozzi A, Girelli D, Ferrari F, Fermo I, Foglieni B, et al. Case report: A subject with a mutation in the ATG start codon of L-ferritin has no haematological or neurological symptoms. *J Med Genet* 2004;41(6):e81.
- Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG, Chinnery PF, et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* 2001;28(4):350-4.
- European Association for the Study of the Liver (EASL). EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 2010;53(1):3-22.
- Feys J, Nodarian M, Aygalenq P, Cattani D, Bouccara AS, Beaumont C. Syndrome héréditaire d'hyperferritinémie et cataracte. *J Fr Ophtalmol* 2001;24(8):847-50.
- Giansily-Blaizot M, Cunat S, Moulis G, Schved JF, Aguilar-Martinez P. Homozygous mutation of the 5'UTR region of the L-Ferritin gene in the hereditary hyperferritinemia cataract syndrome and its impact on the phenotype. *Haematologica* 2013;98(4):e42-3.
- Girelli D, Bozzini C, Zecchina G, Tinazzi E, Bosio S, Piperno A, et al. Clinical, biochemical and molecular findings in a series of families with hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome. *Br J Haematol* 2001;115(2):334-40.
- Girelli D, Corrocher R, Bisceglia L, Olivieri O, Zelante L, Panozzo G, Gasparini P. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome caused by a 29-base pair deletion in the iron responsive element of ferritin L-subunit gene. *Blood* 1997;90(5):2084-8.
- Girelli D, Olivieri O, De Franceschi L, Corrocher R, Bergamaschi G, Cazzola M. A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract. *Br J Haematol* 1995;90(4):931-4.
- Hetet G, Devaux I, Soufir N, Grandchamp B, Beaumont C. Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3) mutations. *Blood* 2003;102(5):1904-10.
- Kannengiesser C, Jouanolle AM, Hetet G, Mosser A, Muzeau F, Henry D, et al. A new missense mutation in the L ferritin coding sequence associated with elevated levels of glycosylated ferritin in serum and absence of iron overload. *Haematologica* 2009;94(3):335-9.
- Lachlan KL, Temple IK, Mumford AD. Clinical features and molecular analysis of seven British kindreds with hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Eur J Hum Genet* 2004;12(10):790-6.
- Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 1974;290(22):1213-6.
- Luscieti S, Tolle G, Aranda J, Campos CB, Risse F, Moran E, et al. Novel mutations in the ferritin-L iron-responsive element that only mildly impair IRP binding cause hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:30.

- Martin ME, Fargion S, Brissot P, Pellat B, Beaumont C. A point mutation in the bulge of the iron-responsive element of the L ferritin gene in two families with the hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* 1998;91(1):319-23.
- McLeod JL, Craig J, Gumley S, Roberts S, Kirkland MA. Mutation spectrum in Australian pedigrees with hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome reveals novel and de novo mutations. *Br J Haematol* 2002;118(4):1179-82.
- Messa E, Pellegrino RM, Palmieri A, Carturan S, Cilloni D, Saglio G, Roetto A. Identification of a novel mutation in the L ferritin iron-responsive element causing hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Acta Haematol* 2009;122(4):223-5.
- Millonig G, Muckenthaler MU, Mueller S. Hyperferritinaemia-cataract syndrome: worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder. *Hum Genomics* 2010;4(4):250-62.
- Moutton S, Fergelot P, Trocello JM, Plante-Bordeneuve V, Houcinat N, Wenisch E, et al. A novel FTL mutation responsible for neuroferritinopathy with asymmetric clinical features and brain anomalies. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(8):935-7.
- Muñoz-Muñoz J, Cuadrado-Grande N, Moreno-Carralero MI, Hoyos-Sanabria B, Manubés-Guarch A, Gonzalez AF, et al. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome in four patients with mutations in the IRE of the FTL gene. *Clin Genet* 2013;83(5):491-3.
- Nishida K, Garringer HJ, Futamura N, Funakawa I, Jinnai K, Vidal R, Takao M. A novel ferritin light chain mutation in neuroferritinopathy with an atypical presentation. *J Neurol Sci* 2014;342(1-2):173-7.
- Nonnenmacher L, Langer T, Blessing H, Gabriel H, Buchwald HJ, Meneksedag C, et al. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome: Clinical, genetic, and laboratory findings in 5 families. *Klin Padiatr* 2011;223(6):346-51.
- Papanikolaou G, Chandrinou H, Bouzas E, Contopoulos-Ioannidis D, Kalotychou V, Prentzas K, et al. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome in three unrelated families of western Greek origin caused by the C39 > G mutation of L-ferritin IRE. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36(1):33-40.
- Phillips JD, Warby CA, Kushner JP. Identification of a novel mutation in the L-ferritin IRE leading to hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;134A(1):77-9.
- Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998;35(1):35-54.
- Querings S, Altmüller J, Ansen S, Zander T, Seidel D, Gabler F, et al. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One* 2011;6(5):e19601.
- Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 2013;15(9):733-47.
- Rosochova J, Kapetanios A, Pournaras C, Vadas L, Samii K, Beris P. Hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome: Does it exist in Switzerland? *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130(9):324-8.

- Shekunov J, de Groen PC, Lindor NM, Klee GG, Aleff RA, Wieben ED, Mohny BG. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in two large multigenerational American families. *J AAPOS* 2011;15(4):356-61.
- Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: Diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010;12(4):425-32.
- Vanita V, Hejtmancik JF, Hennies HC, Guleria K, Nürnberg P, Singh D, et al. Sutural cataract associated with a mutation in the ferritin light chain gene (FTL) in a family of Indian origin. *Mol Vis* 2006;12:93-9.
- Wong K, Barbin Y, Chakrabarti S, Adams P. A point mutation in the iron-responsive element of the L-ferritin in a family with hereditary hyperferritinemia cataract syndrome. *Can J Gastroenterol* 2005;19(4):253-5.
- Yin D, Kulhalli V, Walker AP. Raised serum ferritin concentration in hereditary hyperferritinemia cataract syndrome is not a marker for iron overload. *Hepatology* 2014;59(3):1204-6.

ANNEXE A

Maladies génétiques et acquises associées à une hyperferritinémie

DIAGNOSTIC	FER CORPOREL TOTAL	SATURATION DE LA TRANSFERRINE	COMMENTAIRES
HYPERFERRITINÉMIE ACQUISE			
Infection	Normal	Normal/↓	
Surcharge de fer transfusionnelle	↑	↑	
Maladies auto-immune (p. ex. maladie de Still)	Normal	Normal/↓	
Lymphohistiocytose hémophagocytaire	Normal	Normal/↓	
Formation de tumeur maligne (p. ex. rétinoblastome)	Normal	Normal/↓	
Insuffisance rénale chronique	Normal	Normal/↓	
Maladies hépatiques aiguës ou chroniques	Normal	Variable	
Anémies			
Anémie sidéroblastique congénitale, anémie dysérythropoïétique congénitale, bêta-thalassémie intermédiaire	↑	↑	
HYPERFERRITINÉMIE HÉRÉDITAIRE			
Hémochromatose héréditaire			
- Type 1 – HFE	↑	↑	Transmission autosomique récessive
- Type 2a HJV	↑	↑	Transmission autosomique récessive, hémochromatose juvénile
- Type 2b – HAMP	↑	↑	Transmission autosomique récessive, hémochromatose juvénile
- Type 3 – TFR2	↑	↑	Transmission autosomique récessive
- Type 4a – SLC40A1	↑	Normal/↓	Transmission autosomique dominante
- Type 4a – SLC40A1	↑	↑	Transmission autosomique dominante
Syndrome d'hyperferritinémie – cataracte (FTL)	Normal	Normal	Transmission autosomique dominante

Adapté de Nonnenmacher *et al.*, 2011.

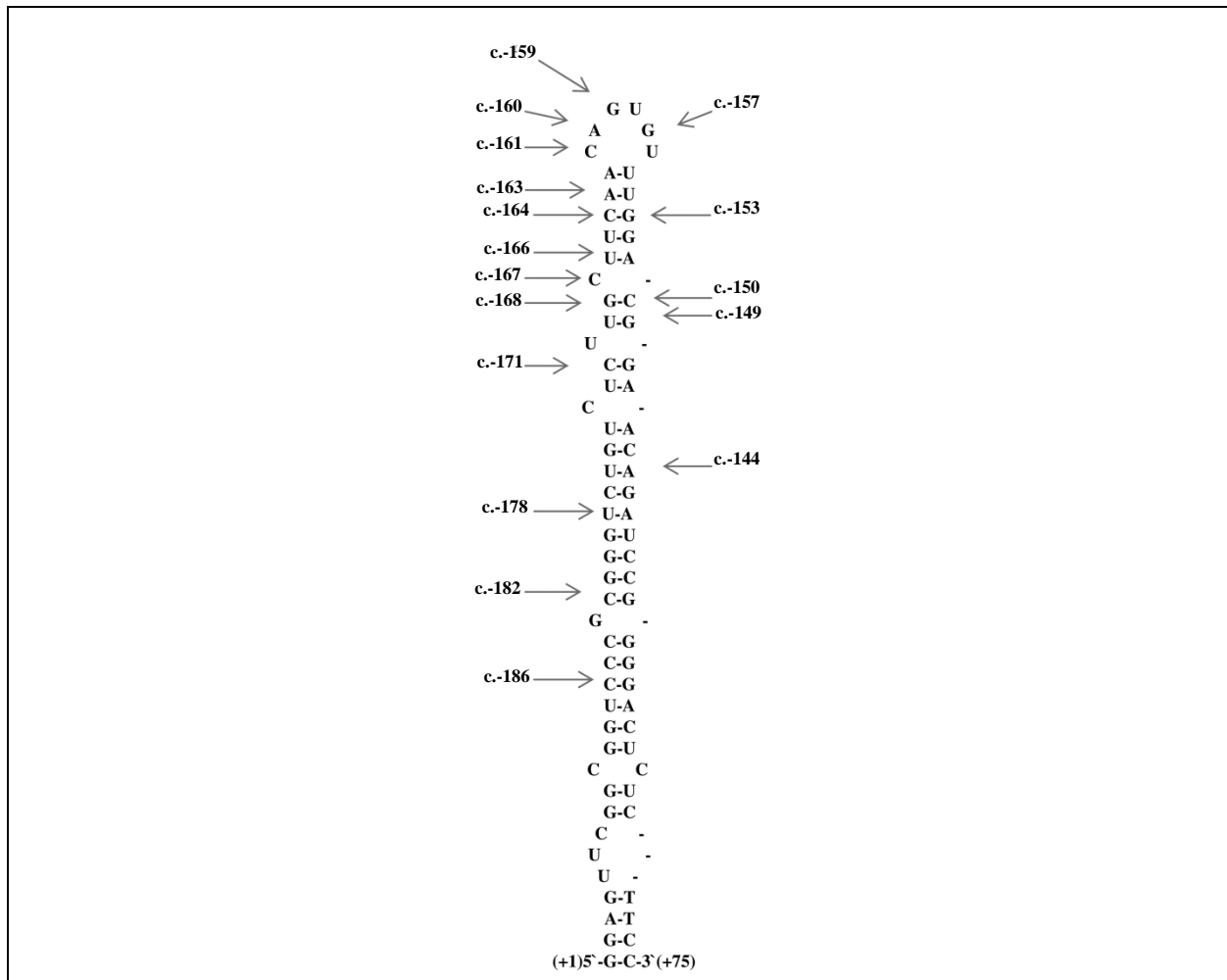
ANNEXE B

Liste des mutations associées au SHFC rapportées dans plus d'une famille et par plus d'un groupe

MUTATION	ÉTUDE	NOMBRE DE FAMILLES/PATIENTS
c.-171C>G	Muñoz-Muñoz, 2013; Bosio, 2004	2/6
c.-168G>A ou G>C ou G>T	Bennett, 2013; Muñoz-Muñoz, 2013; Shekunov, 2011; Millonig, 2009; Vanita, 2006; Lachlan, 2004; Craig, 2003; Hetet, 2003; Simsek, 2003; Campagnoli, 2002; McLeod, 2002; Volkmann, 2000; Cicilano, 1999; Kato, 1999; Martin, 1998; Cazzola 1997	24/113
c.-167C>A ou C>T	Muñoz-Muñoz, 2013; Ladero, 2004; Lachlan, 2004; Hetet, 2003; Brooks, 2002; Giansily, 2001; Balas, 1999	9/23
c.-164C>A ou C>G ou C>T	Luscieti, 2013; Lachlan, 2004; Cremonesi, 2003; Hetet 2003; Mumford, 1998	4/16
c. -163 A>T ou A>G	Garcia Erce, 2006; Cremonesi, 2003	2/10
c.-162-161delAC	Hetet, 2003	1/1
c.-161 C>A ou C>G ou C>T	Muñoz-Muñoz, 2013; Hernandez Martin, 2008; Papanikolaou, 2006; Ferrante, 2005; Garderet, 2004; Lachlan, 2004; Craig, 2003; Hetet, 2003; McLeod, 2002; Arosio, 1999; Cicilano, 1999; Mumford, 1998	16/44
c.-160A>G	Bowes, 2014; Del Castillo Rueda, 2007; Hugues, 2006; Ferrante, 2005; Mohn, 2005; Lachlan, 2004; Craig, 2003; Hetet, 2003; McLeod, 2002; Cremonesi, 2001; Perez de Nanclares, 2001; Mumford, 2000; Cicilano, 1999; Barton, 1998; Arnold, 1997; Aguilar-Martinez, 1996; Beaumont, 1996	11/50

ANNEXE C

Séquence nucléotidique et structure secondaire de l'IRE situé dans la région 5' UTR du gène *FTL*.



Adapté de Millonig *et al.*, 2010.

RECHERCHE DE PARÉCHOVIRUS PAR RT-PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL (RÉFÉRENCE – 2014.02.001)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine

1.2 Date de transmission de la demande d'examen au MSSS : 15 janvier 2014

1.3 Date de réception des demandes à l'INESSS : 10 mai 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (*Reverse transcriptase-quantitative Polymerase chain reaction* ou RT-qPCR) pour la recherche de paréchovirus humain (HPeV) sur des spécimens de sang et de liquide céphalo-rachidien (LCR)

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'analyse par RT-qPCR permet la détection et la quantification des HPeV. La méthodologie a été publiée par les auteurs [Renaud *et al.*, 2011]. L'objectif de cette technique est de quantifier les particules virales par la mesure du nombre de copies du génome de HPeV présentes dans le sang ou le LCR du patient. L'ARN du virus est d'abord transcrit en ADN par l'enzyme transcriptase inverse. Ensuite, il est amplifié puis quantifié par qPCR utilisant une courbe standard intégrée faite à partir de contrôles d'ARN quantifié. Il s'agit d'un essai avec sonde d'hydrolyse (TaqMan). Une sonde d'hydrolyse est une sonde à laquelle sont liés un agent fluorescent et un agent inhibiteur de fluorescence. Lors de l'amplification de l'ADN, la sonde se lie au gabarit et, sous l'effet de l'enzyme Taq polymérase, la sonde est liée au produit d'amplification et son inhibiteur est clivé, permettant ainsi la détection et la quantification du produit d'amplification. L'analyse est réalisée sur un appareil ABI 7500. L'analyse cible une séquence non codante située à l'extrémité 5' du génome (*5' untranslated region* : 5'-UTR); cette séquence est conservée parmi les HPeV. Le mélange réactionnel contient également un contrôle interne constitué d'un ARN csG4 (*chlorophyle synthase gene 4*), de ses amorces et d'une sonde spécifique à sa détection. Ainsi, les étapes de transcription, d'amplification et de détection sont contrôlées [Renaud *et al.*, 2011].

2.3 Société ou développeur

La méthode a été développée par le demandeur au laboratoire de virologie moléculaire de l'Université de Washington (Seattle, É.-U.) et publiée en 2011 [Renaud *et al.*, 2011]. L'information soumise par le demandeur montre que des modifications ont été apportées en ce qui a trait aux amorces et au contrôle interne utilisé.

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) : ne s'applique pas; protocole maison.

2.7 Valeur pondérée : 42,0

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

- Patients de moins de 18 ans avec manifestations cliniques de méningite ou d'encéphalite avec ou sans imagerie compatible.
- Patients de moins de 3 mois présentant un tableau clinique de sepsie, accompagnée ou non d'une hépatite fulminante ou d'une coagulopathie.
- Adultes présentant un tableau clinique d'encéphalite; l'analyse pourra alors faire l'objet d'une demande particulière (autrement, les adultes seront exclus).

3.2 Description de la maladie visée

Les paréchévirus font partie de la famille des *Picornaviridae* au même titre que les entérovirus (EV). Le genre *Parechovirus* contient deux espèces, soit le virus de Ljungan et le paréchévirus humain (HPEV) pour lequel 16 types sont documentés⁶.

Les HPEV sont des virus fréquemment responsables d'infections en pédiatrie [Esposito *et al.*, 2014] chez des individus immunocompétents aussi bien qu'immunocompromis⁷ [Rahimi *et al.*, 2013]. Une étude finlandaise a montré que 8 enfants sur 9 (89 %) présentaient des anticorps contre le virus HPEV1 avant l'âge de 2 ans et qu'au Japon, parmi des enfants âgés de 4 à 6 ans, 17/20 (85 %) présentaient une sérologie positive pour l'HPEV3 [Ito *et al.*, 2004; Joki-Korpela et Hyypia, 1998]. Ces données montrent que la quasi-totalité des cas d'infection à HPEV surviennent chez des enfants de moins de 5 ans et que la majorité de ces infections touchent des enfants en très bas âge, tel que présenté dans le tableau en annexe.

L'infection à HPEV peut être associée à une variété de présentations cliniques : infection asymptomatique, maladie bénigne ou maladie plus sévère telle que la méningite, l'encéphalite et un syndrome évocateur de sepsie [Esposito *et al.*, 2014]. Ces atteintes plus sérieuses se confondent avec la méningite bactérienne, l'encéphalite bactérienne et la sepsie [De Crom *et al.*, 2012]. Bien que soient décrits des cas d'hépatite fulminante ou

6. Pirbright Institute. Human parechovirus [site Web]. Disponible à : <http://www.picornaviridae.com/parechovirus/hpev/hpev.htm> (consulté le 12 août 2014).

7. Public Health England (PHE). UK Standards for Microbiology Investigations: Meningoencephalitis. Londres, Angleterre : PHE; 2014. Disponible à : https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344105/S_5i1.pdf (consulté le 8 juillet 2014).

syndrome de coagulopathie disséminée (tel que décrit par le demandeur), l'infection à HPeV a généralement une issue favorable et les patients peuvent obtenir leur congé rapidement après le diagnostic [Schuffenecker *et al.*, 2012; Renaud *et al.*, 2011]. La prise en charge des patients symptomatiques se limite à un traitement de soutien puisqu'aucune médication antivirale n'est efficace pour les HPeV [Levorson et Jantusch, 2009]. La présence de fièvre est le symptôme le plus fréquemment utilisé pour estimer la durée de l'infection, et les auteurs en arrivent à une durée médiane variant entre 2 et 3 jours [Felsenstein *et al.*, 2014; Jeziorsky *et al.*, 2014]. À la suite de l'infection, la majorité des patients obtiennent leur congé en 3 à 5 jours [De Crom *et al.*, 2013; Wolthers *et al.*, 2008]. Le HPeV partage avec l'entérovirus une présentation clinique, une fréquence et une gravité similaires chez les jeunes enfants [Fischer *et al.*, 2014].

En règle générale, les patients font l'objet d'une recherche d'HPeV parce qu'ils présentent des tableaux cliniques de sepsie ou de méningo-encéphalite aseptique⁸. On observe alors dans des prélèvements de LCR et de sang des taux de positivité à HPeV variant entre 0,7 et 43 % (voir annexe) [Rahimi *et al.*, 2013; Sharp *et al.*, 2013; Harvala *et al.*, 2009]. L'infection à HPeV présente également une distribution saisonnière et biannuelle⁹ [Renaud *et al.*, 2011].

La gestion clinique d'un patient présentant une méningite aseptique ou un « syndrome évocateur de sepsie » (*sepsis-like syndrome*) est basée sur un traitement de soutien et la poursuite du traitement antibiotique empirique jusqu'à ce qu'il y ait certitude que l'infection n'est pas d'origine bactérienne (p. ex. identification virale ou culture bactérienne négative). Des examens diagnostiques additionnelles peuvent également être utilisées (examens d'imagerie par résonance magnétique, radiographies pulmonaires ou abdominales, électroencéphalogrammes) [Ramers *et al.*, 2000].

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur estime à 1000 par année au Québec le nombre de recherches de paréchovirus humain par RT-qPCR.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Microbiologie, infectiologie, pédiatrie.

3.5 Modalités d'administration du test

Cette analyse peut être réalisée sur des échantillons de sang total et de LCR.

Le demandeur prévoit un temps de réponse de trois jours. L'analyse sera effectuée trois fois par semaine.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

L'analyse est unique; aucune analyse faite au Québec ne permet d'établir la présence de paréchovirus humain.

Le Laboratoire national de microbiologie (LNM) à Winnipeg effectue la détection

8. Méningite aseptique : méningite qui n'est pas causée par des bactéries pyogéniques. Bien qu'elle soit souvent causée par certains virus, elle peut être d'origine infectieuse ou non infectieuse (Ramachandran TS. Aseptic meningitis [site Web]. Medscape; 2014. Disponible à : <http://emedicine.medscape.com/article/1169489-overview> (consulté le 7 août 2014)).

9. Distribution cyclique dont les cas apparaissent tous les 2 ans.

moléculaire et le typage de paréchévirus par RT-PCR avec un temps de réponse de 21 jours sur des spécimens de virus cultivés, de LCR, de selles et autres¹⁰.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

La RT-qPCR est l'étalon or (*gold standard*) pour la détection de HPeV puisqu'elle est plus rapide, plus sensible et plus simple que la culture [Harvala *et al.*, 2014; de Crom *et al.*, 2012].

En effet, la culture virale des HPeV est complexe puisque les conditions de culture et les lignées cellulaires varient d'un HPeV à l'autre. Ainsi, les méthodes de culture virale conventionnelles ne sont pas adaptées à la recherche des HPeV [Selvaraju *et al.*, 2013]. De plus, les cultures virales sont de moins en moins utilisées parce que leur temps de réponse est trop long pour être utile lors de la prise en charge des patients.

Des méthodes sérologiques ont été mises au point pour la détection de différents HPeV, mais les réactifs de typage des HPeV 3 à 6 ne sont pas largement répandus [Nix *et al.*, 2008; Joki-Korpela et Hyypia, 1998]. Des taux élevés de séropositivité à HPeV dès un jeune âge compliquent l'interprétation des résultats sérologiques [Ito *et al.*, 2004].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La littérature repérée a permis de mettre en évidence les avantages suivants de l'identification rapide du paréchévirus humain par RT-qPCR :

- réduire la durée de l'hospitalisation [Rahimi *et al.*, 2013; Walters *et al.*, 2011; Wolthers *et al.*, 2008];
- favoriser un usage approprié des antibiotiques, une réduction de la durée des traitements antibiotiques, voire leur cessation lors de la confirmation du diagnostic [Rahimi *et al.*, 2013; Shoji *et al.*, 2013; Walters *et al.*, 2011; Wolthers *et al.*, 2008];
- prévenir sa transmission dans les unités de soins intensifs [Piralla *et al.*, 2014].

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

La détection d'HPeV par RT-qPCR ne remplace aucun test inscrit au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*, édition 2014-2015. Elle ne remplace pas non plus le test réalisé au Laboratoire national de microbiologie (LNM) puisque ce dernier offre le typage du paréchévirus et inclut également la détection du virus de Ljungan (paréchévirus non humain). De plus, le temps de réponse offert par le LNM ajouté au temps de transport ne permet pas d'obtenir le résultat assez tôt pour intervenir efficacement.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

La disponibilité d'un test hautement sensible et rapide (temps de réponse de moins de 3 heures) permet d'améliorer la gestion clinique des patients en réduisant la durée de séjour

10. Laboratoire national de microbiologie (LNM). Enterovirus – Paréchévirus [site Web]. Disponible à : https://www.nlm-lnm.gc.ca/guide2/pathogen_fraview.php?refdiagID=301 (consulté le 8 juillet 2014).

et la durée des traitements antibiotiques [Bennett *et al.*, 2011].

À titre d'exemple, une étude rétrospective sur 15 nouveau-nés et jeunes enfants hospitalisés pour fièvre et syndrome évocateur de sepsie (éruption maculopapulaire palmo-plantaire) montre qu'il a été possible de cesser l'administration d'antibiotiques en cours d'hospitalisation après la détection de HPeV3 sur sérum ou LCR par PCR en temps réel [Shoji *et al.*, 2013].

Le patient qui reçoit un résultat positif n'aura pas à subir d'autres examens diagnostiques afin de déterminer la cause de ses symptômes. Dans la mesure où sa situation s'améliore, le patient pourra recevoir son congé plus rapidement.

Aucun traitement n'est actuellement disponible pour combattre l'infection à HPeV [Levorson et Jantusch, 2009]. Un résultat positif permet plutôt de cesser le traitement antibiotique d'un patient alors qu'un résultat négatif ne compromet pas sa prise en charge.

Un test de HPeV ne devrait pas provoquer d'effets indésirables additionnels puisque, dans les conditions où le test est proposé, il y a déjà un prélèvement sanguin ou de LCR fait pour la recherche d'entérovirus ainsi que pour des cultures bactériennes de base.

Plusieurs auteurs (dont le demandeur) concluent favorablement à l'introduction de tests de détection de paréchovirus humain :

- les HPeV devraient être testés par RT-qPCR chez les enfants de moins de 3 mois présentant de la fièvre et d'autres symptômes de sepsie durant les mois d'été et d'automne [Renaud *et al.*, 2011];
- les HPeV devraient être testés dans le LCR des enfants de moins d'un an admis à l'hôpital pour un syndrome de sepsie ou de méningo-encéphalite [Pineiro *et al.*, 2010];
- l'infection à paréchovirus devrait être recherchée chez les nouveau-nés et nourrissons fébriles sans cause bactérienne reconnue [Eyssette-Guerreau *et al.*, 2013];
- la recherche de HPeV par RT-qPCR devrait être faite chez les enfants de moins de 6 mois présentant un tableau de sepsie durant les mois d'été et d'automne [Sharp *et al.*, 2013].

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)	X		
Valeur prédictive négative (VPN)	X		
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

Sensibilité et spécificité

Une étude prospective néerlandaise a été conduite de 2008 à 2011 sur 285 patients âgés de 0 à 16 ans présentant des symptômes systémiques de méningite, de diarrhée, d'infection des voies respiratoires et autres. La RT-qPCR a permis de repérer 44 cas d'infection à HPeV dont 16 méningites. Les résultats de cette étude montrent la performance diagnostique de la RT-qPCR et de la culture virale sur différents types de spécimens. Par la RT-qPCR, 281 prélèvements de selles, 296 nasopharyngés, 189 de sang, 250 d'urine et 141 de LCR ont été testés. Par la culture virale, 159 prélèvements de selles, 146 nasopharyngés et 80 de LCR ont été testés. Un patient était considéré comme positif si au moins un type de prélèvement par l'une des deux techniques était positif. Cela engendre un biais dans le calcul de la spécificité et de la valeur prédictive positive du premier tableau, qui sont de 100 % dans tous les cas où il y a des tests positifs.

Tableau 1 Comparaison de la performance diagnostique de la RT-qPCR et de la culture virale pour la détection d'HPeV dans différents spécimens

	SELLES		ÉCOUVILLONNAGES NASOPHARYNGÉS		LCR		SANG	URINE
	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	RT-qPCR
	%							
SENSIBILITÉ	95,1	18,5	63,6	0	84,2	0	79,3	56,8
SPÉCIFICITÉ	100	100	100	100	100	100	100	100
VPP	100	100	100	-	100	-	100	100
VPN	99,0	84,3	93,1	86,3	97,4	81,6	95,7	92,0

Adaptation du tableau 3a de De Crom *et al.*, 2013.

La sensibilité de la RT-qPCR est plus élevée que celle de la culture virale indépendamment du type de spécimen testé. La sensibilité de la RT-qPCR sur des prélèvements de sang et de LCR est respectivement de 84,2 et 79,3 %, et ce, que l'échantillonnage soit composé de patients avec des symptômes de méningite, de patients avec des symptômes systémiques ou autres. Les tableaux 2 et 3 présentent les résultats pour les mêmes paramètres selon qu'il s'agit du diagnostic d'une infection systémique à HPeV ou d'une méningite.

Tableau 2 Comparaison de la performance diagnostique de la RT-qPCR et de la culture virale pour HPeV dans les cas d'infection systémique sans méningite

	SELLES		ÉCOUVILLONNAGES NASOPHARYNGÉS		SANG	URINE
	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	RT-qPCR
	%					
SENSIBILITÉ	100	22,2	73,3	0	100	76,9
SPÉCIFICITÉ	9,1	88,9	58,3	100	85,7	90,9
VPP	74,4	80,0	81,5	-	95,7	95,2
VPN	-	36,4	46,7	26,3	100	62,5

Adaptation du tableau 3b de De Crom *et al.*, 2013.

La recherche de paréchovirus sur un échantillon sanguin est optimale pour le diagnostic d'une infection systémique à HPeV (sensibilité : 100 %; spécificité : 85 %). La spécificité obtenue avec les prélèvements sanguins est de 85 % puisque les cas de méningite ont également été positifs selon le test sanguin. La recherche dans les prélèvements de selles est très sensible (100 %), mais elle n'est pas spécifique à une infection systémique (9,1 %).

Tableau 3 Comparaison de la performance diagnostique de la RT-qPCR et de la culture virale pour HPeV dans les cas de méningite

	SELLES		ÉCOUVILLONNAGES NASOPHARYNGÉS		LCR		SANG	URINE
	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	Culture virale	RT-qPCR	RT-qPCR
	%							
SENSIBILITÉ	100	0	81,3	0	100	0	100	73,3
SPÉCIFICITÉ	0	100	0	100	100	100	0	50,0
VPP	84,2	-	81,3	-	100	-	66,7	92,3
VPN	-	18,2	0	16,7	100	14,3	-	20,0

Adaptation du tableau 3c de De Crom *et al.*, 2013.

Pour le diagnostic de la méningite, la RT-qPCR sur des prélèvements de selles, de LCR et de sang a une sensibilité de 100 %. Des prélèvements positifs pour HPeV dans des spécimens tels que les selles et le sang ne sont pas spécifiques à une infection méningée. Bien que la spécificité soit de 100 % dans les prélèvements de LCR, ce type de prélèvement n'a été collecté que lorsqu'il était indiqué par la présentation clinique. Un cas de méningite est défini comme un cas symptomatique avec présence de HPeV dans le LCR. Ainsi, on observe des biais dans les taux de sensibilité, spécificité, VPP et VPN sur les prélèvements de LCR.

La première étude utilisant la RT-qPCR montre une sensibilité de 100 % sur 36 spécimens

cliniques de LCR, de selles, d'écouvillonnages rectaux et nasopharyngés, de tissus pulmonaires et de rate contenant des HPeV1 à 4 et HPeV 6 (confirmés par séquençage) [Nix *et al.*, 2008].

Lors d'une étude de validation clinique d'une méthode RT-qPCR pour la détection des HPeV, 33 patients ont subi le test par RT-qPCR sur des échantillons de sang et de LCR. Trois patients ont eu une réaction positive dans les deux types de prélèvements et trente une réaction négative dans les deux types [Noordhoek *et al.*, 2008]. L'étude ne prévoyait toutefois pas de méthode pour confirmer les résultats positifs (par exemple le séquençage).

Nix et ses collaborateurs ont développé une PCR *nichée*¹¹ (*nested-PCR*), méthode reconnue pour sa spécificité, et ils l'ont testée pour la détection de paréchévirus sur 107 spécimens cliniques positifs confirmés par RT-qPCR. Ils ont obtenu une sensibilité de 94 % (LCR : 7/8, selles : 86/92, écouvillonnage rectal : 3/3, nasopharyngés : 2/2, rate : 2/2) [Nix *et al.*, 2010].

Lors d'une étude rétrospective étatsunienne, la RT-qPCR a montré une spécificité de 100 % sur une banque de 867 spécimens cliniques de LCR, ce qui appuie l'utilisation du test directement sur des spécimens cliniques [Renaud *et al.*, 2011].

La RT-qPCR n'a révélé aucun résultat positif pour HPeV lorsque 129 spécimens cliniques de LCR contenant les virus Coxsackie (A9, B4, B5), écho virus (6, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 30) et entérovirus 71 ont été testés [Nix *et al.*, 2008].

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		X	
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice		X	
Concordance	X		
Corrélation entre test et comparateur		X	

Sensibilité

La méthode RT-qPCR a présenté une sensibilité de 100 % (30/30) après 30 cycles sur des spécimens contenant 30 copies et une sensibilité de 80 % (24/30) sur des spécimens contenant 10 copies d'ARN d'HPeV1. À 3 copies, 11/30 (36,7 %) étaient positifs [Nix *et al.*, 2008]. Les auteurs rapportent que la RT-qPCR est de 100 à 1000 fois plus sensible que la culture virale [Nix *et al.*, 2008].

La sensibilité des amorces PCR a été vérifiée sur des souches de paréchévirus (souches de référence et des isolats cliniques), et la RT-qPCR a amplifié avec succès l'ensemble des souches (32 souches d'HPeV1, 4 d'HPeV2, 2 d'HPeV3, 4 d'HPeV4, 9 d'HPeV5, 1 d'HPeV6 et 4 de virus de Ljungan) [Nix *et al.*, 2008].

11. La PCR « nichée » est une réaction PCR en 2 étapes avec 2 paires d'amorces spécifiques pour la même séquence d'ADN. Une première étape de 10 cycles est réalisée avec la première paire d'amorces puis on ajoute ensuite un excès de la deuxième paire d'amorces avant de prolonger la réaction pour environ 25 cycles. Cette technique permet de gagner en spécificité lorsqu'il y a des séquences homologues (Université Pierre et Marie Curie, Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière (FMPMC-PS). Biologie génique – Objectifs au cours de formation de base IFTAB [site Web]. Disponible à : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.8.11.html> (consulté le 8 août 2014)).

Tableau 4 Différentes limites de détection rapportées dans la littérature

ÉTUDE	MÉTHODE	TYPE DE VIRUS HPEV	LIMITE DE DÉTECTION	
			CCID ₅₀ /ml*	Nombre de copies/ml
Felsenstein <i>et al.</i> , 2014	5µl de solution d'acides nucléiques	HPeV3 Autres types	32 1,6 x 10 ³ à 3,2 x 10 ⁵	
		HPeV3 Autres types	1,6 7,9 à 1,6 x 10 ³	
Selvaraju <i>et al.</i> , 2013		HPeV3 Avec CI MS2 [†] Sans CI MS2 Autres types Sans CI MS2	1 x 10 ^{0,6} 1 x 10 ^{1,6} 10 ^{0,001} et 10 ^{0,1}	
Schuffenecker <i>et al.</i> , 2012	Parechovirus- Rgene de Biomérieux	HPeV1	13,9	
Bennett <i>et al.</i> , 2011	Platinum RT-PCR	HPeV1		1,5 x 10 ^{3§}
	Express qPCR			2,3 x 10 ^{3§}
Renaud <i>et al.</i> , 2011		HPeV1		5 x 10 ²
Van der Sanden <i>et al.</i> , 2008		HPeV1	4 x 10 ^{4‡}	2,7 x 10 ^{4§}
		HPeV2	1,6 x 10 ^{5‡}	1,1 x 10 ^{5§}

* CCID signifie *Cell Culture Infectious dose*. CCID₅₀/ml est une mesure de la concentration en agents infectieux contenus dans une solution. Par exemple, une solution à 1 CCID₅₀/ml, signifie que 1 ml de cette solution a 50 % de risques (ou 5 tubes sur 10) d'infecter une culture cellulaire; si la solution est à 14 CCID₅₀/ml, c'est qu'elle est 14 fois plus concentrée que sa CCID₅₀/ml. Ainsi, plus la CCID₅₀/ml est élevée, plus la solution est concentrée en agent infectieux.

† Bactériophage MS2, dont le génome est un ARN simple brin d'orientation positive.

‡ Les valeurs ont subi une conversion à partir des articles; 10^{6,6} x 10⁻² = 4 x 10⁴ et 10^{6,2} x 10⁻¹ = 1,6 x 10⁵

§ Le nombre de copies par réaction a été converti en concentration.

La variabilité entre les seuils de détection établis dans les différentes études est due à la détermination de la CCID₅₀ qui dépend de la capacité du HPeV à croître sur la culture cellulaire utilisée. Les seuils établis ici sont généralement inférieurs à ce à quoi on pourrait s'attendre pour des virus dont la croissance est mieux standardisée.

Spécificité

La spécificité des amorces PCR a été mise à l'épreuve et n'a présenté aucun résultat positif lorsque testée avec les six souches virales suivantes : virus Coxsackie (A16, A24), écho virus 30, entérovirus 68, virus d'encéphalomyocardite et virus d'encéphalomyélite

murine de Theiler [Nix *et al.*, 2008].

La RT-qPCR HPeV ne présente aucune réactivité croisée avec 103 spécimens de rhinovirus obtenus par culture virale et confirmés par RT-qPCR. La RT-qPCR a toutefois présenté une faible réactivité croisée sur des spécimens positifs d'entérovirus (142) validés dans les mêmes conditions. Parmi les spécimens d'entérovirus, on trouve Coxsackie A, Coxsackie B3-5, échovirus 6, 9, 11, 30 et entérovirus 71 [Renaud *et al.*, 2011]. La concentration élevée de virus dans une culture virale pourrait réduire la spécificité du test.

Aucune réactivité croisée avec le HPeV n'a été obtenue sur 84 spécimens de culture virale positifs pour l'EV [Van der Sanden *et al.*, 2008].

Aucune réactivité croisée n'a été relevée entre la RT-qPCR HPeV et les pathogènes suivants :

- Virus de l'influenza [A, A/H1N1, B], parainfluenza [1 à 4], virus respiratoire syncytial, métapneumovirus humain, coronavirus [229E, OC43, NL63 et HKU1], adénovirus, *Pneumocystis jirovecii*, *Mycoplasma pneumoniae*, norovirus, rotavirus, rougeole, virus de l'herpès (types 1 et 2), virus varicelle-zona, virus Epstein-Barr, cytomégalovirus et virus des oreillons [Bennett *et al.*, 2011];
- Virus Coxsackie (A2, A9, A13, A14, A16, A24, B1, B3, B4, B5), écho virus (1-7, 9, 12, 14, 15, 17, 19-21, 24-27, 29, 31, 32), entérovirus 71, poliovirus (1 et 3) et rhinovirus [De Crom *et al.*, 2012];
- Herpèsvirus (types 1 et 2), virus varicelle-zona, adénovirus, virus respiratoires syncytial (A et B), para-influenza (1 à 3), influenza (A et B), métapneumovirus humain, rhinovirus, coronavirus (OC43, 229E, NL63), norovirus, rotavirus, sapovirus et astrovirus [Nielsen *et al.*, 2013];
- Virus Coxsackie A9 et B6, écho virus 1, rhinovirus, norovirus, influenza, para-influenza, métapneumovirus humain, virus respiratoire syncytial, adénovirus, virus BK, cytomégalovirus, virus Epstein-Barr, virus de l'herpès, virus de l'herpès humain et virus varicelle-zona [Felsenstein *et al.*, 2014];
- Virus Coxsackie (types A9, B1, B2, B3, B4, B5), écho virus (types 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11), rhinovirus (types 8, 13, 26, 27, 39), virus de l'herpès 1 et 2, virus de l'herpès humain 6, cytomégalovirus et virus d'Epstein-Barr [Selvaraju *et al.*, 2013];
- La trousse R-gène Parechovirus, telle que citée par Schuffenecker, ne présente aucune réactivité croisée avec 26 souches de *Picornaviridae* non-HPeV. Parmi ceux-ci, notons des virus Coxsackie, écho virus, entérovirus, poliovirus, rhinovirus [Schuffenecker *et al.*, 2012].

Concordance

Une concordance de 96 % a été établie lors du séquençage de 58 spécimens dont le test RT-qPCR était positif, dont 53 ont été séquencés avec succès. Le séquençage n'a pu être tenté sur 3 spécimens et il a échoué pour les 2 derniers spécimens, et ce, malgré des tentatives répétées [Selvarangan *et al.*, 2011].

Bennett et ses collaborateurs ont testé 120 spécimens de LCR en parallèle avec une méthode de RT-qPCR en multiplex et une méthode maison de PCR *niché*e. Ils ont obtenu une concordance de 100 % (7 HPeV positif et 113 négatifs) [Bennett *et al.*, 2011].

Soixante-dix spécimens cliniques (33 positifs et 37 négatifs) dont les résultats ont été établis par RT-PCR ont été testés avec une RT-qPCR spécifique à HPeV3 et une Pan-HPeV. Des

concordances de 98,6 et 100 % respectivement ont été obtenues [Selvaraju *et al.*, 2013].

Reproductibilité

Bennett et ses collaborateurs ont évalué la reproductibilité intraessai et interessai de leur méthode RT-qPCR maison en utilisant les trousse de réactifs Platinum one-step kit et Express qPCR one-step kit [Bennett *et al.*, 2011]. Les essais ont été effectués 20 fois dans les deux cas. Il en ressort une forte reproductibilité puisque la variation est faible (tableau 5).

Tableau 5 Reproductibilité de la RT-qPCR avec les trousse de réactifs Platinum RT-PCR et Express qPCR

TYPE DE REPRODUCTIBILITÉ	MÉTHODE	DÉTECTION				COEFFICIENT DE VARIATION
		Seuil moyen (cycle)	Écart-type	Max*	Min*	
Interessai	Platinum RT-PCR	27,02	0,48	28,45	25,6	0,0178
	Express qPCR	26,86	0,32	27,31	26,23	0,0119
Intraessai	Platinum RT-PCR	27,34	0,28	28,81	26,51	0,0102
	Express qPCR	27,54	0,35	28,03	27,02	0,0127

Tableau adapté du tableau 2 de Bennett *et al.*, 2011.

*Le maximum et le minimum représentent la valeur moyenne du seuil \pm 3 écarts-types.

La reproductibilité d'une méthode RT-qPCR maison a été vérifiée avec des essais sur HPeV3 à $1 \times 10^{1,6}$ CCID₅₀/ml en triplicata et sur 3 jours différents. L'auteur a obtenu une excellente reproductibilité en établissant des variabilités intraessais de 0,5 cycle d'amplification (coefficient de variation de 1,3 %) et interessais de 1 cycle d'amplification (coefficient de variation de 2,8 %) [Selvaraju *et al.*, 2013].

5.4 Recommandations d'autres organismes

Un guide d'utilisation des services de laboratoire de microbiologie à des fins de diagnostic des maladies infectieuses a été publié par l'Infectious Disease Society of America (IDSA) et l'American Society of Microbiology (ASM). On y mentionne l'utilisation du test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) aux fins de diagnostic du paréchovirus dans les spécimens de LCR pour la méningite et l'encéphalite [Baron *et al.*, 2013]. On y mentionne également la recherche dans les selles dans les cas de gastroentérite par TAAN et culture virale.

La recherche de paréchovirus au Royaume-Uni est encadrée par les *UK Standards for Microbiology Investigations*, produits par le Public Health England qui englobe aujourd'hui la Health Protection Agency. Les *UK Standards for Microbiology* indiquent que la recherche de paréchovirus est réalisée sur des prélèvements de LCR par TAAN lorsque le tableau clinique pointe vers la méningo-encéphalite chez des enfants de moins de 3 ans et des patients immunosupprimés seulement¹². Une surveillance a également été mise en place au

12. Public Health England (PHE). UK Standards for Microbiology Investigations: Meningoencephalitis. Londres, Angleterre : PHE; 2014. Disponible à : https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344105/S_5i1.pdf (consulté le 8 juillet 2014).

Royaume-Uni depuis le 1^{er} juillet 2014 chez les enfants de moins de 90 jours atteints de méningite à paréchovirus¹³.

13. Public Health England (PHE). Enterovirus and Parechovirus meningitis in infants <90 days of age. Beginning 01 July 2014. Disponible à : http://www.his.org.uk/files/5414/0181/4935/Study_Flyer_Template_TO_MICROBIOLOGISTS_FINAL_s_k_29_5_14.pdf (consulté le 12 août 2014).

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

N'a pas été analysé.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Un résultat de détection du paréchovirus humain positif dans un LCR permet d'exclure une méningite ou une encéphalite bactérienne, et dans un prélèvement sanguin il permet d'exclure une sepsie bactérienne (selon les symptômes). Un tel résultat obtenu dans un court délai permet de cesser un traitement antibiotique empirique, réduisant ainsi le coût des traitements et l'exposition aux antibiotiques. Il permet également de libérer un patient dont la situation clinique n'est pas jugée critique et de réduire les investigations diagnostiques.

7.2 Validité clinique

La RT-qPCR a montré une sensibilité clinique de 94 à 100 % et une spécificité de 100 % pour la détection des HPeV dans les cas d'infection systémique et de méningite.

La détection des HPeV par RT-qPCR dans le sang en cas d'infection systémique sans méningite présente une valeur prédictive positive (VPP) supérieure à 95 % et la détection dans le LCR dans le cas d'une méningite présente une VPP de 100 %.

La détection des HPeV par RT-qPCR dans les prélèvements sanguins et de LCR présente une valeur prédictive négative supérieure à 95 %.

7.3 Validité analytique

La RT-qPCR peut être réalisée en trois heures au lieu de plusieurs jours pour la culture virale, et son efficacité (sensibilité et spécificité) est meilleure que celle de la culture virale. Les résultats montrent une forte reproductibilité et une très bonne concordance.

Des seuils de détection entre 9 et 500 copies virales ont été établis. Des essais ont également montré des seuils de détection allant de $10^{0,001}$ à $3,2 \times 10^5$ CCID₅₀/ml. Cependant, comme la croissance des différents HPeV est différente d'une culture cellulaire à l'autre, ces données sont difficilement interprétables. On démontre que le seuil de détection de la RT-qPCR est augmenté d'un facteur 10 lors de l'utilisation d'un contrôle interne (MS2). La RT-qPCR est considérée comme étant de 100 à 1000 fois plus sensible que la culture virale pour la détection des HPeV.

Par ailleurs, 8 études sur 9 n'ont montré aucune réaction croisée avec la multitude de virus testés. La neuvième étude a présenté une spécificité de 97 % sur des cultures virales positives (titre élevé de virus).

La reproductibilité a pu être établie par des coefficients de variation intraessai de 1,0 à 1,3 % et interessai de 1,2 à 2,8 %.

La concordance, allant de 96 à 100 %, a été établie entre la RT-qPCR, une RT-qPCR spécifique à HPeV3, une PCR *nichée* et le séquençage de résultats positifs obtenus.

7.4 Recommandations d'autres organismes

L'Infectious Disease Society of America (IDSA), l'American Society for Microbiology (ASM) et le Public Health England endossent l'utilisation de méthodes TAAN pour le diagnostic de la méningite et de l'encéphalite à paréchovirus. De plus, le Public Health England encadre son utilisation chez les enfants de moins de 3 ans et chez les patients immunosupprimés.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Recherche de paréchovirus par RT-PCR quantitatif en temps réel

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

La recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation de l'introduction conditionnelle à la préparation d'un algorithme associé la recherche d'entérovirus. Il y a lieu de bien établir si l'analyse sera faite en séquence ou en parallèle avec le TAAN entérovirus (code 40061). Dans les deux cas, il faudrait vérifier si les valeurs pondérées doivent être modifiées du fait que le processus d'extraction est le même pour les deux analyses.
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

La disponibilité sur le marché des trousse combinant la recherche des deux types de virus à l'intérieur de panels est également à considérer.

RÉFÉRENCES

- Abed Y et Boivin G. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12(6):969-75.
- Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)^a. *Clin Infect Dis* 2013;57(4):e22-e121.
- Bennett S, Harvala H, Witteveldt J, McWilliam Leitch EC, McLeish N, Templeton K, et al. Rapid simultaneous detection of enterovirus and parechovirus RNAs in clinical samples by one-step real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2011;49(7):2620-4.
- De Crom SC, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Rossen JW. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol* 2013;58(2):449-54.
- De Crom SC, Obihara CC, van Loon AM, Argilagos-Alvarez AA, Peeters MF, van Furth AM, Rossen JW. Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: Comparison of two molecular assays. *J Virol Methods* 2012;179(1):104-7.
- Escuret A, Mirand A, Dommergues MA, Couzon B, Foucaud P, Peigue-Lafeuille H, Marque-Juillet S. Épidémiologie des infections neuroméningées à parechovirus dans un service de pédiatrie générale. *Arch Pediatr* 2013;20(5):470-5.
- Esposito S, Rahamat-Langendoen J, Ascolese B, Senatore L, Castellazzi L, Niesters HG. Pediatric parechovirus infections. *J Clin Virol* 2014;60(2):84-9.
- Eyssette-Guerreau S, Boize P, Thibault M, Sarda H. Infection à parechovirus du jeune nourrisson. *Arch Pediatr* 2013;20(7):772-4.
- Felsenstein S, Yang S, Eubanks N, Sobrera E, Grimm JP, Aldrovandi G. Human parechovirus central nervous system infections in southern California children. *Pediatr Infect Dis J* 2014;33(4):e87-91.
- Fischer TK, Midgley S, Dalgaard C, Nielsen AY. Human parechovirus infection, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2014;20(1):83-7.
- Ghanem-Zoubi N, Shiner M, Shulman LM, Sofer D, Wolf D, Marva E, et al. Human parechovirus type 3 central nervous system infections in Israeli infants. *J Clin Virol* 2013;58(1):205-10.
- Han TH, Chung JY, You SJ, Youn JL, Shim GH. Human parechovirus-3 infection in children, South Korea. *J Clin Virol* 2013;58(1):194-9.
- Harvala H, Griffiths M, Solomon T, Simmonds P. Distinct systemic and central nervous system disease patterns in enterovirus and parechovirus infected children. *J Infect* 2014;69(1):69-74.
- Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. *J Infect Dis* 2009;199(12):1753-60.

- Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 2):391-8.
- Jeziorsky E, Schuffenecker I, Bohrer S, Pain JB, Segondy M, Foulongne V. Relevance of human parechovirus detection in cerebrospinal fluid samples from young infants with sepsis-like illness. *J Clin Lab Anal* 2014; [Epub ahead of print].
- Joki-Korpela P et Hyypia T. Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clin Infect Dis* 1998;27(1):129-36.
- Levorson RE et Jantusch BA. Human parechoviruses. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(9):831-2.
- Mirand A, Archimbaud C, Chambon M, Regagnon C, Brebion A, Bailly JL, et al. Diagnosis of human parechovirus infections of the central nervous system with a commercial real-time reverse transcription-polymerase chain reaction kit and direct genotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74(1):78-80.
- Nielsen AC, Bottiger B, Midgley SE, Nielsen LP. A novel enterovirus and parechovirus multiplex one-step real-time PCR-validation and clinical experience. *J Virol Methods* 2013;193(2):359-63.
- Nix WA, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol* 2010;48(3):202-7.
- Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46(8):2519-24.
- Noordhoek GT, Weel JF, Poelstra E, Hooghiemstra M, Brandenburg AH. Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *J Clin Virol* 2008;41(2):75-80.
- Pineiro L, Vicente D, Montes M, Hernandez-Dorransoro U, Cilla G. Human parechoviruses in infants with systemic infection. *J Med Virol* 2010;82(10):1790-6.
- Piralla A, Mariani B, Stronati M, Marone P, Baldanti F. Human enterovirus and parechovirus infections in newborns with sepsis-like illness and neurological disorders. *Early Hum Dev* 2014;90(Suppl 1):S75-7.
- Rahimi P, Naser HM, Siadat SD, Sohrabi A, Mostafavi E, Motamedirad M, et al. Genotyping of human parechoviruses in Iranian young children with aseptic meningitis and sepsis-like illness. *J Neurovirol* 2013;19(6):595-600.
- Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* 2000;283(20):2680-5.
- Renaud C, Kuypers J, Ficken E, Cent A, Corey L, Englund JA. Introduction of a novel parechovirus RT-PCR clinical test in a regional medical center. *J Clin Virol* 2011;51(1):50-3.
- Schuffenecker I, Javouhey E, Gillet Y, Kugener B, Billaud G, Floret D, et al. Human parechovirus infections, Lyon, France, 2008-10: Evidence for severe cases. *J Clin Virol* 2012;54(4):337-41.
- Selvaraju SB, Nix WA, Oberste MS, Selvarangan R. Optimization of a combined human parechovirus-enterovirus real-time reverse transcription-PCR assay and evaluation of a

- new parechovirus 3-specific assay for cerebrospinal fluid specimen testing. *J Clin Microbiol* 2013;51(2):452-8.
- Selvarangan R, Nzabi M, Selvaraju SB, Ketter P, Carpenter C, Harrison CJ. Human parechovirus 3 causing sepsis-like illness in children from midwestern United States. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(3):238-42.
- Sharp J, Harrison CJ, Puckett K, Selvaraju SB, Penaranda S, Nix WA, et al. Characteristics of young infants in whom human parechovirus, enterovirus or neither were detected in cerebrospinal fluid during sepsis evaluations. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(3):213-6.
- Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A. Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(3):233-6.
- Van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008;46(9):2884-9.
- Walters B, Penaranda S, Nix WA, Oberste MS, Todd KM, Katz BZ, Zheng X. Detection of human parechovirus (HPeV)-3 in spinal fluid specimens from pediatric patients in the Chicago area. *J Clin Virol* 2011;52(3):187-91.
- Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, et al. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis* 2008;47(3):358-63.

ANNEXE A

Épidémiologie des cas d'infection à HPeV en présence de symptômes de méningite, encéphalite et sepsie

ÉTUDE (PAYS)	SPÉCIMENS	NOMBRE DE PATIENTS (ÂGE)	NOMBRE DE CAS POSITIFS (%)	ÂGE DES CAS POSITIFS	DURÉE DE LA FIÈVRE (JOURS)	DURÉE DU SÉJOUR (JOURS)
Abed et Boivin, 2006 (Canada)*	Divers [‡]	28 (-)	28 (-)	27/28 < 4 ans	-	Moy. 3,7
De Crom <i>et al.</i> , 2012 (Pays-Bas)	LCR	232 (0-85 ans)	8 (3,4)	-	-	-
De Crom <i>et al.</i> , 2013 (Pays-Bas)	Divers [‡]	285 (< 16 ans)	44 (15,0)	médian 68 jours	-	Méd. 3
Escuret <i>et al.</i> , 2013 (France)	LCR	380 (0-95 ans)	9 (2,4)	< 2 ans	-	Moy. 4
		137 (< 2 ans)	9 (6,6)			
		82 (< 3 mois)	8 (9,7)			
Felsenstein <i>et al.</i> , 2014 (États-Unis)	LCR	440 (enfants)	12 (2,7)	< 5 ans	Méd. 2	-
		334 (< 5 ans)	12 (3,6)			
Fischer <i>et al.</i> , 2014 (Danemark)	Divers [‡]	6817 (enfants)	202 (3,0)	< 3 mois	-	-
Ghanem-Zoubi <i>et al.</i> , 2013 (Israël) [†]	LCR	367 (0-5 ans)	13 (3,5)	< 3 mois	-	Méd. 4
Han <i>et al.</i> , 2013 (Corée du Sud) [†]	LCR	183 (1-15 ans)	12 (6,5)	< 1 an	-	Moy. 5,7
		105 (< 1 an)	12 (11,4)			
Harvala <i>et al.</i> , 2009 (Royaume-Uni) [†]	LCR	1575 (tout âge)	14 (0,7)	< 3 mois	-	-
		480 (< 3 mois)	14 (2,9)			
Harvala <i>et al.</i> , 2014 (Royaume-Uni)	Sang	128 (< 3 ans)	7 (5,5)	-	-	-
Jeziorsky <i>et al.</i> , 2014 (France)	LCR	120 (< 1 an)	9 (7,5)	-	Méd. 3	Méd. 3,5
Mirand <i>et al.</i> , 2012 (France)	LCR	98 (0-77 ans)	4 (4,1)	< 4 mois	-	Méd. 3,5
		67 (0-16 ans)	4 (5,9)			

ÉTUDE (PAYS)	SPÉCIMENS	NOMBRE DE PATIENTS (ÂGE)	NOMBRE DE CAS POSITIFS (%)	ÂGE DES CAS POSITIFS	DURÉE DE LA FIÈVRE (JOURS)	DURÉE DU SÉJOUR (JOURS)
Nielsen <i>et al.</i> , 2013 (Danemark)	Divers [‡]	2187 (tout âge)	66 (3,0)	95 % < 4 mois	-	-
Noordhoek <i>et al.</i> , 2008 (Pays-Bas)	Divers [‡]	186 (tout âge)	18 (9,7)	16/18 < 1 an	-	-
		106 (< 1 an)	16 (15,2)			
Pineiro <i>et al.</i> , 2010 (Espagne)	LCR	397 (< 12 mois)	9 (2,3)	-	-	Moy. 6,8
		265 (<2 mois)	8 (3)			
Piralla <i>et al.</i> , 2014 (Italie)	LCR et sang	60 (< 1 mois)	3 (5,0)	-	-	-
Rahimi <i>et al.</i> , 2013 (Iran)	LCR	148 (< 8 ans)	64 (43,0)	-	-	-
Renaud <i>et al.</i> , 2011 (États-Unis)	LCR et sang	499 (1-88 ans)	17 (3,4)	< 3 mois	3,5 [§]	Moy. 3
Schuffenecker <i>et al.</i> , 2012 (France)	LCR	1765 (< 5 ans)	33 (2,9)	< 5 mois		Moy. 2,9
Selvarangan <i>et al.</i> , 2011 (États-Unis)	LCR	780 (enfants)	58 (7,0)	Moy. 46 jours	Moy. 2,3	Moy. 3,6
Sharp <i>et al.</i> , 2013 (États-Unis)	LCR	388 (1-18 ans)	66 (17,0)	< 5 mois	Moy. 2,7	Moy. 3,9
Shoji <i>et al.</i> , 2013 (Japon)	LCR, sang	15 (-)	-	< 3 mois	Méd. 3	Méd. 8
Walters <i>et al.</i> , 2011 (États-Unis)	LCR	421 (< 18 ans)	10 (2,4)	< 2 mois	-	-
		317 (< 3 ans)	10 (3,2)			
Wolthers <i>et al.</i> , 2008 (Pays-Bas)	LCR	716 (< 5 ans)	33 (4,6)	Médian 1,2 mois	Méd. 3	Méd. 5
		662 (< 2 ans)	32 (4,8)			

Abréviations : LCR : liquide céphalorachidien; Méd : médiane; Moy : moyenne.

*L'analyse est effectuée par PCR.

† Ces études ont été réalisées par PCR *niché*. Cette technique consiste à faire une amplification avec deux paires d'amorces pour un même locus. La première paire amplifie le locus normalement. La deuxième paire d'amorces (les amorces *nichées*) se lie à l'intérieur de la séquence déjà amplifiée pour produire un produit PCR plus court. Ce type de PCR le rend plus spécifique puisque le produit d'amplification dépend de la spécificité de deux paires d'amorces.

‡ Les études portant sur des spécimens divers ne portaient pas que sur des cas de méningite, d'encéphalite et de sepsie.

§ L'auteur n'indique pas si la valeur est moyenne ou médiane.

DÉTECTION DE L'ANTIRÉCEPTEUR GLUTAMATE (NMDA) (RÉFÉRENCE – 2014.02.02)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1. Demandeur : CHU Sainte-Justine
- 1.2. Date de transmission de la demande au MSSS : 1^{er} mai 2014
- 1.3. Date de réception de la demande à l'INESSS : 10 juillet 2014
- 1.4. Date de transmission de l'avis au ministre : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Détection de l'antirécepteur glutamate NMDA (N-méthyl-D-aspartate) par immunofluorescence indirecte sur liquide céphalorachidien (LCR) ou sur le sérum

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Il s'agit d'une analyse destinée à détecter, dans le LCR ou le sérum, la présence d'auto-anticorps dirigés contre un antigène de membrane du système nerveux central, le récepteur D-aspartate N-méthyle (anti-R-NMDA¹⁴) ou antirécepteur glutamate¹⁵ [Dalmau *et al.*, 2008]. L'analyse est réalisée par immunofluorescence indirecte sur différents substrats, coupes de tissus de l'hippocampe et du cervelet de rat (analyse tissulaire) et sur des cellules en culture exprimant le récepteur NMDA recombinant (cellules HEK¹⁶293 transfectées¹⁷). Des cellules non transfectées sont utilisées comme témoins. L'analyse tissulaire permet le repérage

14. Le récepteur NMDA, constitué de quatre protéines transmembranaires postsynaptiques (tétramères), est formé généralement de deux sous-unités RN1 et de RN2. Il est présent en grande quantité dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Il est actif dans de nombreux mécanismes physiopathologiques tels que la locomotion, la douleur, la mémorisation et l'apprentissage. Les quatre protéines forment un canal qui permet le transit des ions calcium, sodium et potassium et qui est normalement obstrué par l'ion magnésium. Ce dernier possède un site de fixation à l'intérieur du canal. Plusieurs molécules, notamment le NMDA, peuvent être fixées au récepteur. Lorsque le glutamate est libéré dans l'espace synaptique, il peut ouvrir les récepteurs au NMDA et permettre ainsi aux molécules de calcium d'entrer dans la dendrite postsynaptique [Lafaix, 2013].

15. Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur majeur du cerveau dont l'effet se manifeste sur trois types de récepteurs, soit NMDA, kaïnate et AMPA [Monier et Fabien, 2006].

16. HEK : *Human Embryonic Kidney*.

17. La transfection consiste à introduire un fragment d'ADN étranger à l'intérieur d'une cellule d'eucaryote dans le but de faire exprimer à la cellule un gène donné (Futura-Santé. Transfection [site Web], disponible à : <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/genetique-transfection-273/>). Les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) sont transfectées avec des plasmides exprimant les sous-unités NR1, NR2A ou NR2B du R-NMDA de rongeurs [Dalmau *et al.*, 2007]. Plasmide : fragment d'ADN de certains micro-organismes (notamment de bactéries), séparé et indépendant du fragment principal (chromosome) (Dictionnaire de français Larousse. Plasmide [site Web], disponible à : <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/plasmide/61476>).

d'anticorps anti-R-NMDA et d'autres anticorps (p. ex. antirécepteurs VGKC¹⁸ et AMPA¹⁹). L'analyse faite en parallèle sur des cellules HEK293 (*Cell Based Assay* ou CBA) permet la détection sensible et monospécifique des anticorps anti-R-NMDA [EUROIMMUN, 2014]. Différentes trousse sont disponibles, selon les substrats utilisés, soit une microplaque à quatre biopuces regroupant tous les substrats décrits ci-dessus ou à deux biopuces avec comme substrats les cellules transfectées et non transfectées.

Technique

Les échantillons à tester (sérum dilué au 1:10 dans du PBS²⁰-Tween ou LCR non dilué) sont déposés sur un support d'incubation selon la technique TITERPLANETM. La lame contenant les biopuces avec les différents substrats est ensuite déposée sur ce même support de sorte qu'elle entre en contact avec les liquides et que chaque échantillon réagisse en même temps. L'étape d'incubation à la température ambiante dure 30 minutes. En cas de réactions positives, des anticorps spécifiques de la classe IgA, IgG et IgM se lient aux antigènes fixés à la phase solide (biopuces). Après chaque étape d'incubation, les lames de biopuces sont lavées avec du PBS-Tween pour éliminer les anticorps non liés ou tout réactif marqué à la fluorescéine non lié. Les anticorps liés sont détectés avec des anticorps anti-IgG antihumains marqués à la fluorescéine et rendus visibles au microscope à fluorescence. Les anticorps anti-R-NMDA montrent une fluorescence qui va de lisse à granulaire fine dans le cytoplasme des cellules HEK293 transfectées²¹.

2.3 Société ou développeur

La compagnie EUROIMMUN (Medizinische Labordiagnostika AG) (Allemagne).

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA, autres pays)

La trousse Anti-Glutamate Receptor (type NMDA) IFI (utilisant la méthode CBA) de la compagnie EUROIMMUN est homologuée par Santé Canada (n° 81522).

La FDA a approuvé la trousse EUROIMMUN Anti-Glutamate Receptor (type NMDA) IFI utilisant la méthode CBA par technique d'immunofluorescence indirecte semi-quantitative (k100017²²).

2.7 Valeur pondérée

Valeur de 239,26, y inclus le coût de deux lames pour chaque type de prélèvement, sérum et LCR (soit 119,63\$ par lame).

18. VGKC : *voltage-gated potassium channel*.

19. AMPA : *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*.

20. PBS : *phosphate buffered saline*.

21. EUROIMMUN. Autoantibodies against neuronal antigens [site Web]. Disponible à : http://www.euroimmun.com/index.php?id=aak_gegen_neuronale_antigene&L=1.

22. Food and Drug Administration (FDA). 510(k) Substantial equivalence determination: Decision summary. 510(k) Number: k100017. Disponible à : http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K100017.pdf.

3. INDICATIONS CLINIQUES, MILIEU DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Patients atteints d'encéphalite auto-immune sans cause infectieuse fréquente reconnue (HSV²³, VZV²⁴, entérovirus).

3.2 Description de la maladie visée

Des signes cliniques associant au téréatome de l'ovaire des épisodes de troubles de la mémoire, des symptômes psychiatriques, une détérioration de l'état de conscience ou de l'hypersomnie et des signes d'hypoventilation centrale ont été décrits chez quatre femmes examinées par les auteurs d'une étude publiée en 2005 et chez cinq autres cas décrits auparavant et rapportés dans la même étude [Vitaliani *et al.*, 2005]. Depuis, environ 419 autres patients atteints de ce syndrome ont été repérés, y compris des enfants et de jeunes adultes avec ou sans tumeur associée. L'incidence exacte de la maladie n'est pas connue, mais il semble qu'elle soit de plus en plus fréquente avec une prédominance féminine de 80 % [Dalmau *et al.*, 2011].

La majorité des patients atteints d'encéphalite à anti-R-NMDA ont une synthèse intrathécale d'anticorps anti-R-NMDA. Le principal épitope ciblé par ces anticorps est dans le domaine N-terminal extracellulaire de la sous-unité NR1 [Dalmau *et al.*, 2008].

Les anticorps anti-R-NMDA provoquent une diminution du nombre de récepteurs NMDA et des répercussions sur la transmission interneuronale des messages nerveux. Ce trouble est appelé encéphalite auto-immune (EAI) à anticorps anti-R-NMDA [Peery *et al.*, 2012; Dalmau *et al.*, 2011 et 2007].

Sur le plan clinique, la maladie telle que décrite par Dalmau et ses collaborateurs [2008] débute par des céphalées, fièvre ou des symptômes d'infection virale non spécifique. Des symptômes psychiatriques s'ensuivent, notamment anxiété, agitation, troubles du comportement, délire paranoïde et hallucinations visuelles ou auditives. Certains patients souffrent de pertes de mémoire à court terme ou de crises convulsives seules ou associées aux manifestations psychiatriques. Le pronostic des patients repose sur un diagnostic précoce, un traitement immunomodulateur approprié et la suppression d'un téréatome, le cas échéant [Wandinger *et al.*, 2011].

3.3 Nombre de patients visés

Le CHU Sainte-Justine envoie de 20 à 30 échantillons par année en Espagne au laboratoire de recherche du Dr Dalmau. Le demandeur estime que 100 analyses par année seront effectuées localement.

23. HSV : Virus de l'herpès (*herpes simplex virus*).

24. VZV : Virus varicelle-zona (*varicelle zona virus*).

3.4 Spécialités médicales concernées (et autres professionnels, le cas échéant)

Neurologie, psychiatrie, neuro-oncologie, microbiologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Prélèvement de LCR par ponction lombaire ou de sérum par ponction veineuse.

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Cette analyse remplacerait les envois hors Québec. Selon les données fournies par le MSSS, durant l'année 2012-2013, 26 analyses ont été envoyées hors Québec, soit aux États-Unis (Athena Diagnostic ou Mayo Medical Laboratories) ou en Alberta (Mitogen Advanced Diagnostics à Calgary). Le coût unitaire du test varie entre 85 \$ et 890,64 \$.

Il s'agit d'une nouvelle analyse développée en collaboration avec la compagnie Euroimmun et le laboratoire de recherche du Dr Joseph Dalmau en Espagne.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Plusieurs tests diagnostiques contribuent au diagnostic de l'EAI à anti-R-NMDA [Dalmau *et al.*, 2011] :

- électroencéphalogramme (EEG) : anormal chez la plupart des patients, avec activité ralentie, diffuse et désorganisée;
- imagerie par résonance magnétique (IRM) anormale dans 50 % des cas avec, le plus fréquemment, des hypersignaux en séquence pondérée en T2 au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral;
- LCR anormal dans 80 % des cas au moment du diagnostic, y inclus une pléiocytose lymphocytaire²⁵ modérée, une concentration de protéines normale ou légèrement augmentée et des bandes oligoclonales spécifiques trouvées chez 60 % des patients;
- recherche d'anticorps anti-R-NMDA dans le LCR ou le sérum par la méthode développée par Dalmau et ses collaborateurs [2007]. Il s'agit de l'analyse tissulaire et de l'analyse basée sur les cellules HEK293 (CBA) surexprimant les hétéromères NR1/NR2B du R-NMDA. La présence d'anticorps a été initialement définie en fonction de la réactivité du sérum et de celle du LCR du patient. Certains auteurs se limitent à la recherche des anticorps par immunofluorescence indirecte sur CBA, uniquement sur sérum. Étant donné la nature qualitative du résultat, l'interprétation dépend de l'expérience du chercheur. En outre, le sérum est souvent utilisé à faible dilution (< 1:100), ce qui peut accroître les résultats faussement positifs malgré des contrôles rigoureux [Lancaster et Dalmau, 2012]. Ainsi, l'analyse sur sérum n'étant pas suffisante, l'inclusion de l'analyse sur LCR est nécessaire pour poser le diagnostic d'EAI anti-R-NMDA [Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Dalmau *et al.*, 2011].

25. Pléiocytose lymphocytaire : augmentation du nombre de globules blancs avec prédominance de lymphocytes dans le LCR.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

L'immunofluorescence indirecte sur analyse tissulaire a l'avantage de détecter de nouveaux anticorps, mais cette technique peut avoir des limites quand plusieurs auto-anticorps coexistent chez un seul patient [Lancaster et Dalmau, 2012]. Lorsqu'elle est pratiquée sur CBA, elle permet la détection monospécifique des anti-R-NMDA surexprimant les hétéromères de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA [EUROIMMUN, 2011a].

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5. DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Il s'agit d'un nouveau test. Il remplacerait les envois hors Québec.

5.1.2 Valeur diagnostique et pronostique

La recherche d'anticorps anti-R-NMDA permet de confirmer le diagnostic d'EAI à anti-R-NMDA et de suivre les concentrations de ces anticorps au cours de l'évolution de la maladie. Lorsque les résultats sont positifs, une investigation clinique approfondie, principalement à la recherche d'un tératome ovarien ou d'une tumeur des cellules germinales des testicules, est suggérée [Wandinger *et al.*, 2011].

Par ailleurs, le diagnostic précoce d'EAI à anti-R-NMDA est crucial parce que les patients traités au début de l'évolution de la maladie bénéficient d'un taux de récupération complète ou ils affichent un déficit neurologique léger d'environ 75 % [Kayser et Dalmau, 2011]. En l'absence d'une évolution favorable (25 % des cas), les patients peuvent rester handicapés avec des déficits neurologiques graves ou décéder. Selon les données portant sur 360 patients avec un suivi clinique de plus de 6 mois, la mortalité a été estimée à 4 % (15/360) avec un délai médian de 3,5 mois (de 1 à 8 mois) entre le début de la maladie et le décès. La majorité des décès se sont produits aux soins intensifs en raison d'un choc septique, d'un arrêt cardiaque, d'une détresse respiratoire aiguë, d'un état de mal épileptique réfractaire ou d'une progression tumorale [Dalmau *et al.*, 2011]. La mortalité a été très élevée chez trois patients inclus dans une étude de cas [Day *et al.*, 2011]. Ces trois patients sont décédés après avoir subi des complications liées à une hospitalisation prolongée en unité de soins intensifs. Les auteurs concluent à l'importance d'un diagnostic et d'un traitement précoces.

La détermination des titres des anti-R-NMDA est une mesure complémentaire aux évaluations cliniques puisque des titres élevés de ces anticorps dans le LCR et le sérum sont associés à des résultats défavorables ou à la présence d'un tératome, ou aux deux. En cas d'évolution favorable ou défavorable, les changements des titres des anticorps sont plus souvent observés dans les résultats issus de l'analyse du LCR comparativement aux résultats obtenus par analyse du sérum ($p = 0,037$) [Gresa-Arribas *et al.*, 2014]. En outre, l'étude de Suh-Lailam et ses collaborateurs [2013] montre que, malgré une diminution rapide des titres des anti-R-NMDA dans le LCR et en dépit de la réponse clinique au traitement, il y a persistance dans le sérum de titres élevés d'anti-R-NMDA.

5.1.3 Valeur thérapeutique

La détection des anti-R-NMDA est utile pour entreprendre une thérapie immunomodulatrice appropriée et pour évaluer les effets du traitement, en particulier sur le système nerveux central [Dalmau *et al.*, 2011]. Irani et ses collaborateurs [2010] rapportent qu'une diminution des titres d'anticorps est associée à l'administration précoce de l'immunothérapie moins de 40 jours après le début des symptômes chez des patients sans tumeur associée par rapport aux patients qui ne sont pas traités ou qui le sont après 40 jours ($p < 0,0001$), et lorsqu'il y a résection tumorale précoce en cas de tumeur associée.

5.2 Validité clinique

Peu d'études ont exploré la performance clinique en termes de sensibilité et de spécificité de l'immunofluorescence indirecte sur analyse tissulaire ou CBA. Les seules données disponibles sont issues de quatre études et des données de la compagnie EUROIMMUN. Il n'y a pas eu de comparaison directe de la performance de l'immunofluorescence indirecte selon le type de substrat utilisé (tissulaire et CBA) d'après les données de la littérature.

La sensibilité de la détection des anti-R-NMDA sur sérum et LCR par immunofluorescence indirecte sur coupe tissulaire et sur CBA chez des patients avec un diagnostic d'EAI à anti-R-NMDA a été testée par deux études²⁶ [Wandinger *et al.*, 2010; Dalmau *et al.*, 2008]. Dalmau et ses collaborateurs [2008] ont rapporté que la sous-unité NR1 (cible des anti-R-NMDA) a été reconnue par les anticorps de tous les patients ($n = 100$) dans le LCR ou le sérum (100 %). Pour la seconde étude, la sensibilité est aussi de 100 % ($n = 66$) quel que soit le substrat utilisé [Wandinger *et al.*, 2010].

Le tableau 1 présente les résultats de la performance de la méthode d'immunofluorescence indirecte sur CBA pour détecter les anti-R-NMDA dans une population de patients sélectionnés ayant reçu un diagnostic d'EAI à anti-R-NMDA (études 1, 3 et 4) et chez 6 patients avec des symptômes cliniques d'encéphalite d'origine inconnue sélectionnés dans une large population de 2990 patients (étude 2). Ces données sont tirées de la monographie du fabricant [EUROIMMUN, 2011a]. La capacité de l'immunofluorescence indirecte sur CBA à détecter l'anti-R-NMDA dans le sérum de ces patients est de 100 % pour les études 1, 3 et 4. Cinq des six échantillons sériques (83,3 %) de patients qui remplissent les critères de diagnostic d'une EAI à anti-R-NMDA sont positifs pour ce type d'anticorps (étude 2).

La spécificité des méthodes d'analyse (tissulaire et CBA) testées sur des groupes de volontaires sains ou de patients avec suspicion d'EAI avec un autre type d'EAI (p. ex. à anti-R-VGKC²⁷ et anti-R-AMPA²⁸) ou d'autres maladies autoimmunes (lupus systémique érythémateux ou sclérose multiple) est de 100 %, quel que soit le type de prélèvement (LCR ou sérum) [Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Suh-Lailam *et al.*, 2013²⁹; EUROIMMUN, 2011a; Wandinger *et al.*, 2010].

26. Les auteurs de ces études ont des intérêts dans la compagnie EUROIMMUN [Wandinger *et al.*, 2010; Dalmau *et al.*, 2008].

27. VGKC : Voltage Gated Kalium Channels.

28. AMPA : anti- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acide.

29. Les trousse d'analyse utilisées dans l'étude de Suh-Lailam et ses collaborateurs [2013] ont été fournies gratuitement par la compagnie EUROIMMUN.

Tableau 1 Résultats de la détection d'anti-R-NMDA sur sérum par immunofluorescence indirecte sur CBA (EUROIMMUN)

Étude	Nombre de cas	TÉMOINS (N)	N positifs (%)	Intervalle de confiance à 95 %
Diagnostic d'EAI à anti-NMDA				
Étude 1	29	100 VS 18 EAI autres*	29 (100)	88,1 à 100,0 %
Étude 3	8		8 (100)	63,1 à 100,0 %
Étude 4	9		9 (100)	66,4 à 100,0 %
Total	46	13 EAI autres	46 (100)	
Symptômes cliniques d'encéphalite d'origine inconnue				
Étude 2	6		5 (83,3)	35,9 à 99,6 %

Abréviations : CBA : *cell based assay*; EAI : encéphalopathie auto-immune; VS : volontaires sains.

*Encéphalite à anti-R-VGKC (*Voltage Gated Kalium Channels*) et AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid).

D'autres données sont disponibles sur le site de la compagnie EUROIMMUN concernant l'analyse de sérum (235 patients) et de LCR (216 patients) de patients atteints d'encéphalite à anti-R-NMDA. Les résultats montrent que la capacité de l'immunofluorescence indirecte sur CBA à détecter l'anti-R-NMDA est plus importante dans le LCR (99,5 %) que dans le sérum (85,5 %). Un résultat positif a été signalé dans l'analyse sérique d'un groupe de 200 volontaires sains et dans l'analyse du LCR d'un groupe de 60 patients sans anomalies neurologiques [EUROIMMUN, 2011b].

5.3 Validité analytique (ou technique)

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité			
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice			
Concordance			
Corrélation entre test et comparateur	X		
Autres selon le type de test			

Reproductibilité/précision

La monographie du fabricant indique que six échantillons différents de sérum ont été utilisés pour tester la reproductibilité intra-assai (10 analyses en parallèle) et inter-assai en 5 séries (testées en double) de l'immunofluorescence indirecte sur CBA. La reproductibilité inter-lot a été testée sur trois échantillons de sérum différents et trois lots différents.

L'intensité de la fluorescence spécifique est exprimée sous forme de valeur numérique. Tous les échantillons sériques ont été testés selon des niveaux d'intensité de fluorescence de 0 (pas de fluorescence spécifique), 1 (très faible réaction positive visible), 2 (faible réaction positive visible) et 3 (réaction positive spécifique bien visible). Dans tous les cas, la déviation du niveau d'intensité de fluorescence n'excède pas ± 1 niveau pour tous les échantillons testés [EUROIMMUN, 2011a].

Sensibilité de la mesure sur des échantillons appariés de sérum et de LCR

Les résultats sur la sensibilité du LCR pour la détection par immunofluorescence indirecte des anti-R-NMDA par rapport au sérum sont divergents. Gresa-Arribas et ses collaborateurs [2014] ont testé la sensibilité de l'immunofluorescence indirecte sur analyse tissulaire et CBA sur des échantillons appariés (sérum et LCR) provenant de 250 patients. Les échantillons étaient prélevés le même jour et provenaient de patients choisis de façon aléatoire à partir d'une cohorte de 577 cas d'EAI à anti-R-NMDA ciblés à travers le monde. Les résultats des tests avaient été positifs pour les anti-R-NMDA dans le LCR ou le sérum dans une étude précédente [Titulaer *et al.*, 2013]. Les résultats de l'analyse de Gresa-Arribas et ses collaborateurs [2014] montrent une sensibilité de la méthode sur LCR de 100 % (98,5 à 100) comparativement à celle sur sérum [91,6 (87,5 à 94,7) pour l'immunofluorescence sur analyse tissulaire et 86,8 % (82 à 90,7) sur CBA]. La différence de sensibilité de l'analyse sur les deux types de prélèvement est significative ($p < 0,0001$). Ces résultats confirment l'importance de la détection des anti-R-NMDA dans le LCR; l'analyse du sérum seule n'est pas suffisante. Comme pour Dalmau et ses collaborateurs [2008], les titres des anticorps sont plus élevés dans le LCR que dans le sérum pour 53 échantillons appariés.

Suh-Lailam et ses collaborateurs [2013] rapportent les résultats de leur observation sur une période de 24 heures, de 20 échantillons appariés (LCR et sérum) testés par immunofluorescence indirecte sur CBA, avec 14 résultats positifs (LCR et sérum appariés) et 6 résultats discordants (4 LCR positifs et sérum négatifs et 2 LCR négatifs et sérum positifs). Les niveaux d'anticorps sériques étaient significativement plus élevés que dans le LCR ($p = 0,02$).

Intervalle de référence

Les niveaux sériques d'anti-R-NMDA (IgG) ont été analysés par immunofluorescence indirecte sur CBA sur 120 échantillons de sérum provenant de donneurs adultes sains. Tous les échantillons sériques étaient négatifs. L'intervalle de référence a été déterminé comme un titre d'anticorps équivalant à 1 : < 10 [EUROIMMUN, 2011a].

Réactivité croisée

La réactivité croisée a été étudiée sur 29 échantillons sériques provenant de patients atteints d'EAI, un échantillon d'un patient atteint de dégénérescence cérébelleuse et un autre provenant d'un patient atteint de rétinopathie. La méthode utilisée était l'immunofluorescence indirecte sur CBA. Les échantillons qui ont eu un résultat positif pour l'anti-GluR2, l'anti-VGKC et l'anti-zic4 (dégénérescence du cervelet) ont eu un résultat négatif pour le récepteur du glutamate (type NMDA) [EUROIMMUN, 2011a].

Interférence

Les résultats des tests par immunofluorescence indirecte sur CBA n'ont pas été affectés en présence de concentrations allant jusqu'à 500 mg/dl pour l'hémoglobine, 2000 mg/dl pour les triglycérides et 40 mg/dl pour la bilirubine [EUROIMMUN, 2011a].

Corrélation

Corrélation entre l'immunofluorescence indirecte sur CBA et la méthode d'immunoprécipitation (coefficient de Spearman : $r = 0,86$; $p < 0,0001$) [Irani *et al.*, 2010].

5.4 Recommandations d'autres organismes

Des recommandations venant d'organismes officiels ne sont pas encore disponibles. Toutefois, un groupe de trois experts à l'échelle internationale (Autriche, Espagne, États-Unis) propose un algorithme décisionnel pour le diagnostic des anticorps anti-neuronaux comprenant les anti-R-NMDA [Höftberger *et al.*, 2012]. L'approche diagnostique comprend l'immunofluorescence indirecte sur analyse tissulaire dans le LCR ou le sérum pour la détection de ces anticorps. Selon les résultats obtenus, trois scénarios sont envisageables :

- Si les résultats sont positifs, une confirmation de la présence des anti-R-NMDA par immunofluorescence indirecte sur CBA est indiquée.
- Dans le cas où le tableau clinique est très évocateur d'une EAI à anti-R-NMDA ou en cas de résultats douteux obtenus sur sérum par immunofluorescence indirecte sur analyse tissulaire, la confirmation diagnostique doit être obtenue par une mesure répétée de cette même méthode sur LCR ou par immunofluorescence indirecte sur CBA.
- Si la technique d'immunofluorescence indirecte sur CBA est utilisée pour la détection de ces anticorps sans le recours à la méthode tissulaire, les résultats doivent être interprétés prudemment selon le contexte clinique.

L'European Autoimmunity Standardisation Initiative (EASI) a publié un guide d'usage pratique basé sur l'opinion d'experts et non sur des recommandations. Ce guide vise à fournir aux médecins de famille les renseignements nécessaires sur diverses maladies auto-immunes, dont l'EAI, pour une meilleure prise en charge des patients atteints de cette maladie, y inclus leur orientation vers un médecin spécialiste. Les auteurs indiquent que l'immunofluorescence indirecte sur CBA est la méthode diagnostique de l'EAI à anti-R-NMDA et que ces anticorps peuvent être présents dans le LCR lorsque leur recherche dans le sérum est négative [Shoenfeld et Meroni, 2012].

6. RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

N'a pas été analysé.

6.2 Conséquences économiques d'une introduction dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été analysés.

7. EN BREF

7.1 Pertinence clinique

L'intérêt clinique de l'EAI à anti-R-NMDA est récent. La recherche des anti-R-NMDA doit être envisagée en cas de signes d'encéphalite (symptômes neuropsychiatriques, crises

convulsives, mouvements anormaux, dysautonomie) et d'apparition brutale survenant surtout chez des sujets jeunes, notamment chez les femmes. La recherche d'anticorps anti-R-NMDA par immunofluorescence indirecte sur sérum et dans le LCR est utile pour :

- confirmer le diagnostic clinique de l'EAI à anti-R-NMDA et l'origine autoimmune des troubles neurologiques;
- permettre la recherche d'un syndrome tumoral, le cas échéant. Le LCR est plus informatif que le sérum pour la détection d'anti-R-NMDA dans les EAI paranéoplasiques;
- comparer les concentrations de ces anticorps au cours de l'évolution de la maladie et évaluer les effets du traitement;
- déterminer les titres des anticorps qui représentent une mesure complémentaire aux évaluations cliniques et biologiques.

7.2 Validité clinique

Les résultats disponibles montrent une bonne performance clinique de l'immunofluorescence indirecte sur analyse tissulaire et CBA pour la recherche d'anticorps anti-R-NMDA. Toutefois, il n'y a pas eu de comparaison directe de la performance de l'immunofluorescence indirecte selon le type de substrat utilisé (tissulaire et CBA) ni avec d'autres techniques, selon les données de la littérature.

7.3 Validité analytique

Les données provenant de la compagnie EUROIMMUN et de quelques études de validation suggèrent une bonne performance analytique de l'immunofluorescence indirecte sur CBA dans la détection des anticorps anti-R-NMDA sur sérum. La validité analytique de l'immunofluorescence indirecte n'a pas été explorée, ni pour l'analyse CBA sur LCR ni pour l'analyse tissulaire sur LCR ou sur sérum.

7.4 Recommandation d'autres organismes

Aucun organisme officiel n'a formulé de recommandations sur la pertinence clinique de la recherche d'anticorps anti-R-NMDA par immunofluorescence indirecte sur sérum et sur LCR. Selon un algorithme décisionnel élaboré par un groupe d'experts, l'analyse tissulaire représente la méthode de diagnostic des anti-R-NMDA, suivie par l'analyse sur CBA afin de confirmer la présence de ces anticorps [Höftberger *et al.*, 2012]. L'utilisation de l'analyse sur CBA en première intention est possible, et les résultats doivent être interprétés selon le contexte clinique.

8. AVIS EN BREF DE L'INESSS

Détection de l'antirécepteur glutamate (NMDA)

Statut de la technologie diagnostique :

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS :

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle :

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance

Note

Il s'agit d'une analyse qui présente plusieurs avantages. Elle permet :

- le diagnostic d'une maladie rare;
- un meilleur suivi de la maladie;
- un traitement approprié.

La disponibilité de l'analyse au Québec permettrait un temps de réponse plus rapide que l'envoi des échantillons hors Québec.

RÉFÉRENCES

- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: Case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7(12):1091-8.
- Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 2011;10(1):63-74.
- Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2007;61(1):25-36.
- Day GS, High SM, Cot B, Tang-Wai DF. Anti-NMDA-receptor encephalitis: Case report and literature review of an under-recognized condition. *J Gen Intern Med* 2011;26(7):811-6.
- EUROIMMUN. Product catalogue 2014. Lübeck, Allemagne : EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2014. Disponible à : <http://www.euroimmun.de/index.php?id=2095&L=1>.
- EUROIMMUN. Anti-glutamate receptor (type NMDA) IFA. Test instructions. Lübeck, Allemagne : EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2011a. Disponible à : http://www.euroimmun.us/package-inserts/Autoimmune/IFA/IFA/FA_112d-51_A_US_D03.pdf.
- EUROIMMUN. Test characteristics. IIFT: Autoimmune encephalitis mosaic 1. Lübeck, Allemagne : EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2011b. Disponible à : http://www.euroimmun.de/fileadmin/template/images/pdf/qr/info_autoimmune_encephalitis_en.pdf.
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: A retrospective study. *Lancet Neurol* 2014;13(2):167-77.
- Höftberger R, Dalmau J, Graus F. Clinical neuropathology practice guide 5-2012: Updated guideline for the diagnosis of antineuronal antibodies. *Clin Neuropathol* 2012;31(5):337-41.
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: Temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010;133(Pt 6):1655-67.
- Kayser MS et Dalmau J. Anti-NMDA receptor encephalitis in psychiatry. *Curr Psychiatry Rev* 2011;7(3):189-93.
- Lafaix O. Implication du récepteur au NMDA dans le vieillissement, l'apprentissage et la mémorisation : approche expérimentale par sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA dans l'hippocampe de souris. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire. Toulouse, France : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT); 2013. Disponible à : http://oatao.univ-toulouse.fr/9604/1/Lafaix_9604.pdf.

- Lancaster E et Dalmau J. Neuronal autoantigens—Pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 2012;8(7):380-90.
- Monier JC et Fabien N. VI. Autoanticorps anti-récepteurs ionotropiques du glutamate. *GEAI L'info* 2006;8:23-4.
- Peery HE, Day GS, Dunn S, Fritzier MJ, Pruss H, De Souza C, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis. The disorder, the diagnosis and the immunobiology. *Autoimmun Rev* 2012;11(12):863-72.
- Shoenfeld Y et Meroni PL. The general practice guide to autoimmune diseases. Lengerich, Allemagne : Pabst Science Publishers; 2012.
- Suh-Lailam BB, Haven TR, Copple SS, Knapp D, Jaskowski TD, Tebo AE. Anti-NMDA-receptor antibody encephalitis: performance evaluation and laboratory experience with the anti-NMDA-receptor IgG assay. *Clin Chim Acta* 2013;421:1-6.
- Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangue T, Glaser C, Iizuka T, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12(2):157-65.
- Vitaliani R, Mason W, Ances B, Zwerdling T, Jiang Z, Dalmau J. Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2005;58(4):594-604.
- Wandinger KP, Saschenbrecker S, Stoecker W, Dalmau J. Anti-NMDA-receptor encephalitis: A severe, multistage, treatable disorder presenting with psychosis. *J Neuroimmunol* 2011;231(1-2):86-91.
- Wandinger KP, Dalmau J, Borowski K, Probst C, Rosemann A, Fechner K, Stoecker W. Laboratory diagnosis and follow-up in patients with anti-NMDA-receptor encephalitis. Scientific presentation at the 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 2010. Disponible à : <http://www.eslbioscience.com/files/euroimmun/anti-nmda-receptor.pdf>.

ANALYSE MUTATIONNELLE DU DOMAINE KINASE DE LA PROTÉINE DE FUSION *BCR-ABL* (RÉFÉRENCE – 2014.02.002)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1. Demandeur : **Hôpital Maisonneuve-Rosemont**
- 1.2. Date de transmission de la demande d'examen au MSSS : **22 avril 2014**
- 1.3. Date de réception des demandes à l'INESSS : **10 mai 2014**
- 1.4. Date de transmission de l'avis au ministre : **31 octobre 2014**

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Analyse mutationnelle de la région codante du domaine kinase de la protéine de fusion *BCR-ABL* par séquençage fluorescent de type Sanger

2.2 Description brève de la technologie, précisions techniques et cliniques

La recherche de mutations dans les transcrits d'ARNm codant pour *BCR-ABL* permet de détecter et de caractériser les résistances primaires ou secondaires aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) afin d'assurer l'optimisation de l'approche thérapeutique, lorsque nécessaire.

La méthode utilisée consiste à effectuer la synthèse de l'ADNc et à réaliser la première étape d'amplification avec la trousse One-step PCR de Qiagen et l'ARN total purifié de l'échantillon provenant du patient. Une PCR *niché* est ensuite effectuée pour augmenter la sensibilité et la spécificité de l'analyse. Le produit de la PCR est alors purifié à l'aide de la trousse Qiaquick de Qiagen et la réaction de séquence est faite avec la trousse Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Les produits de séquençage sont purifiés à l'aide de la trousse DyeEx 2.0 de Qiagen et la séquence est résolue à la suite d'une électrophorèse capillaire sur le Genetic analyzer 3130XL et avec le programme Sequencher (Genes Codes Corporation).

Les amorces choisies pour les réactions de PCR et de séquençage ont été sélectionnées par le demandeur et elles sont spécifiques au point de la translocation caractérisée préalablement pour chacun des patients.

2.3 Société ou développeur

Les réactions de PCR et de séquençage sont réalisées à l'aide d'amorces maison. La trousse One-step RT-PCT a été conçue et elle est produite par Qiagen. La réaction de séquençage est faite à l'aide de la trousse Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies). Les trousse de purification du produit de PCR (Qiaquick) et de la réaction de séquence (DyeEx 2.0) sont produites par Qiagen. Le programme Sequencher est utilisé pour l'analyse et l'électrophérogramme est produit par Genes Codes Corporation.

2.4 Licence : **ne s'applique pas.**

2.5 Brevet, le cas échéant : **ne s'applique pas.**

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont fait l'objet d'aucune homologation auprès de Santé Canada ou de la FDA.

2.7 Valeur pondérée : **129**

3. INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Cette analyse est indiquée pour les patients adultes ou pédiatriques qui ont reçu un diagnostic de leucémie myéloïde chronique (LMC) ou de leucémie lymphoblastique aigüe (LLA) avec chromosome de Philadelphie (Ph+), qui reçoivent un traitement avec un inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) et qui présentent des signes de résistance médicamenteuse.

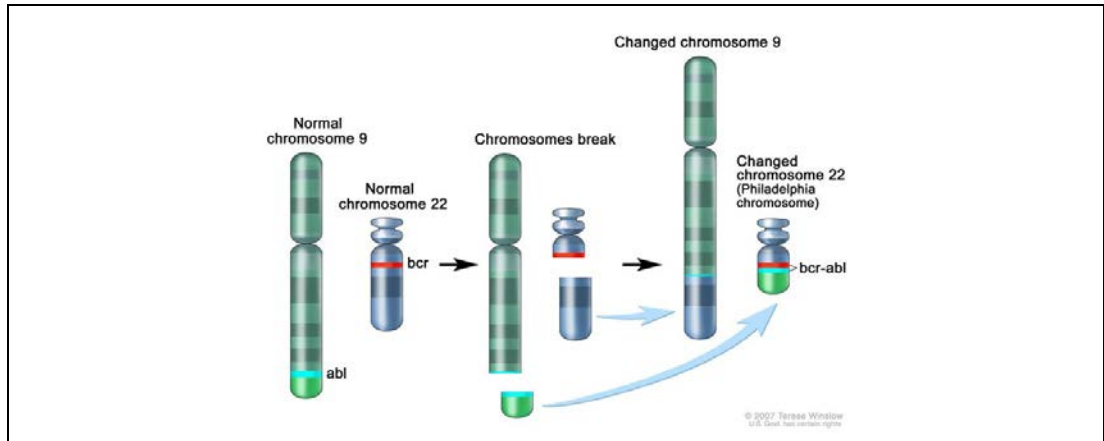
3.2 Description des maladies visées

3.2.1 Leucémie myéloïde chronique (LMC)

La leucémie myéloïde chronique, désordre myéloprolifératif impliquant les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, est caractérisée par la présence du chromosome de Philadelphie (Ph+). Le chromosome de Philadelphie résulte de la translocation réciproque des chromosomes 9 et 22 [t(9;22)(q34;q11³⁰)] menant à la fusion du gène *BCR* (*breakpoint cluster region*) et du gène *ABL1* (*Abelson murine leukemia*) (figure 1).

30. Le chromosome de Philadelphie est un chromosome chimérique créé par la translocation (déplacement) réciproque du chromosome 9 au niveau du segment q34 (bras long, bande 3, sous-bande 4) et du chromosome 22 au niveau du segment q11 (bras long, bande 1, sous-bande 1).

Figure 1 Chromosome de Philadelphie



Source : National Cancer Institute. Chronic Myelogenous Leukemia Treatment (PDQ®) [site Web]. Disponible à : <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/CML/Patient/page1>.

Autorisation de reproduction obtenue le 4 août 2014 par Terese Winslow.

La protéine de fusion *BCR-ABL1* résultante possède une activité tyrosine kinase à caractère oncogénique causant la prolifération anarchique des cellules d'origine myéloïde de la moelle osseuse, jouant ainsi un rôle pivot dans la pathogénèse de la LMC [Negrin et Schiffer, 2014]. L'instabilité qui caractérise les cellules *BCR-ABL* positives mène à des mutations ponctuelles dans le domaine kinase du gène de fusion *BCR-ABL*, qui sont associées à la progression de la phase chronique à la phase blastique (aussi nommée phase aigüe) en passant par la phase accélérée [Baccarani *et al.*, 2012]. La phase aigüe requiert une greffe de cellules souches.

La LMC est généralement diagnostiquée au cours de la phase chronique sur la base d'une formule sanguine anormale associée à des symptômes tels la fatigue, l'anorexie et la perte de poids [Sawyers, 1999]. Par ailleurs, l'European LeukemiaNet (ELN) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont établi des critères de définition des phases accélérée et blastique de la LMC (tableau 1).

Tableau 1 Critères de définition des phases accélérée et blastique de la leucémie myéloïde chronique

	CRITÈRES ELN	CRITÈRES OMS
PHASE ACCÉLÉRÉE	<ul style="list-style-type: none"> • 15-29 % de blastes³¹ dans le sang ou la moelle osseuse; ou plus de 30 % de blastes + promyélocytes sang ou moelle osseuse avec blastes < 30 % • Basophiles en sang ≥ 20 % • Thrombocytopénie persistante (< 100 x 10⁹/L) non liée au traitement • Anomalies clonales des chromosomes des cellules Ph+, principales anomalies chromosomiques (<i>major route abnormalities</i>), sous traitement. 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-19 % de blastes dans le sang ou la moelle osseuse. • Basophiles en sang ≥ 20 % • Thrombocytopénie persistante (< 100 x 10⁹/L) non liée au traitement • Anomalies clonales des chromosomes des cellules Ph+, sous traitement. • Thrombocytose (> 1000 x 10⁹/L) non liée au traitement • Augmentation de la taille de la rate et du nombre de leucocytes, ne répondant pas au traitement.
PHASE BLASTIQUE OU AIGÛE	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 30 % de blastes dans le sang ou la moelle osseuse • Prolifération blastique extramédullaire, excepté dans la rate 	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 20 % de blastes dans le sang ou la moelle osseuse • Prolifération blastique extramédullaire, excepté dans la rate • Agrégats de blastes dans la biopsie de moelle osseuse

Source : adapté et traduit de Bacarani *et al.*, 2013.

Épidémiologie

Selon les statistiques les plus récentes, l'incidence de la LMC en 2007 (standardisée selon l'âge, pour les deux sexes) était de 96 cas par année au Québec, soit un taux de 0,9/100 000³². Aucune information quant à la prévalence de la maladie au Québec n'a pu être trouvée.

Pronostic

En l'absence de traitement, la phase chronique bénigne progresse habituellement vers une crise blastique fatale en trois à cinq ans [Sawyers, 1999]. Jabbour et Kantarjian [2014] rapportent les résultats d'un suivi de 8 ans de l'étude IRIS (*International randomized study of interferon and STI571*). Avec le recours à l'Imatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) utilisé en traitement de première ligne, la survie globale observée à 8 ans est de 93 % [Jabbour et Kantarjian, 2014]. Par ailleurs, l'émergence de mutations dans le domaine kinase de la *BCR-ABL* durant le traitement avec un ITK de première ligne tel l'Imatinib amène une perte de réponse cytogénétique complète (CCyR³³), une survie sans progression

31. Cellules immatures trouvées dans le sang ou dans la moelle osseuse.

32. Statistique Canada. Incidence du cancer au Canada, 2007 et 2008. Nouveaux cas pour les sièges primaires de cancer de la CIM-O-3 (d'après le fichier des totalisations du RCC de juillet 2010) — Québec. Disponible à : <http://www.statcan.gc.ca/pub/82-231-x/2009001/t034-fra.pdf> (consulté le 4 août 2014).

33. Les niveaux de réponse cytogénétique sont classifiés selon le pourcentage de métaphases Ph+ trouvées dans les biopsies de moelle osseuse, comme suit : complète (CCyR), 0 %; partielle (PCyR), 1 à 35 %; mineure, 36 à 65 %; minimale, 66 à 95 %; absence de CyR, ≥ 96 %. Une réponse cytogénétique majeure (MCyR) est la somme de CCyR et PCyR [Guilhot *et al.*, 2007].

abrégée, un temps de progression de la phase accélérée à la phase blastique plus court et une réduction de la survie globale [Press *et al.*, 2009; Soverini *et al.*, 2005]. C'est la raison qui a mené au développement des ITK de deuxième génération. En dernier lieu, devant un échec du traitement aux ITK, une greffe est suggérée si le patient est admissible.

Traitement

Les ITK constituent le traitement de choix pour la LMC³⁴ en phase chronique. En phases accélérée et blastique, la greffe des cellules souches est le traitement standard, suivie par les ITK en cas de non-admissibilité à la greffe ou lorsque le patient est en attente [Groupe québécois de recherche sur la LMC-NMP, 2013]. L'Imatinib a été le premier inhibiteur utilisé. Par la suite d'autres ITK ont été mis sur le marché, dont le Dasatinib, le Nilotinib, le Bosutinib et plus récemment le Ponatinib [Negrin et Schiffer, 2014; Baccarani *et al.*, 2013]. Un des mécanismes de résistance à ce traitement implique des mutations ponctuelles au niveau du domaine kinase de la *BCR-ABL*.

3.2.2 Leucémie lymphoblastique aigüe (LLA)

La leucémie lymphoblastique aigüe est une maladie hématologique caractérisée par l'hyperprolifération des précurseurs lymphoïdes de la moelle osseuse. Des sous-types ont été caractérisés chez les adultes et les enfants, soit la LLA à cellules pré-B, à cellules B matures et à cellules T [Jabbour *et al.*, 2005]. Chez l'adulte, on trouve majoritairement le gène de fusion *BCR-ABL1*, dans 25 % des cas comparativement à 3 % chez l'enfant [NCCN, 2013]. Par ailleurs, le gène de fusion *TEL-AML1* [t(12;21)(p13;q22)] est l'anomalie chromosomique la plus fréquemment observée chez les enfants (22 % des cas) atteints de LLA comparativement à 2 % chez l'adulte [NCCN, 2013].

Épidémiologie

Selon les statistiques les plus récentes, l'incidence de la LLA (standardisée selon l'âge, pour les deux sexes) est de 100 cas par année au Québec, soit un taux de 1,4/100 000³⁵. Aucune information quant à la prévalence de la maladie au Québec n'a pu être trouvée.

Pronostic

Une étude populationnelle présente les taux de survie issus du programme SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) du National Cancer Institute (NCI) portant sur 12 096 patients de 0 à 14 ans atteints de LLA diagnostiquée entre 1981 et 2010 [Ma *et al.*, 2014]. Les taux de survie à 5 ans sont de 74,8 % (1981 à 1990), 84,5 % (1991 à 2000) et 88,6 % (2001 à 2010) pour le groupe des 0 à 14 ans. Les résultats sont similaires pour la survie à 10 ans avec une augmentation de 15 %, soit 69,3 % (1981 à 1990), 80,9 % (1991 à 2000) et 85,5 % (2001 à 2010). Chez les enfants âgés de 10 à 14 ans au moment du diagnostic, tranche d'âge généralement associée à un mauvais pronostic, les taux de survie à 10 ans ont augmenté de 20 %, soit 54,1 % (1981 à 1990), 69,4 % (1991 à 2000) et 75,3 % (2001 à 2010). Selon les auteurs, ces résultats seraient attribuables à l'amélioration des traitements, à l'optimisation des méthodes d'analyse des anomalies cytogénétiques et moléculaires et à la précision de l'information issue du diagnostic et du pronostic. Il faut souligner que la survie des patients atteints de LLA n'est pas directement associée au traitement avec des ITK. Pour ces patients, les ITK et autres chimiothérapies sont un régime

34. Consultez l'annexe A pour de plus amples renseignements au sujet des inhibiteurs de la tyrosine kinase inclus dans la liste de la RAMQ ainsi que les indications reconnues pour leur couverture par le régime public d'assurance médicaments.

35. Statistique Canada. Incidence du cancer au Canada, 2007 et 2008. Nouveaux cas pour les sièges primaires de cancer de la CIM-O-3 (d'après le fichier des totalisations du RCC de juillet 2010) — Québec. Disponible à : <http://www.statcan.gc.ca/pub/82-231-x/2009001/t034-fra.pdf> (consulté le 4 août 2014).

préparatoire à la greffe de cellules souches qui constitue le standard des soins.

Traitement

Les lignes directrices du National Comprehensive Cancer Network [NCCN, 2013] concernant la LLA présentent toute l'information et les algorithmes de traitement de la maladie en fonction de son stade. À la différence de la LMC, les ITK sont utilisés pour le traitement de la LLA³⁶, avec d'autres chimiothérapies, en tant que traitement préparatoire à la greffe.

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur offre le séquençage de *BCR-ABL* dans son laboratoire clinique et il estime que le nombre de demandes annuel varie entre 50 et 100 (basé sur ses statistiques depuis 2009).

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Biologie moléculaire, hémato-oncologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Cette analyse est prescrite selon l'algorithme recommandé dans le guide de pratique publié par le Groupe québécois de recherche en LMC-NMP [2013]. Elle peut être demandée par le clinicien qui fait le suivi du patient ou par l'hématologue associé au laboratoire du demandeur qui assure le suivi moléculaire de la LMC, y compris la réponse moléculaire aux ITK par PCR quantitative (analyse « Leucémie LMC et LLA (*BCR/ABL*) de la t(9;22) » incluse dans le répertoire du MSSS [code 20731]).

L'analyse est effectuée dans les circonstances suivantes :

- Échec des jalons thérapeutiques;
- Augmentation de plus de 0,5 log du niveau de transcrits *BCR-ABL* par RQ-PCR entre deux prélèvements successifs et niveau de transcrits égal ou supérieur à - 3,0 log (0,1 % IS [*international scale*]);
- Absence de réponse à l'introduction d'un ITK de remplacement ou nouvelle perte de réponse.

Le temps de réponse pour l'obtention des résultats est de 10 jours.

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Il s'agit d'une analyse unique.

Le séquençage des transcrits d'ARN *BCR-ABL* a déjà figuré au *Répertoire québécois des analyses biomédicales* jusqu'en 2008-2009. L'analyse aurait été retirée après l'instauration d'un programme issu d'une collaboration avec un laboratoire privé. Ce service a entraîné la non-utilisation du code au répertoire et sa radiation il y a quelques années.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le suivi du traitement de la LMC implique un monitoring moléculaire dans le cadre duquel

36. Consultez l'annexe A pour de plus amples renseignements au sujet des inhibiteurs de la tyrosine kinase inclus dans la liste de la RAMQ ainsi que les indications reconnues pour leur paiement.

la réponse à l'ITK s'effectue en quantifiant le nombre de transcrits d'ARN *BCR-ABL* qui sont présents dans le sang périphérique ou la moelle, ce nombre étant proportionnel à la quantité de cellules leucémiques. La quantification du nombre de transcrits est réalisée par RQ-PCR (PCR quantitative) aux trois mois et la progression de la réponse est suivie dans le temps. Une réponse moléculaire majeure caractérisée par une réduction du nombre de transcrits détectés de - 3,0 log (ou 0,1 % IS) est souhaitable avant 18 mois suivant le début du traitement.

La qualité de la réponse aux ITK de même que la perte de cette réponse entraînent la recherche de l'étiologie de cette problématique, notamment la recherche de mutations des transcrits *BCR-ABL*, de la non-observance du traitement et de la biodisponibilité [Jabbour *et al.*, 2011; Quintas-Cardama *et al.*, 2009].

Le séquençage de type Sanger constitue le standard de laboratoire pour la détection de la mutation de *BCR-ABL* [Soverini *et al.*, 2011]. Toutefois, deux techniques permettent de réaliser une étape préalable de détection (*pre-screening*) avant le séquençage direct de type Sanger. Il s'agit de la *Denaturing high performance liquid chromatography* (dHPLC) et du *Four-channel asymmetric real-time PCR hybridization probe assay*. Ces deux approches permettent d'évaluer un grand nombre d'échantillons rapidement et à moindre coût. Un séquençage doit tout de même être effectué pour caractériser la mutation précise dans les échantillons dans lesquels une mutation est observée.

Séquençage direct par la méthode de Sanger

Le séquençage direct de type Sanger est une méthode couramment recommandée (méthode de référence) pour l'analyse mutationnelle du domaine kinase de *BCR-ABL* [Soverini *et al.*, 2011], et ce, en dépit de ses nombreuses limitations techniques. Toutefois, cette méthode estime de façon approximative l'abondance des clones avec mutations et ne permet pas de distinguer les mutations composées (appartenant au même transcrite) et les mutations polyclonales (appartenant à différents transcrits) [Soverini *et al.*, 2013].

***Denaturing high performance liquid chromatography* (dHPLC)**

Cette technique permet la détection de variations de séquences par HPLC. Le produit PCR est mélangé avec un échantillon *wild-type* (échantillon Ph+ sans mutations reconnues après séquençage) puis dénaturé pour permettre la formation d'une zone hétéroduplexe. Les échantillons qui ont un profil dHPLC altéré, indicatif d'une mutation, sont par la suite séquencés directement afin de caractériser les mutations [Frueh et Noyer-Weidner, 2003]. La dHPLC est une méthode simple et rapide pouvant être utilisée pour faire une présélection des échantillons ayant une variation de séquence, ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'échantillons devant être séquencés [Soverini *et al.*, 2011]. Cette méthode aurait une sensibilité légèrement plus élevée que le séquençage de type Sanger, mais elle ne permettrait pas la caractérisation de la variation de séquence sous-jacente au profil anormal d'élution [Soverini *et al.*, 2011].

Four-channel asymmetric real-time PCR hybridization probe assay

Cette méthode consiste en une seule réaction PCR en temps réel utilisant simultanément quatre paires d'amorces FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) permettant de cibler toutes les mutations du domaine kinase de *BCR-ABL* décrites pour la résistance à l'Imatinib [Martinez-Serra *et al.*, 2012; Soverini *et al.*, 2011]. Il s'agit d'une méthode rapide de détection (*pre-screening*) réalisée préalablement au séquençage par la méthode de référence de type Sanger, évitant ainsi le traitement d'un grand nombre d'échantillons.

Ultra-deep sequencing (UDS)

Soverini et ses collègues définissent l'UDS comme étant la prochaine génération de technologie de séquençage. Il s'agit d'une méthode hautement sensible permettant de caractériser les mutations dites mineures qui ne sont pas détectables par la méthode de type Sanger (mutations peu abondantes, présentes dans < 10-15 % des cellules), de suivre la dynamique des mutations résistantes au fil du temps et de reconstruire l'architecture clonale des populations mutées (dans le cas de mutations multiples présentes dans le même amplicon) [Soverini *et al.*, 2013]. Cette technique est expérimentale, et la contribution des mutations peu abondantes n'est pas connue.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La méthode de Sanger permet l'évaluation du statut mutationnel de la protéine de fusion *BCR-ABL* afin d'orienter le choix d'un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) efficace selon la mutation détectée et ainsi d'optimiser le traitement de la LMC ou de la LLA. S'il s'avère que l'utilisation d'un ITK n'est pas appropriée, le clinicien pourra orienter le patient vers une greffe de moelle osseuse si sa condition le permet ou vers une autre option thérapeutique.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : ne s'applique pas.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Bien que la majorité des patients atteints de LMC répondent bien au traitement à l'Imatinib, 20 à 30 % développeront une résistance [Quintas-Cardama *et al.*, 2009]. En fait, la résistance à l'Imatinib et aux autres ITK serait liée à une combinaison de facteurs dont l'observance du traitement par le patient, la biodisponibilité, la pharmacodynamie, les modifications génétiques, les mutations au domaine kinase de *BCR-ABL* ou une combinaison de ces facteurs [Quintas-Cardama *et al.*, 2009]. D'après une revue de littérature, Cortes et ses collaborateurs [2012] rapportent les conclusions de deux études selon lesquelles la présence de mutations dans le domaine kinase de la protéine de fusion *BCR-ABL* constituerait la cause principale de résistance au traitement; ces mutations seraient présentes dans 40 % à 60 % des cas de résistance secondaire³⁷ [Cortes *et al.*, 2012]. Au moins 70 mutations impliquant 57 acides aminés différents ont été rapportées dans le domaine kinase du gène *BCR-ABL* et elles sont principalement distribuées dans quatre régions (*ATP-binding P-loop*, *SH3 contact*, *SH2 contact* et *activation A-loop*) [Jones *et al.*, 2009]. L'analyse mutationnelle du gène de fusion *BCR-ABL* s'avère critique pour la détermination de la meilleure stratégie de traitement [Cortes *et al.*, 2012] et elle devrait permettre d'orienter le choix de l'ITK à utiliser en présence de signes de résistance à la médication [NCCN, 2014; Soverini *et al.*, 2011].

Les données repérées concernant la valeur pronostique de l'analyse mutationnelle de *BCR-ABL* proviennent d'études portant uniquement sur la LMC (tableau 2). Quelques études rétrospectives portant sur des patients atteints de LMC principalement en phase chronique

37. Résistance secondaire : succès du traitement et perte subséquente de réponse hématologique et cytogénétique. La résistance primaire se réfère à l'absence de réponse au traitement [Jabbour *et al.*, 2011].

et ayant développé une résistance à l'Imatinib ont révélé que les mutations détectées (mutation T315I et mutations à la région « P-loop ») étaient associées à une survie sans progression de la maladie (PFS) et à une survie globale (OS) défavorables [Khorashad *et al.*, 2008; Nicolini *et al.*, 2006; Soverini *et al.*, 2005; Branford *et al.*, 2003]. Par ailleurs, les résultats de l'étude de Jabbour et ses collaborateurs ont montré que des mutations dans la région « P-loop » étaient sans effet sur la survie globale. [Jabbour *et al.*, 2006]. Selon les auteurs, cette discordance par rapport aux études de Branford et ses collaborateurs [2003] et Soverini et ses collègues [2005] serait liée à des différences dans la sélection des patients et elles suggèrent que le pronostic serait tributaire de plusieurs autres facteurs que les mutations dans la région « P-loop ».

Enfin, des données provenant d'études randomisées groupées sans méta-analyse totalisant 1043 patients [Muller *et al.*, 2009] et d'une étude de cohorte de 174 patients (étude START A, phase II) [Apperley *et al.*, 2009] montrent les effets positifs d'un traitement de remplacement au Dasatinib (ITK de 2^e génération) chez des patients atteints de LMC (phase chronique ou accélérée, respectivement) résistants ou intolérants à l'Imatinib (tableau 2).

Tableau 2 Quelques études sur la valeur pronostique de l'analyse mutationnelle du gène de fusion *BCR-ABL* dans les cas de leucémie myéloïde chronique (LMC)

ÉTUDE	NOMBRE DE CAS	MÉTHODE	NOMBRE DE PATIENTS AVEC MUTATIONS (%)	VALEUR PRONOSTIQUE	
				NOMBRE DE PATIENTS RÉSISTANTS AUX ITK	RÉSULTATS CLINIQUES
Patients traités avec Imatinib					
Branford <i>et al.</i> , 2003	n = 144 PA : 40 PC tardive ³⁸ : 64 PC précoce : 40	Séquençage direct	Total : 27/144 PA : 13/40 (33) PC tardive : 14/64 (22) PC précoce : 0/40 (0) Mutations <i>P-loop</i> : 13/27 Mutations non <i>P-loop</i> : 14/27	Avec mutation détectée : PA : 13/13 PC tardive : 11/14 Sans mutation détectée : PA : 2/27 PC tardive : 2/50 PC précoce : 6/40	Nombre de décès Patients résistants à l'Imatinib : PA : 9/13 PC tardive : 5/14 Mutations <i>P-loop</i> : 12/13 (92 %); survie médiane 4,5 mois (étendue : 0,5 à 12) Mutations non <i>P-loop</i> : 3/14 (21 %); survie médiane 11 mois (étendue 0,2 à 7)
Soverini <i>et al.</i> , 2005	n = 40 PC tardive	dHPLC et Sanger	Total : 19/40 (48) <i>P-loop</i> : 9/19 Non <i>P-loop</i> : 10/19 dont 1 avec une mutation silencieuse	Avec mutation détectée : 13/19	Progression vers PA ou PB : 11/18 (délai médian de 9 mois (6-30 mois) après détection de la mutation et de 12 mois (7-33 mois) à partir du début du traitement à l'Imatinib) Nombre de décès : 7/18
Nicolini <i>et al.</i> , 2006	n = 89 résistants à l'Imatinib PC : 57 PA : 21 PB : 11	Séquençage direct	Total : 89/89 T315I : 18 <i>P-loop</i> : 23 Autres sites : 48	T315I : 6/18 <i>P-loop</i> : 12/23 Autres sites : 35/48	Survie globale après un suivi médian de 39,2 mois (5 à 67,2 mois) <i>P-loop</i> : 28,3 mois T315I : 12,6 mois Autres sites : valeur non atteinte (p < 0,000405)

38. Phase chronique tardive : ≥ 12 mois après le diagnostic.

ÉTUDE	NOMBRE DE CAS	MÉTHODE	NOMBRE DE PATIENTS AVEC MUTATIONS (%)	VALEUR PRONOSTIQUE	
				NOMBRE DE PATIENTS RÉSISTANTS AUX ITK	RÉSULTATS CLINIQUES
Jabbour <i>et al.</i> , 2006	n = 171 résistants à l'Imatinib PC précoce : 68 PC tardive : 66 PA : 34 PB : 3	Séquençage direct	Total : 62/171 PC précoce : 16/68 (24) PC tardive : 28/66 (42) PA : 17/34 (50) PB : 1/3 (33) <i>P-loop</i> : 24/62 (39)	171	Nombre de décès après un suivi médian de 56 mois (4-240 mois) <u>Avec</u> mutations : 9/62 (15 %) <u>Sans</u> mutations : 12/109 (11 %) (p = 0,63) Mutations <i>P-loop</i> : 2/23 (9 %) Autres mutations : 7/39 (18 %)
Khorashad <i>et al.</i> , 2008	n = 319 PC précoce : 171 PC tardive : 148	Séquençage direct	Total : 37/319 (11,6) Incidence cumulative durant 5 ans : 13,9 %	Risque de résistance cytologique complète en présence de mutations : RR : 3,8; p : 0,005	Survie sans progression à 5 ans <u>Sans</u> mutations : 86 % Mutations <i>P-loop</i> : 20 % Mutations non <i>P-loop</i> : 47 % Mutations hautement résistantes : 0 % Autres mutations : 64,7 %
Patients traités avec Dasatinib					
Muller <i>et al.</i> , 2009	n = 1043 (3 études) Résistants à l'Imatinib : 805 Intolérants à l'Imatinib : 238	dHPLC et Sanger	Total : 402/1043 384/805 (48) 18/238 (8)	Résistance ou réponse sous-optimale à l'Imatinib Avec mutations détectées : 384/402 Sans mutations détectées : 421/641	Après traitement avec Dasatinib Survie sans progression à 24 mois <u>Avec</u> mutations : 70 % <u>Sans</u> mutations : 80 % Survie globale à 24 mois <u>Avec</u> mutations : 88 % <u>Sans</u> mutations : 92 %

ÉTUDE	NOMBRE DE CAS	MÉTHODE	NOMBRE DE PATIENTS AVEC MUTATIONS (%)	VALEUR PRONOSTIQUE	
				NOMBRE DE PATIENTS RÉSISTANTS AUX ITK	RÉSULTATS CLINIQUES
Apperley <i>et al.</i> , 2009	n = 174 (étude START A, phase II) Résistants à l'Imatinib : 161 Intolérants à l'Imatinib : 13	dHPLC et/ou Sanger	Avant le traitement avec Dasatinib : Total : 88/156 patients analysés(56) 87/145 patients résistants à l'Imatinib (60) 1/11 patients intolérants à l'Imatinib (9)		Survie sans progression à 12 mois : 66 % Survie globale à 12 mois : 82 % MHR ³⁹ : 64 % (111/174) (IC95 :56,2-70,9 %) CHR : 45 % (78/174) MCyR ⁴⁰ : 39 % (67/174) (IC95 :31,2-46,2 %) CCyR : 32 % (55/174)

Abréviations : CCyR : réponse cytogénétique complète (*complete cytogenetic response*); CHR : réponse hématologique complète (*complete hematological response*); dHPLC : *Denaturing high performance liquid chromatography*; MCyR : réponse cytogénétique majeure (*major cytogenetic response*); MHR : réponse hématologique majeure (*major hematological response*); n : nombre de patients; PA : leucémie myéloïde chronique phase accélérée; PB : leucémie myéloïde chronique phase blastique; PC : leucémie myéloïde chronique phase chronique.

39. Une réponse hématologique majeure (MHR) est considérée comme satisfaisant aux critères de la réponse hématologique complète (CHR) ou indiquant l'absence de preuves de leucémie (*No evidence of leukemia, NEL*). La réponse hématologique complète (CHR) est définie selon les paramètres suivants : compte de leucocytes inférieur à la limite supérieure de la normale institutionnelle, compte absolu de neutrophiles $\geq 1 \times 10^9/L$; plaquettes $\geq 100 \times 10^9/L$; aucuns blastes ou promyélocytes dans le sang périphérique; blastes moelle osseuse $\leq 5\%$, myélocytes + métamyélocytes sang périphérique $< 5\%$; basophiles sang périphérique / moelle osseuse $< 2\%$; aucune contribution extramédullaire. La NEL est définie comme étant l'absence de blastes ou de promyélocytes dans le sang périphérique, blastes $\leq 5\%$ et aucune contribution extramédullaire [Guilhot *et al.*, 2007].

40. Les niveaux de réponse cytogénétique sont classifiés selon le pourcentage de métaphases Ph+ trouvées dans les biopsies de moelle osseuse, comme suit : complète (CCyR), 0 %; partielle (PCyR), 1 à 35 %; mineure, 36 à 65 %; minimale, 66 à 95 %; absence de CyR, $\geq 96\%$. Une réponse cytogénétique majeure (MCyR) est la somme de CCyR et PCyR [Guilhot *et al.*, 2007].

5.1.3 Valeur thérapeutique

L'analyse proposée permet de détecter des mutations dans le domaine kinase de *BCR-ABL* après une réponse sous-optimale ou une perte de réponse ou encore un échec de traitement avec un ITK, révélant ainsi une cause de la résistance. Les résultats obtenus permettent d'optimiser le traitement et de favoriser la meilleure utilisation possible des médicaments. Ainsi, certaines mutations confèrent une résistance spécifiquement à un ITK et non à un autre. Le tableau 3 présente une liste des mutations au domaine kinase de *BCR-ABL1* et leur sensibilité *in vitro* respective aux cinq ITK utilisés dans le traitement de la LMC. Le degré de sensibilité d'un gène de fusion *BCR-ABL* muté à l'égard d'un ITK donné est exprimé en concentration inhibitrice 50 % (IC_{50}). Cette concentration peut être utilisée pour guider le choix de l'ITK à utiliser puisqu'il y a corrélation entre la valeur IC_{50} pour une mutation *in vitro* et la réponse clinique chez les patients qui présentent la même mutation [Baccarani *et al.*, 2013]. Selon le demandeur, dix mutations ont une sensibilité distinctive aux ITK (lignes en gris dans le tableau 3). Les mutations F359C et V299H ne sont pas présentées dans ce tableau.

Tableau 3 Principales mutations résistantes et intervalle IC₅₀ des inhibiteurs de tyrosine kinase pouvant être utilisés

<i>BCR-ABL1</i>	Imatinib IC ₅₀ , étendue (nmol)	Nilotinib IC ₅₀ , étendue (nmol)	Dasatinib IC ₅₀ , étendue (nmol)	Bosutinib IC ₅₀ (nmol)	Ponatinib IC ₅₀ (nmol)
Aucune mutation	260-678	< 10-25	0,8-1,8	41,6	0,5
M244V*	1600-3100	38-39	1,3	147,4	2,2
L248V	1866-10000	49,5-919	9,4	S.O.	S.O.
G250E*	1350 to > 20 000	48-219	1,8-8,1	179,2	4,1
Q252H	734-3120	16-70	3,4-5,6	33,7	2,2
Y253F	> 6400-8953	182-725	6,3-11	40	2,8
Y253H*	> 6400-17 700	450-1300	1,3-10	S.O.	6,2
E255K*	3174-12 100	118-566	5,6-13	394	14
E255V	6111-8953	430-725	6,3-11	230,1	36
D276G	1147	35,3	2,6	25	NA
E279K	1872	36,5-75	3	39,7	NA
V299L	540-814	23,7	15,8-18	1086	NA
F311L	480-1300	23	1,3	NA	NA
T315I*	> 6400 to > 20 000	697 to > 10 000	137 to > 1000	1890	11
T315A	125	S.O.	760	S.O.	1,6
F317L*	810-7500	39,2-91	7,4-18	100,7	1,1
F317V	500	350	S.O.	S.O.	10
M351T*	880-4900	7,8-38	1,1-1,6	29,1	1,5
F359V*	1400-1825	91-175	2,2-2,7	38,6	10
V379I	1000-1,630	51	0,8	S.O.	S.O.

<i>BCR-ABL1</i>	Imatinib IC₅₀, étendue (nmol)	Nilotinib IC₅₀, étendue (nmol)	Dasatinib IC₅₀, étendue (nmol)	Bosutinib IC₅₀ (nmol)	Ponatinib IC₅₀ (nmol)
L384M*	674-2800	39-41,2	4	19,5	S.O.
L387M	1000-1100	49	2	S.O.	S.O.
H396R*	1750-5400	41-55	1,3-3	33,7	NA
H396P	850-4300	41-43	0,6-2	18,1	1,1
F486S	2728-9100	32,8-87	5,6	96,1	S.O.

Tableau adapté de Baccarani *et al.*, 2013.

Abréviations : IC₅₀ : concentration inhibitrice (en anglais : *half maximal inhibitory concentration*); nmol : nanomole; S.O. : sans objet.

* Représentatif des dix mutations les plus fréquentes

Deux ITK (Bosutinib et Ponatinib) ne figurent pas dans la liste de la RAMQ et les trois autres sont classés comme médicaments d'exception (annexe A).

Selon des données fournies par le demandeur, une analyse mutationnelle réalisée chez des patients atteints de LMC a révélé la présence de 39 mutations chez 16 (11 %) patients. De ces mutations, 64 % avaient un impact thérapeutique pour 75 % (12/16) des patients.

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité		x	
Spécificité		x	
Valeur prédictive positive (VPP)		x	
Valeur prédictive négative (VPN)		x	
Rapport de vraisemblance (LR)		x	
Courbe ROC		x	
Exactitude		x	

Les études décrites à la section précédente (tableau 2) montrent également le lien entre la résistance aux ITK et les mutations de *BCR-ABL*.

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		x	
Reproductibilité		x	
Sensibilité analytique	x		
Spécificité analytique		x	
Effet de matrice			x
Concordance		x	
Corrélation entre test et comparateur		x	

Sensibilité

Selon un consensus d'experts internationaux (National Institutes of Health, 2005) et sur la base d'une revue de littérature, le séquençage direct de type Sanger permet la détection de mutations avec une sensibilité de 15 à 25 %, soit une mutation présente dans environ 1 transcrit *BCR-ABL* sur 5 comparativement à d'autres technologies plus sensibles comme la dHPLC dont la sensibilité atteindrait 0,1 à 10 % [Hughes *et al.*, 2006].

Par ailleurs, selon un panel d'experts de l'European LeukemiaNet (ELN), la faible sensibilité de la méthode de Sanger ne serait pas une limitation puisque l'impact clinique de la détection de mutations dans le domaine kinase de *BCR-ABL* par des

méthodes hautement sensibles demeure incertain [Soverini *et al.*, 2011].

Tableau 4 Validité analytique de l'analyse mutationnelle de la protéine de fusion BCR-ABL

ÉTUDE	NOMBRE ET CARACTÉRISTIQUES DES PATIENTS	NOMBRE DE PATIENTS AVEC MUTATIONS (%)	PÉRIODE DE DÉTECTION DES MUTATIONS
Hochhaus <i>et al.</i> , 2002	66 patients résistants à l'Imatinib <ul style="list-style-type: none"> ▪ crise blastique myéloïde : 33 ▪ crise blastique lymphoïde : 2 ▪ PA : 16 ▪ PC : 13 ▪ LLA : 2 	27/66 patients	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Détectées au moment de la récurrence ▪ Non détectées avant le traitement
Branford <i>et al.</i> , 2002	18 patients résistants à l'Imatinib LMC ou LLA-Ph+	12/18 patients	Non détectées avant l'Imatinib : 9 patients Non détectées 3 à 9 mois avant le début de la résistance : 4 patients
Branford <i>et al.</i> , 2003	N = 144 PA : 40 PC tardive : 64 ⁴¹ PC début : 40	27/144 patients PA : 13/40 (33) PC tardive : 14/64 (22) PC début : 0/40	Mutations détectées à 8 mois (médiane) (3-18 mois) après début de l'Imatinib <ul style="list-style-type: none"> ▪ détectées chez les patients en PA et PC tardive ▪ non détectées en début de la PC
Soverini <i>et al.</i> , 2014	N = 272 (Ph ⁺ LLA) Âge médian : 53 ans (17-79) Résistants à l'Imatinib : 189 Résistants aux ITK 2 ^e gén. ⁴² : 98 Résistants au Dasatinib ⁴³ : 14	Résistants à l'Imatinib : 131/189 (69,3) Résistants aux ITK 2 ^e gén. : 76/98 (78) Résistants au Dasatinib : 11/14 (79)	Analyse de 60 patients au moment du diagnostic (avant traitement) : mutations rarement détectées par séquençage direct

Abréviations : LLA : leucémie lymphoblastique aigüe; LMC: leucémie myéloïde chronique; PA : phase accélérée; PC : phase chronique; Ph⁺ : chromosome de Philadelphie positif.

Données de validation locales

L'analyse proposée a été développée et elle est réalisée au laboratoire du demandeur. Chaque échantillon est séquencé en duplicata de façon bidirectionnelle de façon à confirmer les variations observées. Aucun programme de contrôle de la qualité externe n'est disponible sur le marché. Pour remédier à cela, certains

41. PC tardive : ≥ 12 mois après le diagnostic.

42. Dasatinib ou Nilotinib administré en traitement de deuxième ligne après échec du traitement à l'Imatinib.

43. Administré en traitement de première ligne.

échantillons sont testés rétrospectivement pour vérifier la présence de mutations en utilisant une méthode de remplacement. De plus, une entente d'échange de spécimens (témoins avec ou sans mutations) avec le laboratoire de The University Health Network (Ontario) a été conclue afin d'assurer la qualité des résultats⁴⁴.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Les recommandations répertoriées pour l'analyse mutationnelle du domaine kinase du gène de fusion *BCR-ABL* concernent uniquement la LMC.

Les lignes directrices du traitement de la LMC publiées en 2013 par le Groupe québécois de recherche en LMC-NMP recommandent la recherche de mutations *ABL* dans le cadre du suivi de traitement dans les cas suivants :

- Échec des jalons thérapeutiques;
- Expression *BCR-ABL* par RQ-PCR qui augmente de plus de 0,5 log dans 2 prélèvements consécutifs, à plus de 0,1 % par rapport à l'échelle internationale (IS);
- Absence de réponse après l'introduction d'un ITK de remplacement ou une nouvelle perte de réponse.

Et dans les cas d'une résistance secondaire avec « perte de réponse cytogénétique complète (RCC), perte de réponse moléculaire majeure (RMM) ou une augmentation de 0,5 log confirmée mais toujours en phase chronique.

L'European LeukemiaNet (ELN) et l'European Society for Medical Oncology (ESMO) recommandent que la méthode de séquençage de Sanger soit utilisée pour l'analyse mutationnelle du domaine kinase du gène de fusion *BCR-ABL* [Baccarani *et al.*, 2012; Soverini *et al.*, 2011]. L'ELN formule également la recommandation que le séquençage direct (de type Sanger) puisse être précédé par une prédétection par HPLC [Soverini *et al.*, 2011].

Par ailleurs, l'European LeukemiaNet (ELN) et l'European Society for Medical Oncology (ESMO) recommandent que les stratégies plus sensibles de détection des mutations soient réservées au domaine de la recherche [Baccarani *et al.*, 2012; Soverini *et al.*, 2011].

L'ELN a formulé des recommandations quant aux situations où l'analyse mutationnelle du gène de fusion *BCR-ABL* devrait être réalisée chez les patients atteints de LMC [Soverini *et al.*, 2011], soit :

- Au moment du diagnostic : seulement pour les patients en phase accélérée ou en phase blastique;
- Durant le traitement à l'Imatinib :
 - En cas d'échec;
 - En cas d'augmentation du niveau de transcrits *BCR-ABL* menant à une perte de réponse moléculaire majeure;
 - Pour tout autre cas de réponse sous-optimale;

44. Une copie du courriel attestant l'entente a été annexée à la demande d'addition de l'analyse au répertoire.

- Durant traitement avec les ITK de deuxième ligne (Dasatinib ou Nilotinib) : en cas de perte de réponse hématologique ou cytogénétique.

Le NCCN [2014] recommande l'analyse mutationnelle lors du monitoring de la réponse aux ITK, dans les situations suivantes :

- Phase chronique :
 - Réponse initiale inadéquate (échec à atteindre une PCyR⁴⁵ ou *BCR-ABL1/ABL1* ≤ 10 % (IS⁴⁶) à 3 et 6 mois ou CCyR⁴⁷ à 12 et 18 mois);
 - Tout signe de perte de réponse (définie comme récurrence hématologique ou cytogénétique);
 - Augmentation de 1 log du niveau de transcrits *BCR-ABL* et perte de MMR⁴⁸;
- Lorsque la maladie progresse vers la phase accélérée ou la phase blastique.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

Cette analyse est effectuée par le demandeur depuis 2009.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

Cette analyse est effectuée par le demandeur depuis 2009.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (sociaux, juridiques, politiques)

N'ont pas été évalués.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les mutations au domaine kinase du gène de fusion *BCR-ABL* constituent une des causes de la résistance aux inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) actuellement utilisés pour le traitement de la LLA et de la LMC. Dans ce contexte, l'analyse mutationnelle du gène de fusion *BCR-ABL* permet de déterminer la meilleure stratégie de traitement et d'orienter le choix de l'ITK à utiliser. Les mutations détectées chez les patients atteints de LMC ayant développé une résistance à l'Imatinib sont associées à une survie sans progression et une survie globale défavorables si une thérapie de remplacement n'est pas appliquée; c'est particulièrement le cas de la mutation T315I et des mutations à la région « P-loop ». L'identification de mutations à la suite de la manifestation d'une résistance ou d'une intolérance à l'Imatinib permet de prescrire un traitement de remplacement (ITK de deuxième génération) et rend possible une amélioration du pronostic pour les patients.

45. PCyR : réponse cytogénétique partielle.

46. IS : *International standard*.

47. CCyR : réponse cytogénétique complète.

48. MMR : réponse moléculaire majeure.

7.2 Validité clinique

Se reporter à la section « Pertinence clinique ».

7.3 Validité analytique

Les données de validité analytique repérées proviennent d'études portant sur la sensibilité analytique du séquençage direct de type Sanger. On rapporte une sensibilité de 15 à 25 %, qui est qualifiée de faible par rapport à celle des autres techniques disponibles. Par ailleurs, selon un panel d'experts de l'European LeukemiaNet (ELN), la faible sensibilité de la méthode de Sanger ne serait pas une limitation puisque l'impact clinique de la détection de mutations dans le domaine kinase de la protéine *BCR-ABL* par des méthodes hautement sensibles demeure incertain.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Le Groupe québécois de recherche en LMC-NMP recommande la recherche de mutations dans le cadre du suivi de traitement en cas d'échec de traitement ou d'absence de réponse, d'une augmentation de plus de 0,5 log des transcrits *BCR-ABL* ou dans certains cas de résistance secondaire.

La méthode de séquençage de type Sanger utilisée par le demandeur est recommandée par l'ELN et l'ESMO, et selon l'ELN son application peut être précédée par une technique de prédétection telle que la dHPLC. L'utilisation de méthodes plus sensibles de détection des mutations ne fait toutefois pas consensus selon la littérature. Toutefois, l'ELN et l'ESMO recommandent que ces méthodes soient réservées au domaine de la recherche.

Les recommandations de l'ELN et du NCCN permettent de guider le clinicien quant au moment où l'analyse mutationnelle du domaine kinase de *BCR-ABL* devrait être réalisée.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Analyse mutationnelle du domaine kinase de la protéine de fusion
BCR-ABL

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation supplémentaire

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Apperley JF, Cortes JE, Kim DW, Roy L, Roboz GJ, Rosti G, et al. Dasatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia in accelerated phase after imatinib failure: The START A trial. *J Clin Oncol* 2009;27(21):3472-9.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122(6):872-84.
- Baccarani M, Pileri S, Steegmann JL, Muller M, Soverini S, Dreyling M. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23(Suppl 7):vii72-7.
- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102(1):276-83.
- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002;99(9):3472-5.
- Cortes J, Goldman JM, Hughes T. Current issues in chronic myeloid leukemia: Monitoring, resistance, and functional cure. *J Natl Compr Canc Netw* 2012;10(Suppl 3):S1-S13.
- Frueh FW et Noyer-Weidner M. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: Impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(4):452-61.
- Groupe québécois de recherche en LMC et NMP. Lignes directrices du traitement de la LMC [site Web]. Montréal, Qc : Groupe québécois de recherche en LMC et NMP (Leucémie myéloïde chronique et néoplasies myéloprolifératives); 2013. Disponible à : <http://www.gqr-lmc-nmp.ca/leucemie-myeloide-chronique/lmc-guides-therapeutiques/>.
- Guilhot F, Apperley J, Kim DW, Bullorsky EO, Baccarani M, Roboz GJ, et al. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood* 2007;109(10):4143-50.
- Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002;16(11):2190-6.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: Review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL

- transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108(1):28-37.
- Jabbour E et Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 2014;89(5):547-56.
- Jabbour E, Branford S, Saglio G, Jones D, Cortes JE, Kantarjian HM. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2011;117(9):1800-11.
- Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 2006;20(10):1767-73.
- Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proc* 2005;80(11):1517-27.
- Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: A report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2009;11(1):4-11.
- Khorashad JS, de Lavallade H, Apperley JF, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression. *J Clin Oncol* 2008;26(29):4806-13.
- Ma H, Sun H, Sun X. Survival improvement by decade of patients aged 0-14 years with acute lymphoblastic leukemia: A SEER analysis. *Sci Rep* 2014;4:4227.
- Martinez-Serra J, Gutierrez A, Marcus TF, Soverini S, Amat JC, Navarro-Palou M, et al. Four-channel asymmetric Real-Time PCR hybridization probe assay: A rapid pre-screening method for critical BCR-ABL kinase domain mutations. *Clin Biochem* 2012;45(4-5):345-51.
- Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: Analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* 2009;114(24):4944-53.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Chronic myelogenous leukemia. Version 3. 2014. Fort Washington, PA : NCCN; 2014. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Acute lymphoblastic leukemia. Version 3.2013. Fort Washington, PA : NCCN; 2013. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- Negrin RS et Schiffer CA. Clinical use of tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com>.
- Nicolini FE, Corm S, Le QH, Sorel N, Hayette S, Bories D, et al. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia

- patients: A retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP). *Leukemia* 2006;20(6):1061-6.
- Press RD, Willis SG, Laudadio J, Mauro MJ, Deininger MW. Determining the rise in BCR-ABL RNA that optimally predicts a kinase domain mutation in patients with chronic myeloid leukemia on imatinib. *Blood* 2009;114(13):2598-605.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 2009;16(2):122-31.
- Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;340(17):1330-40.
- Soverini S, De Benedittis C, Papayannidis C, Paolini S, Venturi C, Iacobucci I, et al. Drug resistance and BCR-ABL kinase domain mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era: The main changes are in the type of mutations, but not in the frequency of mutation involvement. *Cancer* 2014;120(7):1002-9.
- Soverini S, De Benedittis C, Machova Polakova K, Brouckova A, Horner D, Iacono M, et al. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood* 2013;122(9):1634-48.
- Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: Recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118(5):1208-15.
- Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: A study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23(18):4100-9.

ANNEXE A

Inhibiteurs de la tyrosine kinase couramment utilisés dans le traitement de la LMC et de la LLA : liste de médicaments couverts par la RAMQ et indications reconnues

Nom (générique)	Classification	Liste RAMQ	Indications
Imatinib (Gleevec)	Médicament d'exception	Oui	Traitement de la LMC en phase chronique, accélérée ou blastique Traitement de la LLA Ph+ réfractaire ou récidivante et chez un patient pour qui une transplantation de cellules souches est prévisible Traitement de la LLA Ph+ nouvellement diagnostiquée chez l'adulte à la suite d'une chimiothérapie parentérale, soit durant la phase de maintien
Dasatinib (Sprycel)	Médicament d'exception	Oui	Traitement de 1 ^{re} intention de la LMC en phase chronique et accélérée chez les adultes présentant un échec, une réponse sous-optimale ou une intolérance sérieuse à l'Imatinib ou au Nilotinib *Pas d'indication reconnue pour la LLA
Nilotinib (Tasigna)	Médicament d'exception	Oui	Traitement de la LMC en phase chronique ou accélérée chez l'adulte présentant un échec, une réponse sous-optimale ou une intolérance sérieuse à l'Imatinib. Traitement de 1 ^{ère} intention de la LMC en phase chronique *Pas d'indication reconnue pour la LLA
Bosutinib (Bosulif)	ND	Prévu octobre 2014*	ND
Ponatinib (Iclusig)	ND	ND	ND

ND : non déterminé

Source : Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ). Liste des médicaments : dernière mise à jour le 16 juillet 2014. Disponible à : https://www.prod.ramq.gouv.qc.ca/DPI/PO/Commun/PDF/Liste_Med/Liste_Med/liste_med_2014_07_16_fr.pdf.

* L'INESSS a publié un avis de refus de l'introduction du Bosutinib pour le traitement de la LMC en octobre 2014 :

<http://www.inesss.qc.ca/activites/evaluation-des-medicaments/evaluation-des-medicaments/extrait-davis-au-ministre/bosulif.html>.

DOSAGE DE LA 3-MÉTHOXYTYRAMINE PLASMATIQUE PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE - 2014.02.03)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHUM – Hôpital Saint-Luc
- 1.2 **Date de transmission de la demande au MSSS** : 16 janvier 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 10 juin 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) avec extraction automatisée directe (*on-line*).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le demandeur utilise une technique classique de LC-MS/MS avec extraction automatisée directe. La technique comporte trois étapes : 1) la préparation de l'échantillon, 2) la chromatographie en phase liquide (LC) et 3) l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

La préparation de l'échantillon a pour but de purifier celui-ci en enlevant les protéines et d'autres substances avant de l'analyser. Elle peut être faite selon plusieurs méthodes dont les trois les plus communes sont : l'extraction en phase solide (SPE), l'extraction liquide-liquide (ELL) et la précipitation des protéines (PP) [Adaway et Keevil, 2012]. La méthode en phase solide est celle utilisée par le demandeur⁴⁹.

La LC est une méthode qui permet de séparer les molécules d'un mélange complexe (sérum ou plasma) selon leurs propriétés physico-chimiques (poids moléculaire, hydrophobicité ou autre). Le principe de la LC fait intervenir une phase mobile liquide et une phase solide stationnaire (sur colonne ou sur couche mince). La composition des phases liquide et solide varie en fonction du type de molécule à purifier.

La MS vise à déterminer la masse des molécules présentes dans un échantillon

49. D'après l'information fournie par le demandeur.

donné. La mesure de la masse repose sur la déviation des molécules préalablement ionisées par un champ électrique ou magnétique, pour lesquelles les trajectoires sont proportionnelles à leur masse et à leur charge.

Le spectromètre de masse est composé :

D'une source d'ionisation pour modifier la charge des molécules et les faire passer en phase gazeuse (p. ex. : ionisation *électro-spray* (ESI), ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou autre).

- 1 D'un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction du rapport masse sur charge (m/z).

Les analyseurs peuvent être couplés de façon séquentielle. Il s'agit de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions (dans le cas présent, en tandem donc MS/MS). Un premier analyseur sélectionne les ions selon un certain m/z (purification). L'ion purifié est ensuite fragmenté dans une chambre de collision. Un deuxième analyseur mesure le m/z des fragments [Adaway et Keevil, 2012; Grebe et Singh, 2011].

2.3 Société ou développeur

Méthode maison. Le demandeur utilise la technique classique de LC-MS/MS avec extraction en phase solide automatisée directe (*on line*), sur un système Symbiosis-Quattro Premier. Pour le contrôle de la qualité interne, l'analyse est faite en duplicata sur deux pools de plasma maison et sur deux autres échantillons différents d'un matériel utilisé précédemment pour des contrôles de qualité externe. Une courbe de calibration est incluse avec chaque série d'analyses, y compris un contrôle de qualité provenant de pools de sérum et de produits commerciaux. Le contrôle de qualité externe est assuré par la participation du laboratoire au programme australien RCPA (*Chemical Pathology Quality Assurance Programs*). Les valeurs de référence pour la 3-méthoxytyramine plasmatique sont : < 0,17 nmol/l.

2.4 **Licence** : ne s'applique pas.

2.5 **Brevet** : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Sans objet. Réactifs préparés au laboratoire. Colonne de chromatographie et cartouches d'extraction commerciales.

2.7 **Valeur pondérée** : 126,94

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEU DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Tous les patients chez qui on suspecte un phéochromocytome (Phéo) ou un paragangliome (Pgl) ainsi que les patients atteints d'une mutation germinale reconnue comme étant associée à ces tumeurs.

3.2 Description des maladies visées

Phéochromocytomes et paragangliomes

Les Phéo et les Pgl sont des tumeurs développées à partir du tissu neuroendocrinien (cellules chromaffines), dérivé de la crête neurale, appartenant au système nerveux sympathique et parasympathique [Rouaix-Emery *et al.*, 2014]. La classification de l’OMS de 2004 classe le Phéo comme un Pgl intrasurrénalien [Pacak *et al.*, 2011].

Les Pgl associés au système parasympathique se développent surtout au niveau de la tête et du cou et ils sont généralement peu sécrétants [Rouaix-Emery *et al.*, 2014] alors que ceux associés au système sympathique se développent au dépens de la médullosurrénale ou des ganglions sympathiques des régions thoracique, abdominale et pelvienne et ils sont potentiellement actifs. Le terme « phéochromocytome » est habituellement réservé aux tumeurs chromaffines de la médullosurrénale.

Ces tumeurs, Phéo et Pgl, sont sporadiques dans 70 % des cas ou elles font partie de syndromes de prédisposition génétique dans 30 % des cas : néoplasies endocriniennes multiples (NEM) de type 2A et 2B (gène *Ret*), maladie de Von Hippel Lindau (gène *VHL*), syndromes des paragangliomes héréditaires (gènes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*) et neurofibromatose de type 1 (gène *NF1*) [Rouaix-Emery *et al.*, 2014]. La mutation du *SHDB*, initialement rapportée dans une cohorte germanique et polonaise, est la plus fréquente des mutations rencontrées dans le monde [Lefebvre *et al.*, 2012] et elle concerne surtout des Pgl non surrénaux, particulièrement de la tête et du cou [Pacak *et al.*, 2011].

L’expression clinique est variable selon la localisation, la taille de la tumeur et l’intensité de ses sécrétions hormonales de catécholamines. Certaines catécholamines entraînent une hypertension importante et abrupte associée à des céphalées intenses, des sudations et des palpitations, soit le portrait classique rapporté d’un Phéo actif et sécrétant. Certaines restent asymptomatiques. De plus, il n’y a pas nécessairement de corrélation entre les symptômes d’hypertension et le taux de catécholamines circulant [Rouaix-Emery *et al.*, 2014]. Des taux circulants élevés de dopamine peuvent causer de l’hypotension [Koch *et al.*, 2003].

Les catécholamines regroupent l’adrénaline (épinéphrine), la noradrénaline (norépinéphrine) et la dopamine. La synthèse des catécholamines provient de la L-tyrosine alimentaire ou du métabolisme hépatique de la phénylalanine. La dopamine se transforme d’abord en noradrénaline puis en adrénaline de façon enzymatique. L’enzyme cathécol-o-méthyltransférase (COMT) transformera les catécholamines circulantes primaires en métanéphrines qui regroupent la normétanéphrine, la métanéphrine et la 3-méthoxytyramine (3-MT), catabolites sanguins de la noradrénaline, l’adrénaline et la dopamine, respectivement [Peaston *et al.*, 2010]. La grande majorité des métanéphrines (95 %) subiront une sulfoconjugaison dans le tractus gastro-intestinal et on trouvera dans les urines les acides vanilylmandélique (adrénaline, noradrénaline) et homovanillique (dopamine) grâce aux enzymes monoamine oxydase (MAO) et aldéhydealdéhydehydrogénase [Rouaix-Emery *et al.*, 2014]. Ce sont les métanéphrines libres qui reflètent la sécrétion tumorale, qui représente 5 % des métanéphrines totales qu’on mesurera dans le sang circulant [Rouaix-Emery

et al., 2014]. De plus, les dosages plasmatiques de 3-MT libre détecteront un nombre plus élevé de Pgl actifs que leurs mesures d'excrétion urinaire (33 % vs 27 %; $p < 0,05$) [Van Duinen *et al.*, 2013].

Ce sont des tumeurs rares, potentiellement mortelles, qui peuvent affecter les adultes et les enfants (10 % des cas) et dont la prévalence est de 1/30 000, selon le demandeur. Rouaix-Emery et ses collaborateurs (2014), dans une publication récente, indiquent une incidence de 0,95 nouveau cas par 100 000 personnes. L'incidence est sous-estimée, car ce sont des maladies mal connues et sous-diagnostiquées. Une mutation fondatrice dans la population canadienne-française prédispose au développement des Pgl (SDHC) [Dumas *et al.*, 2011].

Dosage de la 3-méthoxytyramine

Hormis pour certains cas de paragangliomes sécrétant uniquement la dopamine et son métabolite (3-MT), la détection de ces maladies (Phéo et Pgl) ne repose pas sur le dosage de la 3-MT. Cependant, une fois le diagnostic posé, l'analyse de la 3-MT fait partie du bilan biochimique demandé. Le dosage permet, entre autres, d'orienter le choix des tests génétiques à utiliser pour identifier la mutation responsable de la maladie. Le dosage de la 3-MT donne une indication de la malignité de la tumeur, puisque les tumeurs sécrétant la dopamine ont plus de probabilité d'être métastatiques. Le dosage fera également partie du bilan de suivi des patients dont la tumeur est métastatique, dans le but de détecter rapidement les récives. En plus des patients ayant développé la maladie, les individus porteurs de la mutation germinale (favorisant l'apparition de telles tumeurs) seront également suivis annuellement par un bilan comprenant la 3-MT⁵⁰.

3.3 Nombre de patients visés

De 10 à 15 nouveaux cas par année plus 15 à 30 suivis de cancers métastatiques.

3.4 Spécialités médicales concernées (et autres professionnels, le cas échéant)

Médecine interne, endocrinologie, oncologie, éventuellement ORL (tumeurs cervicales), génétique, pédiatrie.

3.5 Modalités d'administration du test

Échantillon plasmatique par ponction veineuse dans un tube d'héparine ou d'EDTA après une nuit de jeûne et une période minimale en position allongée sur le dos [Rouaix-Emery *et al.*, 2014; Peitzch *et al.*, 2013; Lenders *et al.*, 2007; Pacak *et al.*, 2007]. Les concentrations de 3-MT peuvent être majorées par l'alimentation — d'où l'importance du jeûne [Van Duinen *et al.*, 2013; De Jong *et al.*, 2009], mais aussi par la prise d'antidépresseurs tricycliques ou d'acétaminophène [Rouaix-Emery *et al.*, 2014]. Il est recommandé aussi de s'abstenir de boissons caféinées ou décaféinées [Darr *et al.*, 2014]. Dans la mesure du possible, l'arrêt de toute médication affectant le métabolisme des catécholamines une semaine avant le prélèvement est fortement suggéré⁵¹.

Par ailleurs, une étude n'a pu déceler de différence significative des mesures

50. D'après l'information du demandeur, 2014.

51. *Ibidem*.

plasmatiques de la 3-MT selon l'âge, l'IMC⁵² et le sexe [Van Duinen *et al.*, 2013], ce qui n'est pas le cas pour les autres méthanéphrines dans le diagnostic du Phéo [Rouaix-Emery *et al.*, 2014].

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Cette analyse ne remplace pas les analyses existantes, soit celles recherchant les catécholamines et méthanéphrines dans le plasma et l'urine, mais elle est complémentaire; elle mesure spécifiquement la 3-MT, métabolite circulant de la dopamine. Cette analyse permet donc la détection de tous les Phéo et Pgl sécrétant la dopamine afin d'en assurer une meilleure prise en charge.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Selon le demandeur, le diagnostic biochimique du Phéo et du Pgl est amorcé par le dosage dans le plasma et l'urine des catécholamines et méthanéphrines. Une fois le diagnostic confirmé, le dosage de la 3-méthoxytyramine permet d'orienter la recherche de mutations (choix des tests génétiques), si approprié, afin de repérer celle qui est responsable de la maladie.

Parmi les technologies actuellement disponibles, il y a la chromatographie liquide avec détection électrochimique (LC-ECD) [Peitzsch *et al.*, 2013; Eisenhofer *et al.*, 1986], la chromatographie liquide haute performance avec spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) [Pillai et Callen, 2010], les immunoessais enzymatiques (EIA) [Pillai et Callen, 2010] et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) [Leung et Fong, 2014; Peitzsch *et al.*, 2013].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La technologie LC-MS/MS est maintenant très répandue dans les laboratoires cliniques [Ackermans *et al.*, 2014]. Sa spécificité analytique est meilleure que celle des immunoessais [Pillai et Callen, 2010] ou même que de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et elle a un meilleur rendement que la GC-MS conventionnelle [Grebe et Singh, 2011]. Elle présente aussi une spécificité plus élevée que la HPLC-ECD et peut être utilisée pour analyser de plus petits volumes. Elle a un rapport coût-efficacité positif car elle réduit le temps de traitement de l'échantillon et le temps de l'analyse comparativement à la HPLC-ECD [Van Berkel *et al.*, 2014]. Cette méthode analytique évite les interférences chromatographiques par analogie de structure, mais elle n'affranchit pas des interférences pharmacologiques, d'où l'importance de faire l'anamnèse médicamenteuse, voire de cesser certains médicaments avant le prélèvement sanguin [Rouaix-Emery *et al.*, 2014].

Récemment, il a été possible de faire l'extraction en phase solide *on-line* entièrement automatisée couplée à la LC-MS/MS, ce qui élimine plusieurs des limites des techniques en phase solide *off-line*, telle que l'évaporation du solvant, tout en ayant l'avantage de pouvoir tester un plus grand nombre d'échantillons [Peaston *et al.*, 2010] et de profiter de sa rapidité d'exécution (environ 31 minutes avec la méthode utilisée par le requérant).

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

52. IMC : indice de masse corporelle.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Le dosage de la 3-MT est une analyse complémentaire au dosage des métabolites plasmatiques ou urinaires de l'adrénaline et de la noradrénaline chez les patients atteints ou suspectés d'être atteints d'un Phéo ou d'un Pgl sécrétant la dopamine. C'est Eisenhofer et ses collaborateurs [2005] qui ont rapporté en premier l'utilité de mesurer la 3-MT plasmatique libre pour la détection et le suivi des Pgl sécrétant de la dopamine.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Le dosage de la 3-MT permettra une meilleure prise en charge des patients atteints de Phéo ou de Pgl, tout d'abord en dépistant des tumeurs sécrétant des catécholamines à bas bruits, ce qui n'est pas le cas avec les marqueurs habituels dont les catécholamines urinaires et la métanéphrine ou la normétanéphrine plasmatiques. Il s'agit de tumeurs potentiellement mortelles menant aussi à des accidents cardiovasculaires et vasculaires cérébraux.

Le seul traitement améliorant la survie, dans les cas de Phéo ou de Pgl, est la résection chirurgicale [Jimenez *et al.*, 2013] qui sera possible sur de petites tumeurs sans extension, d'où l'importance de détecter précocement les tumeurs et les récurrences de tumeurs.

Il y a une répercussion sur le traitement des patients avec Pgl sécrétant de la dopamine. Ainsi, cette nouvelle analyse, selon le demandeur, permettra de détecter de façon sensible une réponse possible à la chirurgie pour la maladie métastatique et elle sera un outil précieux de surveillance de la récurrence. Parmi les patients avec Phéo ou Pgl, la concentration de la 3-MT était de 4 à 6 fois plus élevée chez les patients avec métastases comparativement à ceux qui n'en n'avaient pas [Rouaix-Emery *et al.*, 2014; Peitzch *et al.*, 2013; Eisenhofer *et al.*, 2012].

De plus, le dosage sérié de la 3-MT permettra la détection précoce des tumeurs primaires ou des récurrences sans l'utilisation répétée d'examens radiologiques extensifs et non dénués d'effets oncogéniques.

Finalement, cette analyse permettra, chez les patients atteints de cette maladie, d'évaluer la prédisposition génétique (gène *SDHB* surtout, mais aussi *SDHD*) présente dans 30 % [Rouaix-Emery *et al.*, 2014] des cas, voire 50 % des cas en présence de maladie métastatique [Jimenez *et al.*, 2013]. Les concentrations plasmatiques de la 3-MT libre s'élèvent jusqu'à plus de 90 fois (*SDHB*) et à plus de 70 fois (*SDHD*) les valeurs de référence en présence de Pgl avec ces mutations [Eisenhofer *et al.*, 2011b]. En plus des patients connus, les porteurs de cette mutation germinale favorisant l'apparition de telles tumeurs seront également suivis. Cela s'applique particulièrement dans les cas d'une mutation fondatrice (*SDHC*) qui prédispose à la maladie plusieurs membres de familles canadiennes-françaises [Dumas *et al.*, 2011].

5.1.3 Valeur thérapeutique : ne s'applique pas.

5.2 Validité clinique

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)		X	
Valeur prédictive négative (VPN)		X	
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC	X		
Exactitude	X		

Sensibilité et spécificité

La sensibilité et la spécificité cliniques de la 3-méthoxytyramine (3-MT) analysée par LC-MS/MS sont respectivement de 86 % et 96 % (voir le tableau 1).

Tableau 1 Sensibilité, spécificité, VPP et VPN

ÉTUDE	METHODE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	SENSIBILITÉ (%)	SPÉCIFICITÉ (%)
Peitzsch <i>et al.</i> , 2013	LC-MS/MS	63	86	96
Eisenhofer <i>et al.</i> , 2012	LC-ECD Valeur seuil à 0,2 nmol/l	-	57	85

Abréviations : LC-ECD : chromatographie liquide avec détection électrochimique; VPP : valeur prédictive positive; VPN : valeur prédictive négative.

Courbe ROC

Peitzsch et ses collaborateurs [2013] ont trouvé une aire sous la courbe (AUC) de 0,902 pour la 3-MT avec une valeur seuil à 0,41 nmol/l.

Eisenhofer et ses collaborateurs [2012] ont trouvé une AUC de 0,716 ($p < 0,0001$) pour la MT plasmatique libre alors que la AUC est de 0,547 ($p = 0,171$) pour la normétanéphrine (NMN). Ainsi, la 3-MT est un meilleur biomarqueur de malignité que la NMN. Par ailleurs, lorsque la 3-MT est comparée au diamètre de la tumeur comme prédicteur de présence de malignité, elle est presque comparable, avec une AUC de 0,739 ($p < 0,0001$) lorsque la valeur seuil est de 0,2 nmol/l comparativement à une AUC de 0,771 ($p < 0,0001$) pour le diamètre de la tumeur. Dans cette même étude, l'AUC indique que, parmi les 18 analytes de catécholamines analysés, la 3-MT est le biomarqueur le plus discriminant pour les patients avec ou sans métastases.

Exactitude

Dans l'étude de Peitzsch et ses collaborateurs [2013], la 3-MT permet de classifier correctement 86 % des patients selon la présence ou l'absence de métastases ($F = 12,04$, $p = 0,0097$).

Dans l'étude d'Eisenhofer et ses collaborateurs [2011a], la 3-MT classifie correctement : 53 % des MEN2⁵³ et NF1⁵⁴ *versus* VHL⁵⁵, SDHB⁵⁶ et SDHD⁵⁷ et 78 % VHL *versus* SDHB et SDHD. Or, lorsqu'on utilise une combinaison de tests (3-MT, NMN et MN⁵⁸), la classification correcte des patients est de près de 100 % des MEN2 et NF1 *versus* VHL, SDHB et SDHD et de 78 % VHL *versus* SDHB et SDHD.

Dans l'étude d'Eisenhofer et ses collaborateurs [2012], pour les tumeurs surrenales, la probabilité de métastases est < 10 % si la concentration de 3-MT est normale et de > 33 % si la concentration de 3-MT > 3 nmol/l. Pour les tumeurs extrasurrenales, la probabilité de malignité est > 70 % si la concentration de 3-MT est > 3 nmol/l.

5.3 Validité analytique (ou technique)

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité	X		
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice		X	
Concordance		X	
Corrélation entre test et comparateur	X		
Autres selon le type de test			X

Deux études de validation de la LC-MS/MS à doser la 3-méthoxytyramine (3-MT) ont été repérées [Peitzsch *et al.*, 2013; Peaston *et al.*, 2010].

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de la LC-MS/MS à détecter la 3-MT est représentée par les valeurs de limite de détection (LOD) et de limite inférieure de quantification (LLOQ) (voir le tableau 2). La LOD varie de 0,02 à 0,03 nmol/l alors que la LLOQ varie de 0,024 à 0,06 nmol/l.

Répétabilité et reproductibilité

Les valeurs du CV intraessai varient entre 2,9 % et 11,5 % alors que celles du CV interessai vont de 7,8 % à 12,9 % (voir le tableau 3).

53. MEN2 : néoplasie endocrinienne multiple type 2.

54. NF1 : neurofibromatose type 1.

55. VHL : von Hippel-Lindau.

56. SDHB : succinate dehydrogenase subunit B.

57. SDHD : succinate dehydrogenase subunit D.

58. NMN : normétanéphrine; MN : métanéphrine.

Tableau 2 Études de validation du dosage de la 3-méthoxytyramine par la LC-MS/MS

ÉTUDE	NOMBRE ET TYPE D'ÉCHANTILLONS	VOLUME (µl)*	ANALYSE PAR LC-MS/MS						
			MÉTHODE DE PRÉPARATION	CONTRÔLE INTERNE	IONISATION	LOD (nmol/l)	LLOQ (nmol/l)	LINÉARITÉ (nmol/l)	COEFFICIENT DE LINÉARITÉ
Peitzsch <i>et al.</i> , 2013	Plasma	-	EPS	3-MT-d ₄	ESI en mode MRM (positif)	0,02	0,024	2,5 – 50	r = 0,999
Peaston <i>et al.</i> , 2010	28 Plasma (3-MT libre)	- / 35	EPS online	3-MT-d ₄	ESI en mode MRM (positif)	0,03	0,06	0,1 – 23	r ² > 0,99

Abréviations : 3-MT : 3-méthoxytyramine; 3-MT-d₄ : 3-méthoxytyramine- $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ -D₄ (deutééré); EPS : extraction en phase solide; ESI : *electrospray ionization*; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LLOQ : limite inférieure de la quantification; LOD : limite de la détection; MRM : *multiple reaction monitoring*; nmol/l : nanomole par litre; µl : microlitre.

* Volume d'échantillon / volume d'aliquote injecté dans le système de HPLC

Tableau 3 Répétabilité et reproductibilité de la LC-MS/MS à doser la 3-méthoxytyramine

ÉTUDE	NOMBRE DE SPECIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (nmol/l)	INTRAESSAI CV (%)	INTERESSAI CV (%)
Peitzsch <i>et al.</i> , 2013	Intraessai : 12 Interessai : 40	0,102	5,6	11,4
		0,27	5,2	7,8
		3,23	2,9	8,9
Peaston <i>et al.</i> , 2010	20 répliqués	0,35	11,5	-
	20 répliqués	1,25	9,1	-
	20 répliqués	3,25	7,1	-
	20 essais	0,28	-	12,9
	20 essais	1,15	-	10,2
	20 essais	3,55	-	8,9

Abréviations : CV : coefficient de variation; nmol/l : nanomole par litre.

Spécificité analytique

Les valeurs de recouvrement de la 3-MT varient entre 66 % et 83 % [Peitzsch *et al.*, 2013] ou entre 88 % et 98 % [Peaston *et al.*, 2010]. Cependant, le nombre de spécimens et la concentration nominale relatifs à ces données ne sont pas mentionnés dans les publications. Aucune interférence n'a été observée.

Selon une étude, la métanéphrine ou la normétanéphrine peuvent induire de façon substantielle une réaction croisée ou une contamination dans le profil chromatographique de la 3-MT par LC-MS/MS avec extraction automatisée directe [Twentyman *et al.*, 2012]. Aucune autre étude n'en fait mention.

Corrélation entre le test et le comparateur

Seule l'étude de Peitzsch et ses collaborateurs [2013] a comparé la LC-MS/MS avec la LC-ECD sur 80 échantillons de plasma. Le coefficient de corrélation r est de 0,635 ($p < 0,0001$); il indique que les deux méthodes donnent des résultats moyennement similaires.

Concordance

Les concentrations plasmatiques de 3-MT sont de 26 % plus faibles lorsque mesurées par la LC-MS/MS que celles faites par la LC-ECD [Peitzsch *et al.*, 2013].

Données locales de validation technique

Les données de validation de méthode par le demandeur sont les suivantes : une linéarité dans le plasma de 0,048 à 24,55 nmol/l; une LOD de 0,012 nmol/l; une LOQ de 0,048 nmol/l; un CV intraessai de 3,7 % à 7,7 % ($n = 10$) et un CV interessai de 2,3 % à 13,8 % ($n = 13$) avec des concentrations de 0,15 nmol/l à 15 μ mol/l; une exactitude de 105,7 %, 100,1 % et 101,1 % (pour trois contrôles de qualité externe); une récupération de 93,2 % de la 3-MT et un effet de matrice moyen de 144,4 %.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Deux documents portant sur des recommandations pour la pratique clinique ont été repérés, mais aucun ne mentionne spécifiquement le dosage de la 3-MT. Le premier est un guide de pratique clinique de la Endocrine Society (États-Unis) [Lenders *et al.*, 2014] alors que le second est un regroupement de recommandations faites à la suite d'un symposium international sur le phéochromocytome [Pacak *et al.*, 2007].

Ces documents recommandent que les dosages des métanéphrines (normétanéphrine et métanéphrine) plasmatiques libres ou urinaires fractionnés soient faits en première ligne (comme analyse biochimique initiale) pour le diagnostic du Phéo et du Pgl. Aucune mention n'est toutefois faite pour la 3-MT. Des tests génétiques devront être considérés chez les patients ayant des mutations de lignée germinale [Pacak *et al.*, 2007]. Les patients avec Pgl devront faire l'objet de tests pour rechercher des mutations du succinate déshydrogénase (SDH), et ceux avec des maladies métastatiques pour rechercher des mutations *SDHB* [Lenders *et al.*, 2014]. Un suivi annuel à vie est suggéré pour détecter les maladies métastatiques ou récurrentes [Lenders *et al.*, 2014]. Or, le dosage de la 3-MT pourrait présenter un certain intérêt pour orienter les tests génétiques, quoiqu'il n'en soit aucunement fait mention dans ces documents.

Un document récent de Eunice Kennedy Shriver NICHD, NIH, recommande que le bilan initial du diagnostic de Phéo et de Pgl comprenne les métanéphrines et il indique que, pour les tumeurs dopamine dépendantes, le dosage de la 3-MT est préférable [Moraitis *et al.*,

2014].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

L'équipement nécessaire à l'analyse par LC-MS/MS est déjà présent dans la plupart des laboratoires. Le personnel qualifié pour cette analyse est à prévoir, s'il n'est pas déjà disponible.

6.2 Conséquences économiques d'une introduction dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

En plus des patients connus ayant la maladie, les individus porteurs de la mutation germinale pourraient éventuellement être suivis annuellement par un bilan comprenant la 3-MT, bien que cela comporte certains enjeux éthiques à considérer. Il est recommandé que ces patients puissent participer à la prise de décision relativement aux tests génétiques [Lenders *et al.*, 2014].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Cette analyse est complémentaire aux analyses existantes (catécholamines, métanéphrine, normétanéphrine urinaires ou plasmatiques) mesurant spécifiquement la 3-MT libre, un métabolite circulant de la dopamine. Cette mesure permet une détection de tous les Phéo et Pgl sécrétant la dopamine afin d'en assurer une meilleure prise en charge. Cette prise en charge inclut la détection précoce des tumeurs sécrétant de la dopamine, la surveillance postrésection chirurgicale de récurrence ou de métastases, mais surtout elle permet d'évaluer la prédisposition génétique présente dans 30 % des cas. Cela s'applique particulièrement pour une mutation fondatrice (*SDHC*) à laquelle sont prédisposés plusieurs membres de familles canadiennes-françaises.

7.2 Validité clinique

La sensibilité et la spécificité de l'analyse sont respectivement de 86 % et de 96 %. La 3-MT est un meilleur biomarqueur de malignité que la normétanéphrine. Lorsqu'elle est comparée au diamètre de la tumeur comme prédicteur de présence de malignité, elle est presque comparable. Par ailleurs, la 3-MT est le biomarqueur le plus discriminant pour les patients avec ou sans métastases. La 3-MT peut classer correctement (exactitude) 86 % des patients selon la présence ou l'absence de métastases, 53 % des *MENS2* et *NF1* versus *VHL*, *SDHB* et *SDHD* ainsi que 78 % *VHL* versus *SDHB* et *SDHD*. Lorsque la concentration de la 3-MT est > 3 nmol/l, la probabilité de métastases est de > 33 % pour les tumeurs surrenales alors que la probabilité de malignité est > 70 % pour les tumeurs extrasurrenales.

7.3 Validité analytique

L'analyse de la 3-MT par LC-MS/MS montre une sensibilité analytique très élevée (LLOQ $\geq 0,024$ nmol/l), des coefficients de variation < 12 % (précision) et < 13 % (reproductibilité) ainsi qu'un recouvrement entre 66 % et 98 % (spécificité analytique). Une seule étude

[Twentyman *et al.*, 2012] a mentionné une possibilité de réaction croisée induite par la métanéphrine ou la normétanéphrine lors de l'analyse. La LC-MS/MS donne des concentrations plasmatiques de 3-MT de 26 % inférieures à celles mesurées par la LC-ECD. Les données locales de validation technique montrent une variation < 8 % et < 14 % pour la répétabilité et la reproductibilité, respectivement. L'exactitude est de près de 100 % avec une récupération d'environ 93 % et un effet de matrice d'environ 144 %.

7.4 Recommandation d'autres organismes

Deux documents [Lenders *et al.*, 2014; Pacak *et al.*, 2007] portant sur des recommandations pour la pratique clinique ont été repérés, mais aucun ne mentionne précisément le dosage de la 3-méthoxytyramine. Or, celui-ci pourrait présenter un certain intérêt pour orienter les tests génétiques, quoique cela ne soit aucunement mentionné dans ces documents. Une recommandation récente [Moraitis *et al.*, 2014] souligne l'importance d'y ajouter le dosage plasmatique de la 3-MT libre pour les Pgl dépendants à la dopamine.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Dosage de la 3-méthoxytyramine plasmatique par LC-MS/MS

Statut de la technologie diagnostique :

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS :

- Avis de recommandation d'introduction conditionnelle à l'utilisation des codes déjà existants dans le *Répertoire pour les catécholamines* (30112 et 30113)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation supplémentaire :

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Ackermans MT et Endert E. LC-MS/MS in endocrinology: What is the profit of the last 5 years? *Bioanalysis* 2014;6(1):43-57.
- Adaway JE et Keevil BG. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;883-884:33-49.
- Darr R, Pamporaki C, Peitzsch M, Miehle K, Prejbisz A, Peczkowska M, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma using plasma-free normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine: Importance of supine sampling under fasting conditions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014;80(4):478-86.
- De Jong WH, Eisenhofer G, Post WJ, Muskiet FA, de Vries EG, Kema IP. Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: Implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(8):2841-9.
- Dumas N, Edmont M, Grunenwald S, Lévesque I, Binet M, Burnichon N, et al. Characterisation of genetics aspects of paragangliomas and pheochromocytomas in the Quebec French-Canadian population (résumé de communication présenté au 61^e congrès de l'American Society of Human Genetics tenu à Montréal en octobre 2011). Disponible à : <http://www.ichg2011.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=10669>.
- Eisenhofer G, Lenders JW, Siegert G, Bornstein SR, Friberg P, Milosevic D, et al. Plasma methoxytyramine: A novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *Eur J Cancer* 2012;48(11):1739-49.
- Eisenhofer G, Lenders JW, Timmers H, Mannelli M, Grebe SK, Hofbauer LC, et al. Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2011a;57(3):411-20.
- Eisenhofer G, Pacak K, Huynh TT, Qin N, Bratslavsky G, Linehan WM, et al. Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer* 2011b;18(1):97-111.
- Eisenhofer G, Goldstein DS, Sullivan P, Csako G, Brouwers FM, Lai EW, et al. Biochemical and clinical manifestations of dopamine-producing paragangliomas: Utility of plasma methoxytyramine. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(4):2068-75.
- Eisenhofer G, Goldstein DS, Stull R, Keiser HR, Sunderland T, Murphy DL, Kopin IJ. Simultaneous liquid-chromatographic determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, catecholamines, and 3,4-dihydroxyphenylalanine in plasma, and their responses to inhibition of monoamine oxidase. *Clin Chem* 1986;32(11):2030-3.
- Grebe SK et Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory – Where to from here? *Clin Biochem Rev* 2011;32(1):5-31.
- Jimenez C, Rohren E, Habra MA, Rich T, Jimenez P, Ayala-Ramirez M, Baudin E. Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Curr Oncol Rep* 2013;15(4):356-71.

- Koch CA, Rodbard JS, Brouwers FM, Eisenhofer G, Pacak K. Hypotension in a woman with a metastatic dopamine-secreting carotid body tumor. *Endocr Pract* 2003;9(4):310-4.
- Lefebvre S, Borson-Chazot F, Boutry-Kryza N, Wion N, Schillo F, Peix JL, et al. Screening of mutations in genes that predispose to hereditary paragangliomas and pheochromocytomas. *Horm Metab Res* 2012;44(5):334-8.
- Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):1915-42.
- Lenders JW, Willemsen JJ, Eisenhofer G, Ross HA, Pacak K, Timmers HJ, Sweep CG. Is supine rest necessary before blood sampling for plasma metanephrines? *Clin Chem* 2007;53(2):352-4.
- Leung KS et Fong BM. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: Has its time come? *Anal Bioanal Chem* 2014;406(9-10):2289-301.
- Moraitis AG, Martucci VL, Pacak K. Genetics, diagnosis, and management of medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma/paraganglioma. *Endocr Pract* 2014;20(2):176-87.
- Pacak K. Pheochromocytoma: A catecholamine and oxidative stress disorder. *Endocr Regul* 2011;45(2):65-90.
- Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, Bornstein SR, Gimenez-Roqueplo AP, Grossman AB, et al. Pheochromocytoma: Recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3(2):92-102.
- Peaston RT, Graham KS, Chambers E, van der Molen JC, Ball S. Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chim Acta* 2010;411(7-8):546-52.
- Peitzsch M, Prejbisz A, Kroiss M, Beuschlein F, Arlt W, Januszewicz A, et al. Analysis of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Utility for diagnosis of dopamine-producing metastatic pheochromocytoma. *Ann Clin Biochem* 2013;50(Pt 2):147-55.
- Pillai D et Callen S. Pilot quality assurance programme for plasma metanephrines. *Ann Clin Biochem* 2010;47(Pt 2):137-42.
- Rouaix-Emery N, Tierny-Fontalirand C, Cardot-Bauters C, Carnaille B, Wemeau JL, d'Herbomez M. Le diagnostic biologique de phéochromocytome en 2014. *Ann Biol Clin (Paris)* 2014;72(1):7-13.
- Twentyman JM, Cradic KW, Singh RJ, Grebe SK. Ionic cross talk can lead to overestimation of 3-methoxytyramine during quantification of metanephrines by mass spectrometry. *Clin Chem* 2012;58(7):1156-8.
- Van Berkel A, Lenders JW, Timmers HJ. Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Endocrinol* 2014;170(3):R109-19.
- Van Duinen N, Corssmit EP, de Jong WH, Brookman D, Kema IP, Romijn JA. Plasma levels of free metanephrines and 3-methoxytyramine indicate a higher number of biochemically active HNPGL than 24-h urinary excretion rates of catecholamines and metabolites. *Eur J Endocrinol* 2013;169(3):377-82.

RECHERCHE DE MUTATIONS CIBLÉES DANS LES TUMEURS CÉRÉBRALES PÉDIATRIQUES (K27M ET G34V/R DANS H3.3, K27M DANS H3.1 ET V600E DANS BRAF) (RÉFÉRENCE – 2014.02. 04)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1. **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2. **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 21 janvier 2014
(modification reçue le 1^{er} mai 2014)
- 1.3. **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 9 juin 2014
- 1.4. **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Amplification des régions ciblées au moyen de la PCR, suivie d'une analyse moléculaire de la séquence des amplicons par la méthode de Sanger.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'analyse est réalisée sur l'ADN tumoral extrait de tissu congelé ou préservé dans la paraffine. Trois amplifications par réaction en chaîne de la polymérase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) sont réalisées afin d'amplifier les régions spécifiques contenant les trois mutations (mutations K27M et G34V/R dans les histones H3.3 et H3.1 et mutation V600E dans BRAF). Les amplicons sont ensuite séquencés par la méthode de Sanger.

2.3 **Société ou développeur** : protocole fourni par le demandeur.

2.4 **Licence** : ne s'applique pas.

2.5 **Brevet, le cas échéant** : ne s'applique pas.

2.6 **Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)** : ne s'applique pas.

2.7 **Valeur pondérée** : 196,27

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Enfants atteints d'une tumeur cérébrale avec composante gliale (gliome).

3.2 Description de la maladie visée

Concernant les nouveaux cas de cancer chez les enfants et les jeunes de 0 à 19 ans des deux sexes, les plus récentes statistiques canadiennes sur l'incidence du cancer montrent que le système nerveux central (SNC) représente le deuxième site le plus touché. En effet, parmi les 4 550 nouveaux cas de cancer pédiatrique prévus pour les 5 prochaines années, 860 impliquent le SNC (19 %), derrière les leucémies (n = 1 465; 32 %) [SCC, 2014, p. 113]. Les tumeurs cérébrales primaires sont complexes et hétérogènes. La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de 2007 est reconnue comme un standard international relativement au typage et à la stadification des tumeurs gliales et autres tumeurs cérébrales [Louis *et al.*, 2007]⁵⁹. Le tableau 1 présente quelques données épidémiologiques concernant les gliomes et autres tumeurs cérébrales pédiatriques. Le demandeur vise plus particulièrement quatre types tumoraux, soit l'astrocytome pilocytique grade I (APC), le xanthoastrocytome pléomorphe grade II (XAP), le gangliogliome de grade I (GG) et le glioblastome grade IV (GBM). Ces types tumoraux sont décrits plus en détail aux paragraphes suivants.

Tableau 1 Tumeurs cérébrales pédiatriques primaires avec composante gliale (0-19 ans)

HISTOLOGIE	GRADE ¹	RÉPARTITION ²	INCIDENCE ^{2,3}	SURVIE RELATIVE À 10 ANS ⁴
Astrocytome pilocytique	I	15,5 %	0,82	96,0 %
Astrocytome diffus	II	5,2 %	0,27	80,4 %
Astrocytome anaplastique	III	1,6 %	0,09	26,5 %
Astrocytomes autres (dont le XAP II)	I-III	1,9 %	0,1	70 % (XAP)
Glioblastome	IV	2,7 %	0,14	12,6 %
Oligodendrogliome	II	1,1 %	0,06	90,1 %
Oligodendrogliome anaplastique	III	0,2 %	0,01	-
Tumeurs oligoastrocytome	II-III	0,7 %	0,04	76,1 %
Épendymome et autres	I-III	5,3 %	0,28	64,9 %
Gliomes malins non classés	III-IV	11,5 %	0,61	57,0 %

59. Le système de gradation de l'OMS attribue aux tumeurs à évolution lente « un bas grade », soit I ou II selon leur caractère circonscrit ou non. Les tumeurs de grade I sont circonscrites et elles ont un meilleur pronostic que celles de grade II dont les limites imprécises rendent souvent l'exérèse chirurgicale complète difficile. Les tumeurs de « haut grade » sont caractérisées par une croissance rapide, soit au sein de foyers anaplasiques apparaissant dans une tumeur de bas grade (grade III), soit dans une grande partie ou dans l'ensemble de la masse tumorale (grade IV). Les signes de croissance rapide sont très importants (forte densité cellulaire, index mitotique élevé et anaplasie ou moindre différenciation cellulaire). La nécrose et la néovascularisation sont souvent observées dans les tumeurs de grade IV, mais il s'agit de signes inconstants et infidèles de la croissance rapide [adapté de l'*Atlas interactif de neuro-oncologie*, Association des neuro-oncologues d'expression française, disponible à : <http://anocef.org/atlas/fr/index.html>].

HISTOLOGIE	GRADE ¹	RÉPARTITION ²	INCIDENCE ^{2,3}	SURVIE RELATIVE À 10 ANS ⁴
Neuronale/gliale (dont le GG)	I-III	6,9 %	0,36	72,4 %

Abréviations : GG : gangliogliome; XAP : xanthoastrocytome pléomorphe.

1. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [Louis *et al.*, 2007].
2. Données tirées du rapport statistique du CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*), 2006-2010. La répartition est rapportée à propos de toutes les tumeurs cérébrales pédiatriques (N = 21 512) et non uniquement les gliomes (N = 11 305 cas) [Ostrom *et al.*, 2013].
3. Taux d'incidence annuel par 100 000 personnes ajusté pour l'âge [Ostrom *et al.*, 2013].
4. La survie relative se définit comme le ratio de la survie observée d'un groupe de personnes atteintes d'un cancer et la survie prévue pour l'ensemble de la population présumée exempte du cancer à l'étude et qui présente les mêmes caractéristiques (sexe, âge, secteur de résidence, etc.)⁶⁰.

Astrocytome pilocytique (APC - grade I)

L'APC est un gliome essentiellement pédiatrique dont les sites préférentiels sont le cervelet (67 %), l'hypothalamus et la voie optique. La tumeur est bien circonscrite, sa croissance est lente et sa progression vers un stade malin est rare. La majorité des cas peuvent être traités, même guéris, uniquement par l'exérèse chirurgicale complète [Fernandez *et al.*, 2003]. Le pronostic est bon avec une survie globale à 10 ans de 96 % [Ohgaki et Kleihues, 2005]. L'histologie classique montre deux composantes distinctes : une fasciculaire faite de cellules piloïdes et une autre, microkystique, faite de cellules au noyau arrondi. La présence de fibres de Rosenthal et de corps granuleux éosinophiles est caractéristique [Louis *et al.*, 2007]. On trouve souvent des cellules d'apparence maligne qui peuvent parfois s'étendre à une bonne partie de la tumeur, compliquant ainsi le diagnostic établi à partir de petits échantillons [Rodriguez *et al.*, 2013; Takei *et al.*, 2008].

Xanthoastrocytome pléomorphe (XAP - grade II)

Le XAP est une tumeur astrocytocytaire rare et la majorité (2/3) des personnes atteintes ont moins de 18 ans [Dias-Santagata *et al.*, 2011; Louis *et al.*, 2007]. La lésion est bien circonscrite et se situe au niveau du cortex cérébral superficiel au contact des méninges. La présence de corps granuleux éosinophiles et d'un mélange de cellules fusiformes et pléomorphes géantes est caractéristique des XAP [Rodriguez *et al.*, 2013; Louis *et al.*, 2007]. Le XAP peut être confondu avec un gliome malin en raison d'une cellularité plus grande et atypique [Rodriguez *et al.*, 2013]. Le risque de diagnostic erroné est accentué par la présence de réticuline extracellulaire et d'une infiltration lymphocytaire importante [Rodriguez *et al.*, 2013]. Le pronostic est relativement favorable avec une survie globale à 10 ans de 70 %. La chirurgie est le premier traitement, couplée à la surveillance radiologique. En cas de récurrence locale ou de la présence d'anaplasie observée à l'exérèse initiale, la radiochimiothérapie peut être utilisée. Le risque de récurrence à 5 ans est de 30 % [Dias-Santagata *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2010].

Gangliogliome (GG - grade I)

Le GG est une tumeur bénigne mixte gliale/neuronale qui représente 2,5 % des néoplasies cérébrales pédiatriques [Dunham, 2010]. Ce sont des tumeurs à croissance lente, bien différenciées, qui apparaissent surtout au lobe temporal [Ichimura *et al.*, 2012]. Les GG peuvent survenir à tout âge, mais de préférence chez les enfants et les jeunes adultes [Louis *et al.*, 2007]. L'histologie est très hétérogène en raison des deux types cellulaires concernés;

60. Statistique Canada. Statistiques sur la survie 2004 [site Web]. Disponible à : <http://www.statcan.gc.ca/pub/84-601-x/2004001/4067481-fra.htm>.

la tumeur peut parfois prendre l'apparence d'un oligodendrogliome (ODG), d'un astrocytome diffus ou d'un APC, ce qui contribue grandement à rendre le diagnostic différentiel difficile [Ichimura *et al.*, 2012; Dougherty *et al.*, 2010]. Bien que cette tumeur soit habituellement de bas grade, les caractéristiques de la composante gliale dictent le pronostic. Ce dernier est généralement bon avec une survie globale à 5 ans de 90 % pour les cas avec résection complète [Fedoul et Souirti, 2012]. La progression vers un stade malin est rare [Luyken *et al.*, 2004].

Glioblastome (GBM - grade IV) et autres gliomes malins (grades III-IV)

Le GBM est une tumeur cérébrale primaire maligne et agressive classée grade IV par l'OMS [Louis *et al.*, 2007]. Le GBM peut également se développer à partir d'un astrocytome de bas grade. Les critères histologiques des GBM incluent une haute activité mitotique, une prolifération microvasculaire et/ou des zones de nécrose, ce qui les rend impossibles à distinguer uniquement par l'histologie [Louis *et al.*, 2007]. Les GBM comptent pour 80 % des tumeurs pédiatriques du tronc cérébral et ils sont associés à un très mauvais pronostic : survie relative à 3 ans entre 5 et 10 % [Karajannis *et al.*, 2008]. L'exérèse chirurgicale complète de cette tumeur infiltrante est quasi impossible [Wilson *et al.*, 2014]. En 2005, Stupp et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation du témozolomide en combinaison avec la radiothérapie prolonge significativement la survie des patients atteints d'un GBM lorsque comparée à la survie du groupe traité avec radiothérapie seule (médiane de 14,6 vs 12,1 mois; $p < 0,001$) [Stupp *et al.*, 2005]. Actuellement, le protocole Stupp est le traitement standard du GBM, mais la recherche clinique dans ce domaine est très active [Wilson *et al.*, 2014].

3.3 Nombre de patients visés : 20 patients par année.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Neurochirurgie, neuropathologie, neuro-oncologie, pédiatrie, neuropédiatrie

3.5 Modalités d'administration du test

Le tissu tumoral est obtenu par le service de pathologie du centre demandeur pour les patients traités à l'interne ou par la réception des spécimens pour ceux venant d'autres CHU. L'Hôpital de Montréal pour enfants a manifesté le souhait d'envoyer leurs échantillons au CHU Sainte-Justine; l'analyse sera réalisée au laboratoire de diagnostic moléculaire de cet établissement⁶¹. Actuellement, les demandes d'exploration moléculaire sur des spécimens de tumeurs cérébrales pédiatriques sont envoyées à l'extérieur. Toutefois, selon les données du ministère de la Santé et des Services sociaux, aucune demande d'envoi hors Québec pour cette analyse n'a été reçue au cours des deux dernières années.

La recherche de ces mutations sera effectuée selon les algorithmes suggérés par le requérant, qui sont présentés en annexe (scénarios 1 et 2).

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : complémentaire

61. Lettre justificative datée du 1^{er} mai 2014 envoyée à l'intention de Mme Johanne Nicole et du Dr François Sanschagrin, Ph. D, de la Direction générale des services de santé et médecine universitaire (DGSSMU) du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) par le Dr Benjamin Ellezam, M.D., la Dre Sonia Cellot, M.D., Ph. D, et la Dre Virginie Dormoy-Raclet, Ph. D, du CHU Sainte-Justine. L'information a été intégrée au présent avis de l'INESSS le 30 juin 2014.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Bien que l'évaluation clinique du patient et les résultats de l'imagerie médicale puissent fortement suggérer la présence d'un gliome malin, l'étalon or concernant le diagnostic des tumeurs cérébrales repose sur l'évaluation de l'aspect microscopique d'une biopsie tumorale [Ichimura *et al.*, 2012]. L'analyse histopathologique de l'organisation tissulaire et de la morphologie cellulaire permet généralement de préciser le diagnostic et d'évaluer l'évolution de la maladie (pronostic). Toutefois, malgré des caractéristiques distinctives, plusieurs études ont démontré une faible reproductibilité des méthodes et une grande variation interobservateur relativement à la classification et à la gradation des gliomes, spécialement ceux de grades II et III [Brat *et al.*, 2008]. En effet, les astrocytomes et oligodendrogliomes sont des tumeurs connues pour présenter, dans des cas non classiques, un certain chevauchement de leurs caractéristiques. De même, la distinction entre un astrocytome pilocytique ou un xanthoastrocytome pléomorphe et un gliome malin infiltrant (grades III ou IV) peut occasionnellement représenter un défi important pour le pathologiste étant donné que le pronostic et l'approche thérapeutique associés à ces entités sont différents [Appin et Brat, 2014].

Des tests complémentaires tels que l'immunohistochimie et les analyses en génétique moléculaire peuvent aider à préciser le diagnostic en plus de contribuer à une meilleure estimation du pronostic et de la valeur prédictive de la réponse aux traitements. Les techniques habituellement utilisées pour mettre en évidence des délétions ou des amplifications géniques sont la FISH, la perte d'hétérozygotie (LOH) et l'hybridation génomique comparative. Les mutations associées à certains gènes, utilisés comme marqueurs moléculaires, sont davantage testées en panel et non plus une à la fois [Appin et Brat, 2014].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les demandeurs proposent d'évaluer simultanément le statut de trois marqueurs moléculaires différents, soit les mutations V600E du gène *BRAF*, K27M du gène *HIST1H3B* (H3.1), et K27M, G34V/R du gène *H3F3A* (H3.3). Cette analyse sera utilisée comme outil diagnostique, pronostique et prédictif sur des biopsies de gliomes pédiatriques de bas ou de haut grade dont les résultats histopathologiques sont équivoques. Le tableau 2 présente plus en détail les avantages recherchés.

Tableau 2 Marqueurs moléculaires visés par la présente demande et avantages associés⁶²

GÈNE	MUTATION	AVANTAGE	AUTRES RENSEIGNEMENTS
<i>BRAF</i>	V600E	Prédictif de réponse au vémurafénib dans les cas avec gliome récidivant	XAP grade II, 50-65 % des cas GG grade I, 20-75 % des cas AP grade I, < 10 % des cas GBM grade IV, 6 % des cas
		Pronostic de récurrence GG	
<i>H3F3A</i> <i>HIST1H3B</i>	K27M G34V/R	Diagnostic différentiel GBM	GBM grade IV, 30 % des cas
		Pronostic de l'agressivité GBM	

Abréviations : AP : astrocytome pilocytique; GBM : glioblastome; GG : gangliogliome; XAP : xanthoastrocytome pléomorphe.

62. Lettre justificative datée du 1^{er} mai 2014 envoyée à l'intention de Mme Johanne Nicole et du Dr François Sanschagrin, Ph. D, de la Direction générale des services de santé et médecine universitaire (DGSSMU) du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) par le Dr Benjamin Ellezam, M.D., la Dre Sonia Cellot, M.D., Ph.D, et la Dre Virginie Dormoy-Raclet, Ph. D, du CHU Sainte-Justine. L'information a été intégrée au présent avis de l'INESSS le 7 juillet 2014.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été évalué.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence et validité clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : non

5.1.2 Valeur diagnostique et pronostique

Indépendamment de la méthode employée pour déterminer le statut *BRAF* V600E, H3.3 K27M ou G34V/R et H3.1 K27M, plusieurs études de cohortes rétrospectives visant à évaluer leur fréquence parmi différents types de tumeurs cérébrales ont été recensées. Les tableaux 3 et 4 présentent un résumé des études ayant évalué la valeur diagnostique respective de ces marqueurs, alors que le tableau 5 présente la valeur pronostique de *BRAF* V600E.

La mutation *BRAF* V600E (tableau 3) est quelquefois observée dans les tumeurs APC, mais elle est davantage associée aux GG pédiatriques I (20-25 %) et aux XAP II-III (60-80 %), autant chez les enfants que chez les adultes [Dias-Santagata *et al.*, 2011; Schindler *et al.*, 2011; Dougherty *et al.*, 2010]. La mutation *BRAF* V600E a également été associée aux APC grade I situés à l'extérieur du cervelet, ce qui constitue une caractéristique importante compte tenu de la fréquence élevée de localisation au cervelet de ce type de tumeur [Schindler *et al.*, 2011]. Deux séries de cas suggèrent également que la mutation V600E serait fréquemment rencontrée (environ 50 % des cas) en association avec un sous-type histologique rare de GBM, soit le variant épithéloïde [Broniscer *et al.*, 2014; Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2013]. Bien que non significatif en raison du faible nombre de cas étudiés, un meilleur pronostic de survie globale a également été constaté [Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2013]. En termes de valeur pronostique associée à la mutation *BRAF* V600E dans les cas de gliomes pédiatriques de bas grade, une seule étude démontre une tendance (sans toutefois être significative) entre la présence du marqueur et une survie sans progression réduite HR = 2,4 [IC à 95 % : 0,9-6,2]; p = 0,07 [Horbinski *et al.*, 2012]. Myung et ses collaborateurs [2012] ont étudié par séquençage direct les valeurs diagnostique et prédictive de survie sans progression de *BRAF* V600E auprès de 51 cas de GG I, 45 d'APC I et 12 d'XAP II d'âge inconnu. Trente-six tumeurs étaient positives quant à la mutation, dont 66,7 % des XAP, 23,5 % des GG et 15,6 % des APC. Aucune corrélation n'a été établie entre la présence du marqueur et la survie sans progression. Dahiya et ses collaborateurs [2013] ont démontré par immunohistochimie une association positive significative (p = 0,04) entre la présence du marqueur et une survie sans récurrence écourtée parmi les cas de GG I pédiatriques positifs à l'évaluation (18 positifs/47 évalués).

Concernant la valeur diagnostique des mutations K27M et G34R/V (tableau 4) du gène des histones H3.3 (*H3F3A*), le criblage d'une grande cohorte de 784 patients de tous âges atteints de gliomes d'histologie et de grade différents a montré que ces mutations sont des marqueurs diagnostiques spécifiques aux GBM : 10,5 % contre 0,5 % pour les non GBM (p < 0,0001) et, de surcroît, aux GBM pédiatriques : 36 % contre 3 % pour les GBM adultes (p < 0,0001) [Schwartzentruber *et al.*, 2012]. De plus, trois études [Saratsis *et al.*, 2014; Khuong-Quang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012] démontrent que ces mutations, de même que K27M du gène *HIST1H3B* (H3.1), sont davantage associées au sous-type histologique DIPG, *diffuse intrinsic pontine glioma*, un GBM pédiatrique du tronc cérébral très agressif : > 70 % contre ≈ 20 % pour les GBM de localisation autre. Khuong-Quang et ses collaborateurs

[2012] ont également démontré que les DIPG de statut H3.3 muté sont associés à une survie globale significativement diminuée comparativement à ceux de type sauvage : médianes de survie = 0,7 ans ± 0,5 contre 4,6 ans ± 5,6; $p < 0,001$ et rapport de risques instantanés (HR) = 4,3 [IC à 95 % : 1,3-14,5]; $p = 0,019$.

Tableau 3 Valeur diagnostique de BRAF V600E

ÉTUDE	TUMEURS VISÉES	COHORTE	HISTOLOGIE (N)	BRAF V600E +		VALEUR DIAGNOSTIQUE
				MÉTHODE	N (%)	
Broniscer <i>et al.</i> , 2014	GBM	N = 6 7,6 ans [3,5-11]	Épith. (6)	Sanger	3 (50)	Marqueur de tumeur GBM épithéloïde?
Kleinschmidt-DeMasters <i>et al.</i> , 2013	Sous types de GBM	N = 24 (4 < 18 ans) 29 ans [4-67]	Rhabdoïde (2) Épith. (13) CG (9)	Sanger	0 7 (54) 0	Marqueur de tumeur GBM épithéloïde?
Horbinski <i>et al.</i> , 2012	Gliomes de bas grade	N = 198 7,6 ans [0-19]	APC (143) GG (27) XAP (6) Autres (22)	RT-PCR + Sanger	10/110 (9) 5/22 (23) 2/5 (40) 2/20 (10)	Gliomes de bas grade non APC vs APC (19,1 % vs 7,3 %; $p = 0,23$).
Myung <i>et al.</i> , 2012	Tumeurs cérébrales	N = 223 ?	APC (45) XAP (12) GG (51) Autres (115)	Sanger	7 (16) 8 (67) 12 (24) 9 (8)	Fréquence ↑ : XAP, GG et APC vs autres (52,8 % vs 7,8 %; $p?$). GG III vs I (11,1 % vs 26,2 %; $p = NS$).
Dias-Santagata <i>et al.</i> , 2011	XAP et GBM	N = 26 XAP 29 ans [7-87] N = 71 GBM ?	XAP (20) XAP III (6) GBM (71)	SNaPshot PCR	12 (60) 1 (17) 2 (3)	XAP V600E et patron de croissance de type mésenchymal ($p = 0,028$)
Schindler <i>et al.</i> , 2011	Tumeurs cérébrales	N = 1320 (487 < 18 ans)	APC (75) XAP (26) XAP III (10) GG (25) Autres (351)	Sanger	7 (9) 18 (69) 10 (100) 4 (16) 4 (1)	Fréquence ↑ : XAP, GG et APC. APC V600E localisé à l'extérieur du cervelet (20 % vs 2 %; $p = 0,009$).
Dougherty <i>et al.</i> , 2010	Mixtes gliale et neuronale	N = 33 11 ans [0-36]	GG (18) TA/TR (3) XAP (4) Autres (8)	Sanger	9 (53) 3 (100) 1 (25) 1 (13)	Fréquence ↑ : tumeurs mixtes, gliale et neuronale, de bas grade
MacConaill <i>et al.</i> , 2009	Gliomes	N = 155 (127 < 18 ans)	GG (14) G I-II (108) GNShg (5)	Spectre de masse OncoMap	8 (57) 13 (12) 1 (20)	Prévalence ↑ : GG vs autres gliomes de bas grade ($p = 0,00005$)

Abréviations : APC : astrocytome pilocytique; CG : cellules géantes; Épith : épithéloïde; GBM glioblastome; GG : gangliogliome; G I-II : gliomes de bas grade, GNShg : gliome de haut grade non spécifié; N : nombre; NS : non significatif; PSQ : pyroséquençage; TA/TR : tératoïde atypique/tumeur rhabdoïde; XAP : xanthoastrocytome pléomorphe.

Tableau 4 Valeur diagnostique des mutations K27M ou G34R/V des gènes d'histones

ÉTUDE	COHORTE	HISTOLOGIE (N)	MÉTHODE	H3.3 N(%)		H3.1 N(%)	VALEUR DIAGNOSTIQUE
				K27M	G34R/V	K27M	
Saratsis <i>et al.</i> , 2014	N = 31 8 ans [0,5-25]	DIPG (14) GBM IV (4) AA III (4) Autres (9)	Sanger	8/13 (62) 2/4 (50) 0 0	S.O.	2/5 (40) 1/2 (50) 0 0	K27M H3.3 ou H3.1 DIPG : 77 %
Venneti <i>et al.</i> , 2013	N = 20 Âge médian 141 mois	GBM (20)	Sanger	6 (30)	0	S.O.	6 cas avec marquage faible ou absent en immunohistochimie (H3.3 K27 triméthylée)
Broniscer <i>et al.</i> , 2014	N = 6 7,6 ans [3,5-11]	GBM Épithélioïde (6)	Sanger	1 (17)	0	0	S.O.
Gielen <i>et al.</i> , 2013	N = 338 163 gliomes de haut grade 9,5 ans [0-18]	GBM IV (129) AA III (28) OAA III (6) ODG/OA/ADII (12) Gliales non diffuses (65) Autres (81)	PSQ	35 (27) 5 (18) 0 0 0 0	7 (5,5) 0 1/6 ? ? ?	S.O.	K27M (GBM) : SN 27,1 % et SP 87,5 % K27M (AA + GBM) : SN 25,5 % et SP 100 %
Schwartzentruber <i>et al.</i> , 2012	N = 159 gliomes pédiatriques et 625 adultes	GBM IV (90) AA III (11) ODA/OAA III (7) Gliomes bas grade (51)	Sanger	32 (36) 2 (18) 0 0		S.O.	H3.3 muté GBM vs non GBM 10,5 % vs 0,5 %; p < 0,0001 GBM pédiatriques vs adultes 36 % vs 3 %; p < 0,0001
Wu <i>et al.</i> , 2012	N = 86 7 ans [0,8-23]	DIPG (50) GBM non Tronc (36)	Sanger	30 (60) 7 (19)	0 5 (14)	9 (18) 1 (3)	K27M H3.3 ou H3.1 (DIPG vs GBM autres) : 78 % vs 22 %
Khuong-Quang <i>et al.</i> , 2012	N = 42 7 ans [0-17]	DIPG (42)	Sanger	30 (71)	0	0/29	K27M H3.3 (DIPG vs GBM) : 71 % vs 14 %; p < 0,00001

Abréviations : AA : astrocytome anaplastique; AD : astrocytome diffus; DIPG : *diffuse intrinsic pontine glioma*; GBM glioblastome; N : nombre; S.O. : sans objet; OA : oligoastrocytome; OAA : oligoastrocytome anaplastique; ODA : oligodendrogliome anaplastique; ODG : oligodendriogliome; PSQ : pyroséquençage.

Tableau 5 Valeur pronostique de *BRAF* V600E

ÉTUDE	TUMEURS	<i>BRAF</i> N (%)	TRAITEMENTS N (%)	DONNÉES RELATIVES AU SUIVI ET À L'ÉTAT DU PATIENT	VALEUR PRONOSTIQUE
Kleinschmidt-DeMasters <i>et al.</i> , 2013	N = 24 GBM 30 ans [4-69]		Pas de données		GBM cellules géantes = survie globale améliorée? Aucune référence selon le statut de <i>BRAF</i>
	2 rhabdoïde	0		DM : 2(100) 22 et 36 sem.	
	13 épithéloïde	WT 6 (46) V600E 7 (54)		DM + VM ≈ 80 sem. [≥ 26-453] DM + VM ≈ 26 sem. [≤ 26-328]	
	9 à cellules géantes	0		DM 4/9 ≈ 62 sem. [47-72] VM 5/9 ≈ 234 sem. [234-598]	
Horbinski <i>et al.</i> , 2012	N = 198 gliomes de bas grade 7,6 ans [0-19]	WT 179 (90) V600E 19 (10)	CX : 113 (57) RT : 27 (14) CT : 21 (11)	Données disponibles 160 (81) Suivi médian : 6,3 ans Maladie en progression : 50 (31) DM : 9 (6)	V600E tend vers un risque plus élevé de progression vs WT : RRI = 2,5 [IC à 95 % :0,9-6,6]; p = 0,07
Myung <i>et al.</i> , 2012	N = 45 APC 14,4 ans [0-54]	V600E 7 (16)	Pas de données	Pas de données	Aucune
	N = 12 XAP 27,7 ans [6-49]	V600E 8 (67)		1 cas avec récurrence 7 ans postchirurgie initiale	Aucune
	N = 51 GG 25 ans [1-64]	V600E 12 (24)		8 cas avec récurrence, tous WT, délai inconnu	V600E non récurrence vs récurrence 28 % vs 0 %; p = NS SSP : V600E vs WT : p = NS
	N = 115 gliomes Âge inconnu	V600E 9 (8)		Pas de données	Aucune

Abréviations : CT : chimiothérapie; CX : exérèse chirurgicale complète; DM : décédé de la maladie; GBM glioblastome; GG : gangliogliome; RRI : rapport de risques instantanés (*hazard ratio*); N : nombre; NS : non significatif; RT : radiothérapie; SSP : survie sans progression; VM? : vivant avec une maladie dont le stade est inconnu; VMP : vivant avec une maladie en progression; WT : *wild type*; XAP : xanthoastrocytome pléomorphe.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Les demandeurs proposent d'utiliser le marqueur moléculaire *BRAF* V600E comme facteur prédictif de réponse au vémurafénib (Zelboraf^{MC}, Roche). Le vémurafénib, un inhibiteur sélectif de la kinase *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma B (BRAF)* possédant une mutation V600, empêche l'activation de la voie MEK-ERK, ce qui a comme conséquence l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et la stimulation de l'apoptose. Le vémurafénib s'administre par voie orale. Il est présentement indiqué en monothérapie dans le traitement de première intention du mélanome non résecable ou métastatique à mutation *BRAF* V600⁶³. Un autre inhibiteur *BRAF* a été inscrit sur les listes de médicaments en février 2014, soit le dabrafénib (Tafinlar^{MC}, GSK), sensiblement pour les mêmes indications.

Relativement au traitement d'un gliome pédiatrique de bas ou de haut grade, primaire ou récurrent, le vémurafénib n'est pas un médicament reconnu, ni par la RAMQ, ni par Santé Canada⁶⁴, ni par la FDA⁶⁵.

Dans quelques cas de tumeurs cérébrales, majoritairement pédiatriques et positives pour la mutation *BRAF* V600E, les patients ont reçu le vémurafénib en traitement hors indication, en autorisation nominative temporaire ou encore par l'intermédiaire d'un programme d'accès spécialisé. Les cas répertoriés par la revue de la littérature sont présentés au tableau 6. Brièvement, 10 enfants ont reçu le vémurafénib en raison d'une tumeur gliale récidivante ou réfractaire aux chimiothérapies standards (4 XAP, 3 GG, 1 astrocytome pilomyxoïde, 1 astrocytome anaplastique et 1 GBM épithéloïde). Considérant la meilleure issue enregistrée, une régression partielle (n = 5) ou complète (n = 1) de la maladie suivie d'une période de survie sans progression a été expérimentée pour 6 patients traités. Pour les 8 cas ayant vu leur maladie se stabiliser, une survie sans progression variant entre 2 et 35 mois a été enregistrée. Deux patients n'ont pas répondu au traitement. Dans la plupart des cas, le médicament a été bien toléré; seuls deux incidents majeurs ont été répertoriés, dont un ayant causé la mort. Pour les autres, des toxicités d'ordre cutané de grades 1 et 2 ont été répertoriées telles qu'un rash et (ou) de la phototoxicité [Skrypek *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2014; Bautista *et al.*, 2014; Rush *et al.*, 2013 et Chamberlain *et al.*, 2013].

De plus, un essai clinique multicentrique est présentement en cours, portant sur l'évaluation de l'innocuité et la pharmacocinétique du vémurafénib chez des enfants avec gliome récurrent ou réfractaire de statut *BRAF* V600E⁶⁶.

63. Extrait de l'Avis au ministre sur Zelboraf, évaluation publiée sur le site Web de l'INESSS le 2 juin 2014, disponible à :

<http://www.inesss.qc.ca/activites/evaluation-des-medicaments/evaluation-des-medicaments/extrait-davis-au-ministre/zelboraf-2.html>.

64. Monographie du Zelboraf^{MC} consultable en accédant à la Base de données sur les produits pharmaceutiques (BDPP) de Santé Canada, disponible à : <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/databasdon/index-fra.php>.

65. Monographie du Zelboraf^{MC} consultable en accédant à la base de données des médicaments approuvés par la FDA, Drugs@FDA, disponible à : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.

66. ClinicalTrials.gov [site Web]. Vemurafenib in children with recurrent/refractory BRAFV600E-mutant gliomas. Disponible à : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01748149>.

Tableau 6 Valeur prédictive de réponse au vémurafénib de gliomes *BRAF* V600E

ÉTUDE	CAS	TRAITEMENTS			TOXICITÉ DU VÉMURAFÉNIB
		CHIRURGIE	RT/CT (SUIVI, ISSUE)	VÉMURAFÉNIB (DURÉE, ISSUE)	
Skrypek <i>et al.</i> , 2014	M, 23 mois APM voie optique	Partielle	3 lignes CT (< 3 ans, toxicité/MP)	+ Vinblastine (8 mois, RP + MS) pause (2-3 semaines, MP) + Vinblastine (12 mois, RP + MS) Seul (15 mois, MS)	Pas de toxicité associée
Robinson <i>et al.</i> , 2014	M, 9 ans GBM épithéloïde Frontal-pariétal	Partielle	RT + 1 ligne CT (3 ans, récurrence)	Seul (19 mois, RC + MS)	Rash sévère au début. Rash léger, sauf si exposition au soleil. Alopecie partielle et madarose
Bautista <i>et al.</i> , 2014	M, 6 ans GG III thalamique	4 partielles	2 lignes RT/CT (2 mois, MP), immunothérapie (1 mois, MP)	Seul (4 mois, MS) Retiré par décision des parents pour immunothérapie Seul (3 mois, RP + MP + décès)	Transaminases élevées, bilirubinémie et créatinémie grade 2, phototoxicité grade 1 et apparence de naevus
	F, 18 mois GG III pédonculaire	2 partielles	4 lignes CT (1 an, MP)	Seul (8 mois, RP) Seul avec dose augmentée (12 mois, MS)	Érythème grade 2 et apparence de naevus
	F, 9 ans Astrocytome III Site inconnu	Complète ?	RT + 3 lignes CT (2 ans, toxicité/MP)	Seul (2 semaines, toxicité)	Hémorragie intracrânienne grade 5
Rush <i>et al.</i> , 2013	F, 13 ans GG du tronc cérébral	Partielle	RT (6 mois, MP), surveillance (14 mois, MP)	+ Vinblastine (1 mois, RP) et Réduction de dose (1 mois, RP)	Arthralgie, kératose pilaris et tégangiectasie faciale. Réduction de dose = kératose légère
Chamberlain, 2013	4 XAP récurrents 2M/2F 45 ans [34-53]	Complète 2 Partielle 1 Sans 1	RT + 2-3 lignes CT (? mois, MP)	Seul (5 mois [2-10]) Issue à 2 mois : MP (1 cas), MS (2 cas), RP (1 cas). Tous décédés : 8 mois [4-14]	Grade 2 : arthralgie, fatigue, nausées et photosensibilité. Aucune toxicité grade 3.

Abréviations : APM : astrocytome pilomyxoïde; CT : chimiothérapie; F : féminin; GBM glioblastome; GG : gangliogliome; M : masculin; MP : maladie en progression; MS : maladie stable; RC : réponse complète; RP : réponse partielle; RT : radiothérapie; XAP : xanthoastrocytome pléomorphe.

Nous avons consulté les statistiques de la RAMQ concernant le nombre de patients ayant reçu le vémurafénib en 2012-2013. Pour cette période donnée, 9 l'ont reçu à titre de patient d'exception et 34 comme médicament d'exception. Les 43 cas étaient tous âgés de 35 ans ou plus et ils ont tous reçu un diagnostic de mélanome. De plus, six d'entre eux ont également reçu un diagnostic de tumeur cérébrale, mais à une date postérieure ou en même temps que le diagnostic de mélanome. C'est donc dire, selon les données répertoriées par la RAMQ, qu'aucun cas de tumeur cérébrale pédiatrique primaire n'a été traité avec le vémurafénib en 2012-2013.

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)			X
Valeur prédictive négative (VPN)			X
Rapport de vraisemblance (LR)			X
Courbe ROC			X
Exactitude			X

5.3 Validité analytique (ou technique)

Le demandeur mentionnait dans sa lettre justificative adressée au MSSS que l'analyse proposée était en cours de validation. Toutefois, les récentes communications établies avec celui-ci ont permis de confirmer que la validation était terminée⁶⁷. Brièvement, le laboratoire demandeur a choisi des amorces spécifiques pour chaque gène où les régions entourant les mutations recherchées devaient être amplifiées. Il a extrait l'ADN de tumeurs fixées en bloc de paraffine et réalisé la PCR. Chaque produit d'amplification a ensuite été séquencé. Le laboratoire a d'abord testé sa technique sur des échantillons normaux et, lorsque celle-ci a été au point, la validation a été réalisée sur trois échantillons présentant une mutation clairement démontrée par un laboratoire de recherche au Montreal Children's Hospital. Au total, le laboratoire demandeur a utilisé 23 échantillons lors de la validation, dont 3 présentaient une mutation. Le demandeur rapporte avoir été capable de détecter ces mutations sans aucune difficulté. Le processus de développement a suivi celui recommandé par des organisations professionnelles internationales comme le Canadian College of Medical Geneticists (CCMG).

La révision de la littérature publiée n'a pas permis de repérer d'études de validation analytique spécifiques aux conditions d'utilisation proposées par le demandeur.

67. Communication électronique personnelle avec le Dr Benjamin Ellezam, neuropathologiste au CHU Sainte-Justine (4 septembre 2014).

Ziai et Hui, dans un article publié dans une revue en 2012 sur l'utilité clinique du statut *BRAF*, mentionnent que, pour les besoins diagnostiques, plus de 95 % des mutations cliniquement significatives sont couvertes par l'analyse moléculaire de l'exon 15 du gène, et plus particulièrement la position V600 [Ziai et Hui, 2012]. En pratique clinique, la grande majorité des techniques d'évaluation disponibles reposent sur l'amplification PCR, et n'importe quel type de tissu ou de spécimen biopsique peut être utilisé si l'amplicon PCR désigné est suffisamment court [Ziai et Hui, 2012]. De plus, la mise en évidence de mutations dans *BRAF* sur un spécimen biopsique (par exemple par une aspiration à l'aiguille) demande une sensibilité analytique accrue car la population cellulaire visée pourrait être minoritaire comparativement à celle des cellules non transformées [Adeniran *et al.*, 2011]. Toutefois, les techniques communes au laboratoire comme le PCR-Sanger, l'amplification spécifique d'allèles, les courbes de dénaturation et le PCR en temps réel possèdent la sensibilité et la spécificité analytiques pour tester des échantillons de tissu de très petite taille [Hay *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2007]. Il a été démontré que le pyroséquençage est capable de détecter la mutation *BRAF* V600E dans des échantillons de tissu dont les rapports alléliques entre allèles type mutant et type sauvage étaient beaucoup plus faibles (1:50) comparativement au séquençage traditionnel de type Sanger (1:5), bien que ce dernier soit considérablement plus rapide et moins coûteux [Tan *et al.*, 2008; Spittle *et al.*, 2007]. Parmi les études répertoriées, quelques-unes ont fourni des données concernant l'évaluation indirecte de la sensibilité analytique de V600E. Les données concernant l'échec du test sont résumées au tableau 7. Aucune étude de validité analytique n'a été répertoriée concernant les mutations des gènes des histones (H3.1 et H3.3).

Tableau 7 Sensibilité analytique PCR + Sanger *BRAF* V600E

ÉTUDE	NOMBRE ET HISTOLOGIE	MANQUE DE TISSU	ÉCHEC DU TEST
Horbinski <i>et al.</i> , 2012	198 gliomes de bas grade	18	23/180 (13 %)
Schindler <i>et al.</i> , 2011	1384 tumeurs cérébrales	64 (5 %)	
Dougherty <i>et al.</i> , 2010	33 gliomes de bas grade	2 (6 %)	0

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		x	
Reproductibilité		x	
Sensibilité analytique	x		
Spécificité analytique		x	
Effet de matrice		x	
Concordance		x	
Corrélation entre test et comparateur		x	

5.4 Recommandations d'autres organismes

Dans son guide sur les cancers du système nerveux central, le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [2014] ne formule aucune recommandation concernant l'évaluation des mutations visées par le présent avis.

Le *Registre des tests génétiques*⁶⁸ mentionne un seul laboratoire américain (Cancer Genetics Children's Hospital of Philadelphia) approuvé par le CLIA relativement à la détection de *BRAF* V600E sur des biopsies de gliomes malins. Concernant les analyses moléculaires de *HIST1H3B*(H3.1), et K27M, G34V/R du gène *H3F3A* (H3.3), aucun laboratoire offrant le test n'a été repéré.

Le répertoire des analyses de laboratoire de l'hôpital SickKids de Toronto n'inclut pas les analyses moléculaires visées dans la présente analyse⁶⁹.

6. RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

N'a pas été évalué.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été évaluées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

En ce qui concerne la valeur prédictive de la réponse au vémurafénib associée au statut *BRAF* V600E, le médicament n'est pas indiqué pour le traitement des tumeurs cérébrales primaires et il n'est pas utilisé au Québec hors protocole de recherche. De plus, le profil toxicologique du médicament est encore mal connu quant à ses effets chez les enfants.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Le laboratoire requérant propose d'effectuer la recherche de la mutation *BRAF* V600E parmi les gliomes pédiatriques récidivants étant donné qu'il existe sur le marché un médicament qui cible directement cette mutation : le vémurafénib. En effet, la mutation est fréquemment reconnue dans certains types tumoraux de bas grade, tels que les astrocytomes pilocytiques, les xanthoastrocytomes pléomorphiques et les gangliogliomes, et dont le diagnostic histologique est parfois facile à confondre avec certains types de tumeurs de haut grade. Le requérant propose également de tester la présence des mutations spécifiques K27M et G34V/R des gènes des histones *H3F3A* et *HIST1H3B* afin de distinguer plusieurs sous-types histologiques de glioblastomes et ainsi en prédire l'agressivité clinique.

68. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Genetic Testing Registry (GTR) [site Web]. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>.

69. SickKids. Test Catalogue [site Web]. Disponible à : <http://www.sickkids.ca/paediatriclabmedicinems/test-catalogue/lab-services.html>.

7.2 Validité clinique

Concernant la valeur prédictive de la réponse au vémurafénib, seulement 10 cas de gliomes pédiatriques traités avec la molécule ont été répertoriés. Toutefois, ces données fragmentaires montrent que le traitement peut être utilisé en dernier recours pour les cas réfractaires aux chimiothérapies de même qu'en traitement de maintien pour les personnes qui tolèrent bien la molécule. Deux cas de toxicité sévère ont été repérés, dont un fatal. Le risque de récurrence est significativement augmenté chez les GG positifs pour V600E tel que démontré par immunohistochimie. Myung et ses collaborateurs [2012] ont publié des données qui abondent dans le même sens sans toutefois être statistiquement significatives en raison du faible nombre de cas. Concernant les mutations touchant les gènes des histones, les études répertoriées montrent qu'il s'agit d'un marqueur spécifique aux glioblastomes pédiatriques, et plus précisément des sous-types histologiques, avec un pronostic très défavorable comme dans le cas des tumeurs du tronc cérébral (DIPG).

7.3 Validité analytique

Très peu de données concernant la performance analytique ont été répertoriées. La faible quantité de tissu tumoral disponible dans certains échantillons biopsiques et la présence possible de tissus sains renforcent le besoin de recourir à une technique sensible. Le séquençage par la méthode de Sanger semble répondre à ces exigences.

7.4 Recommandations d'autres organismes : n'ont pas été repérées.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Recherche de mutations ciblées dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (K27M et G34V/R dans H3.3, K27M dans H3.1 et V600E dans *BRAF*)

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation* lorsqu'on aura obtenu :
 - Une démonstration de la corrélation clinicopathologique.
 - Une justification de la valeur ajoutée du fait de rechercher ces mutations ensemble.
 - Des précisions concernant l'accessibilité à la thérapie ciblée.

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

*Considérant que la détection de la mutation V600E *BRAF* est déjà dans le répertoire (code 60034)

RÉFÉRENCES

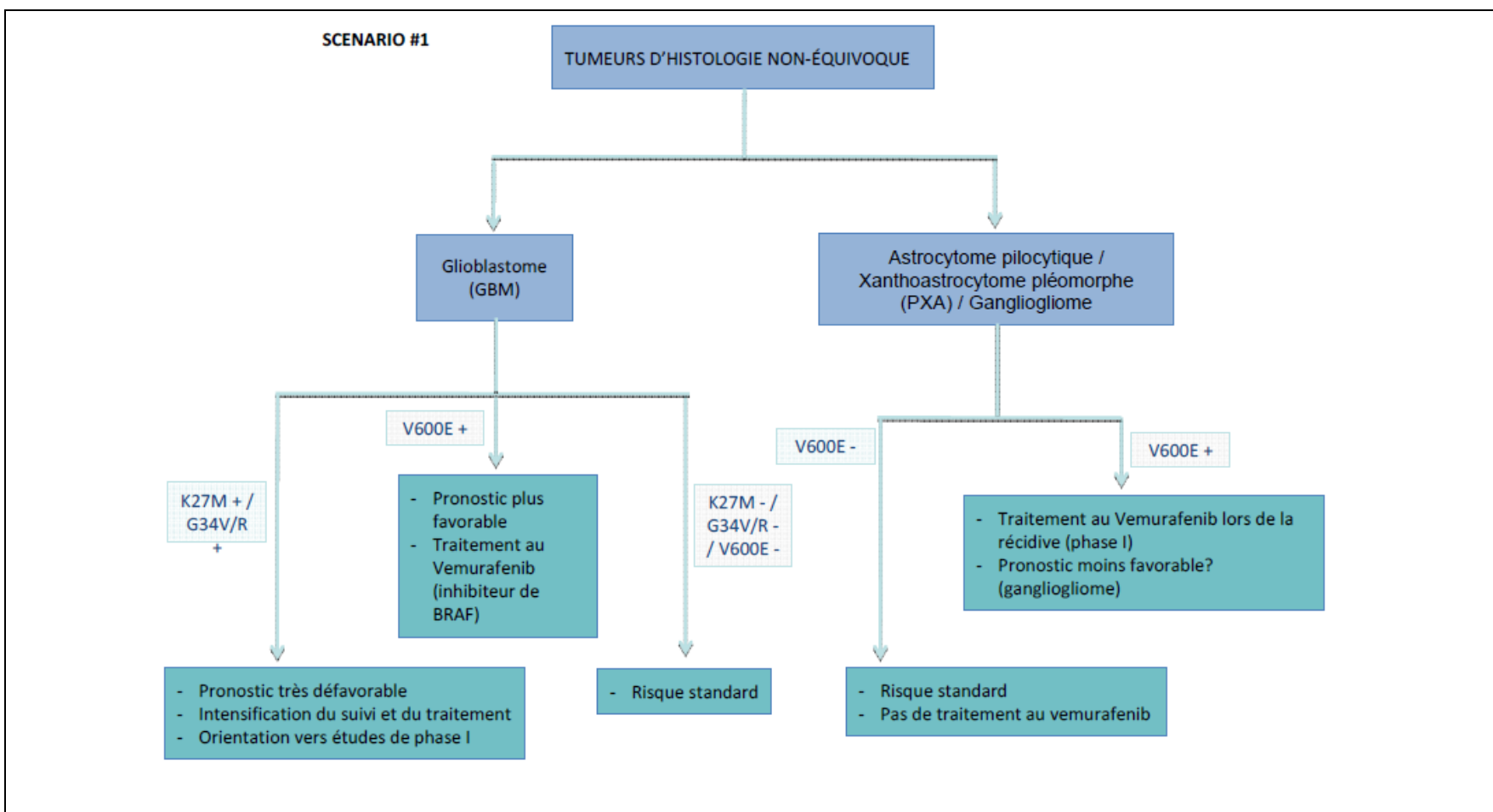
- Adeniran AJ, Theoharis C, Hui P, Prasad ML, Hammers L, Carling T, et al. Reflex BRAF testing in thyroid fine-needle aspiration biopsy with equivocal and positive interpretation: A prospective study. *Thyroid* 2011;21(7):717-23.
- Appin CL et Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J* 2014;20(1):66-72.
- Bautista F, Paci A, Minard-Colin V, Dufour C, Grill J, Lacroix L, et al. Vemurafenib in pediatric patients with BRAFV600E mutated high-grade gliomas. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(6):1101-3.
- Brat DJ, Prayson RA, Ryken TC, Olson JJ. Diagnosis of malignant glioma: Role of neuropathology. *J Neurooncol* 2008;89(3):287-311.
- Broniscer A, Tatevossian RG, Sabin ND, Klimo P Jr, Dalton J, Lee R, et al. Clinical, radiological, histological and molecular characteristics of paediatric epithelioid glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40(3):327-36.
- Chamberlain MC. Salvage therapy with BRAF inhibitors for recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma: A retrospective case series. *J Neurooncol* 2013;114(2):237-40.
- Dahiya S, Haydon DH, Alvarado D, Gurnett CA, Gutmann DH, Leonard JR. BRAF(V600E) mutation is a negative prognosticator in pediatric ganglioglioma. *Acta Neuropathol* 2013;125(6):901-10.
- Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, Vena N, Lennerz JK, Borger DR, et al. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: Diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One* 2011;6(3):e17948.
- Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma C, Resnick AC, Sievert AJ, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2010;12(7):621-30.
- Dunham C. Pediatric brain tumors: A histologic and genetic update on commonly encountered entities. *Semin Diagn Pathol* 2010;27(3):147-59.
- Fedoul B et Souirti Z. Cerebellar ganglioglioma. *Pan Afr Med J* 2012;12:12.
- Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Paz Paredes A, Lena G. Pilocytic astrocytomas in children: Prognostic factors—A retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 2003;53(3):544-55.
- Gielen GH, Gessi M, Hammes J, Kramm CM, Waha A, Pietsch T. H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: A marker for diffuse high-grade astrocytomas. *Am J Clin Pathol* 2013;139(3):345-9.
- Hay R, MacRae E, Barber D, Khalil M, Demetrick DJ. BRAF mutations in melanocytic lesions and papillary thyroid carcinoma samples identified using melting curve analysis of polymerase chain reaction products. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(9):1361-7.
- Horbinski C, Nikiforova MN, Hagenkord JM, Hamilton RL, Pollack IF. Interplay among BRAF, p16, p53, and MIB1 in pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2012;14(6):777-89.

- Ichimura K, Nishikawa R, Matsutani M. Molecular markers in pediatric neuro-oncology. *Neuro Oncol* 2012;14(Suppl 4):iv90-9.
- Karajannis M, Allen JC, Newcomb EW. Treatment of pediatric brain tumors. *J Cell Physiol* 2008;217(3):584-9.
- Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012;124(3):439-47.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, Birks DK, Foreman NK. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *Am J Surg Pathol* 2013;37(5):685-98.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2):97-109.
- Luyken C, Blumcke I, Fimmers R, Urbach H, Wiestler OD, Schramm J. Supratentorial gangliogliomas: Histopathologic grading and tumor recurrence in 184 patients with a median follow-up of 8 years. *Cancer* 2004;101(1):146-55.
- MacConaill LE, Campbell CD, Kehoe SM, Bass AJ, Hatton C, Niu L, et al. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples. *PLoS One* 2009;4(11):e7887.
- Myung JK, Cho H, Park CK, Kim SK, Lee SH, Park SH. Analysis of the BRAF(V600E) mutation in central nervous system tumors. *Transl Oncol* 2012;5(6):430-6.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Central nervous system cancers. Version 2.2014. Fort Washington, PA : NCCN; 2014. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- Ohgaki H et Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(6):479-89.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013;15(Suppl 2):ii1-56.
- Rao AA, Laack NN, Giannini C, Wetmore C. Pleomorphic xanthoastrocytoma in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55(2):290-4.
- Robinson GW, Orr BA, Gajjar A. Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. *BMC Cancer* 2014;14:258.
- Rodriguez FJ, Lim KS, Bowers D, Eberhart CG. Pathological and molecular advances in pediatric low-grade astrocytoma. *Annu Rev Pathol* 2013;8:361-79.
- Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Detection of BRAF V600E activating mutation in papillary thyroid carcinoma using PCR with allele-specific fluorescent probe melting curve analysis. *J Clin Pathol* 2007;60(11):1211-5.
- Rush S, Foreman N, Liu A. Brainstem ganglioglioma successfully treated with vemurafenib. *J Clin Oncol* 2013;31(10):e159-60.

- Saratsis AM, Kambhampati M, Snyder K, Yadavilli S, Devaney JM, Harmon B, et al. Comparative multidimensional molecular analyses of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma reveals distinct molecular subtypes. *Acta Neuropathol* 2014;127(6):881-95.
- Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011;121(3):397-405.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012;482(7384):226-31.
- Skrypek M, Foreman N, Guillaume D, Moertel C. Pilomyxoid astrocytoma treated successfully with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(11):2099-100.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2014. Toronto, ON : SCC; 2014. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2014-FR.pdf>.
- Spittle C, Ward MR, Nathanson KL, Gimotty PA, Rappaport E, Brose MS, et al. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. *J Mol Diagn* 2007;9(4):464-71.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-96.
- Takei H, Yogeswaren ST, Wong KK, Mehta V, Chintagumpala M, Dauser RC, et al. Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival. *J Neurooncol* 2008;86(2):183-90.
- Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, et al. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 2008;40(3):295-8.
- Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, Martinez D, Huse JT, Heguy A, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol* 2013;23(5):558-64.
- Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* 2014;5:64.
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012;44(3):251-3.
- Ziai J et Hui P. BRAF mutation testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12(2):127-38.

ANNEXE A

Algorithme diagnostic



SCENARIO #2

TUMEURS D'HISTOLOGIE ÉQUIVOQUE

Glioblastome (GBM) vs Astrocytome
pilocytique vs Xanthoastrocytome
pléomorphe (A-PXA) vs Tumeur glio-
neuronale indifférenciée

K27M / G34V/R
/ V600E ?

V600E +

K27M + /
G34V/R
+

- Diagnostic : GBM

- Diagnostic demeure
équivoque
- Traitement au
Vemurafenib

K27M - /
G34V/R -
/ V600E -

- Diagnostic équivoque

DOSAGE DU LINÉZOLIDE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC-DAD) (RÉFÉRENCE – 2014.02.06)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1. **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2. **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 25 avril 2013
- 1.3. **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 10 juillet 2014
- 1.4. **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD⁷⁰).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) permet la séparation et la détection des molécules de linézolide et l'obtention d'un profil chromatographique unique dont les résultats sont quantitatifs [Belal *et al.*, 2013; Cios *et al.*, 2013].

La technique se subdivise principalement en trois étapes :

- la préparation de l'échantillon (déprotéinisation) (PP);
- la chromatographie liquide à haute performance (HPLC);
- la détection en ultraviolet avec un détecteur à barrette de diodes (DAD).

Dans la littérature, différentes méthodes analytiques sont décrites pour quantifier le linézolide dans le sérum ou le plasma en effectuant une déprotéinisation : HPLC – UV [Baietto *et al.*, 2013; Cios *et al.*, 2013; Helmy, 2013; Cattaneo *et al.*, 2010; Polillo *et al.*, 2010; Baietto *et al.*, 2009; Swoboda *et al.*, 2007]; HPLC – DAD [Cios *et al.*, 2013], LC-MS/MS [Zander *et al.*, 2014]; et dans le plasma : UPLC - PDA ou HPLC - PDA [Baietto *et al.*, 2013]; [Fortuna *et al.*, 2013; Cattaneo *et al.*, 2010].

2.3 Société ou développeur : méthode maison

70. HPLC-DAD : *high performance liquid chromatography with diode array detection.*

- 2.4 **Licence** : ne s'applique pas.
- 2.5 **Brevet, le cas échéant** : ne s'applique pas.
- 2.6 **Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)** : ne s'applique pas.
- 2.7 **Valeur pondérée** : 72,52

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Patients atteints d'une infection à bactéries Gram positif résistantes aux antibiotiques usuels ou d'une infection à mycobactéries, traités avec le linézolide, qui sont à risque d'avoir une variabilité importante de la pharmacocinétique du produit, par exemple ceux atteints de fibrose kystique du pancréas ou d'infections invasives. Il s'agit, entre autres, des nouveau-nés hospitalisés (néonatalogie) [Li *et al.*, 2013; Rasigade *et al.*, 2013] et des enfants et des jeunes jusqu'à 18 ans.

3.2 Description de la maladie visée

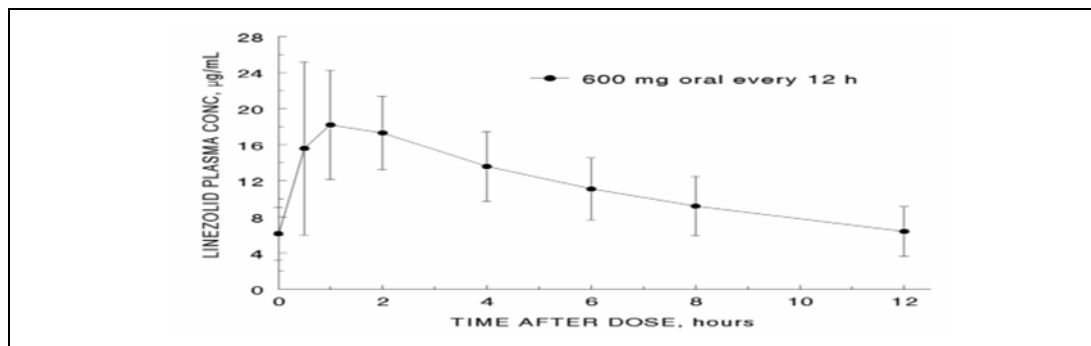
Le linézolide est un antibiotique de la classe des oxazolidones, actif contre des bactéries Gram positif résistantes aux antibiotiques usuels comme le *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline* (SARM) ou l'*entérocoque résistant à la vancomycine* (ERV) et les mycobactéries. Il est inactif contre les bactéries Gram négatif. Au Québec, il est inclus dans la liste à titre de médicament d'exception.

La problématique particulière relative à l'usage de cet antibiotique prescrit pour des conditions spécifiques, c'est la grande variabilité de la concentration plasmatique qui va de doses sous-optimales inefficaces à des doses toxiques, surtout sur le plan hématologique [Cattaneo *et al.*, 2013b] en raison de : 1) l'administration concomitante avec d'autres médicaments; 2) la condition médicale du patient; 3) la voie d'administration.

Pharmacocinétique

Les valeurs moyennes des paramètres pharmacocinétiques du linézolide après l'administration à des adultes de doses orales et intraveineuses uniques ou multiples sont résumées dans la monographie du ZYVOXAM^{MC}. Les concentrations plasmatiques minimales et maximales moyennes à l'état d'équilibre après l'administration orale de 400 ou de 600 mg de linézolide toutes les 12 heures sont rapportées dans la monographie de produit (C_{\min} : 3,08 et 6,15 ug/mL, respectivement, et C_{\max} : 11,0 et 21,2 ug/mL; figure 1). Ces résultats indiquent que, avec de tels schémas posologiques, les C_{\min} sont près ou au-dessus des concentrations minimales inhibitrices (CMI_{90}) plus élevées (4 ug/mL) établies pour les microorganismes ciblés.

Figure 1 Concentrations plasmatiques du linézolide à l'état d'équilibre après 600 mg aux 12 heures chez 16 adultes (moyenne plus ou moins écart-type)



Source : Pfizer Canada inc. Monographie de ZYVOXAM. Date de révision : 4 décembre 2013. Disponible à : http://www.pfizer.ca/fr/our_products/products/monograph/143.

3.3 Nombre de patients visés

Le nombre d'analyses attendues au Québec pour les trois prochaines années est estimé par le requérant à environ 100 ou 200. Celui-ci n'a pas spécifié s'il s'agit d'enfants exclusivement. À titre d'information, les statistiques de la Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ) montrent que 28 patients de moins de 17 ans en 5 ans (de 2009 à 2013) ont pris du linézolide (73 prescriptions) sous la couverture du régime public d'assurance médicaments (RPAM).

Cela n'inclut pas ceux bénéficiant d'une assurance privée ni ceux hospitalisés, qu'il s'agisse d'enfants ou d'adultes.

Populations particulières (enfants et jeunes⁷¹)

Il existe actuellement peu de données sur la pharmacocinétique du linézolide après l'administration de doses multiples à des enfants de tous âges. On ne possède pas suffisamment de données portant sur l'innocuité et l'efficacité du linézolide chez les enfants et les adolescents de < 18 ans. Il faudra effectuer d'autres études pour énoncer des recommandations posologiques sûres et efficaces. Les études pharmacocinétiques indiquent que, après l'administration de doses uniques ou multiples à des enfants, la clairance du linézolide était plus grande chez les enfants que chez les adultes, mais qu'elle diminuait avec l'âge. Chez les enfants d'une semaine à < 12 ans, l'administration quotidienne de 10 mg/kg toutes les 8 heures a donné des expositions proches de celles atteintes avec une posologie de 600 mg 2 fois par jour chez les adultes.

Chez les nouveau-nés de la naissance à 1 semaine, la clairance systémique du linézolide augmente rapidement durant la première semaine de vie. Par conséquent, si on administre quotidiennement 10 mg/kg aux 8 heures à des nouveau-nés, l'exposition systémique sera la plus importante le premier jour après la naissance. Chez les adolescents (de ≥ 12 à < 18 ans), les données pharmacocinétiques sont semblables à celles observées chez les adultes après l'administration d'une dose de 600 mg.

71. Pfizer Canada inc. Monographie de ZYVOXAM. Date de révision : 4 décembre 2013. Disponible à : http://www.pfizer.ca/fr/our_products/products/monograph/143.

Autres populations

Le suivi thérapeutique du linézolide pourrait s'appliquer à d'autres populations. À titre indicatif, le linézolide peut être utilisé chez des patients diabétiques avec infection des tissus mous [Eslam *et al.*, 2014], des patients en orthopédie qui développent des infections bactériennes résistantes [Joel *et al.*, 2014] et chez des patients atteints de tuberculose [Garcia-Prats *et al.*, 2014], pour n'en citer que quelques-unes.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Biochimie médicale, pédiatrie, hématologie, infectiologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Selon l'information transmise par le demandeur, à moins d'avis contraire, les prélèvements sanguins devront être faits à l'état d'équilibre, soit au moins de 20 à 40 heures après le début du linézolide [Cattaneo *et al.*, 2013b]. Le temps de réponse est de 24 à 72 heures (1 à 3 jours ouvrables). Cette analyse est réalisée selon les besoins cliniques. Plusieurs mesures de la concentration plasmatique peuvent être prises dans le temps chez un même patient, car la détermination de l'aire sous la courbe (ASC) sur 24 heures est le meilleur paramètre prédictif de l'efficacité du linézolide [Pea *et al.*, 2012; Dryden, 2011; Alffenaar *et al.*, 2010; Andes *et al.*, 2002].

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Analyse unique pour le monitoring de l'antibiothérapie.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Tel que mentionné préalablement, l'analyse mesure les concentrations plasmatiques de linézolide en utilisant une technique de chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection en ultraviolet avec un détecteur à barrette de diodes. Les solutions de travail sont préparées extemporanément à partir de la forme injectable commerciale du médicament. L'analyse ne repose pas sur des réactifs de trousse homologués par Santé Canada, mais sur des réactifs analytiques certifiés. Les résultats sont colligés selon une procédure reconnue par Agrément Canada. Une technique semblable a été adaptée par Cios et ses collaborateurs [2013] et elle est utilisée chez des patients à l'unité des soins intensifs afin de déterminer les concentrations sériques de linézolide pour établir les profils pharmacocinétiques.

D'autres technologies ont été décrites et seront utilisées lors de l'évaluation de la validité clinique et analytique. Ce sont les suivantes :

- chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) [Szultka *et al.*, 2013];
- chromatographie liquide par ultraperformance couplée à un détecteur à barrette de diodes (UPLC-PDA) [Baietto *et al.*, 2013];
- spectrofluorimétrie [Belal *et al.*, 2013];

- électrophorèse capillaire [Hernandez *et al.*, 1999]; la chromatographie liquide par haute performance (HPLC) couplée à la fluorescence capillaire a aussi été citée [Szultka *et al.*, 2013; Cavazos-Rocha *et al.*, 2007].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les avantages de retenir la « déprotéinisation » ou « technique par précipitation des protéines » est de favoriser la mise au point d'une méthode de dosage facilement utilisable de façon routinière. Cette méthode permet d'obtenir un excellent recouvrement (près de 100 %) et la procédure est simple et rapide [Cios *et al.*, 2013].

Un des avantages de la chromatographie liquide par haute performance (HPLC) avec détection UV est que cette méthode demeure sensible malgré l'utilisation de faibles volumes d'échantillons plasmatiques [Traunmuller *et al.*, 2010], et ce, même si la LC-MS/MS demeure la méthode de choix à cause de la sélectivité qu'elle offre [Zander *et al.*, 2014].

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : cette analyse ne remplace aucun autre test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique : ne s'applique pas.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Le suivi thérapeutique pharmacologique du linézolide est fait par le dosage du linézolide dans le plasma ou le sérum.

La littérature fait état d'une efficacité thérapeutique si le rapport aire sous la courbe (ASC_{0-24h}) des concentrations plasmatiques de linézolide/concentration minimale inhibitrice (CMI) est supérieur à 80 et d'une toxicité possible s'il est supérieur à 300. L'intervalle thérapeutique est de 1 à 30 ug/mL [Szultka *et al.*, 2013]. Une concentration résiduelle de plus de 10 ug/mL peut être associée à une toxicité hématologique [Zoller *et al.*, 2014; Pea *et al.*, 2010]. La thrombocytopénie est un effet secondaire commun du linézolide [Boak *et al.*, 2014].

L'utilité d'un suivi thérapeutique pharmacologique pour l'antibiotique linézolide par différentes méthodes de dosage, dont celle par HPLC avec détection par barrette de diodes [Baietto *et al.*, 2013; Cios *et al.*, 2013; Fortuna *et al.*, 2013], a été étudiée par plusieurs auteurs. Le suivi thérapeutique pharmacologique est en étroite relation avec la pharmacocinétique du médicament. Des études rétrospectives [Dong *et al.*, 2014; Pea *et al.*, 2012; Pea *et al.*, 2010] ont documenté une association significative entre les concentrations plasmatiques du linézolide et la toxicité du médicament. Toutefois, la limite supérieure sécuritaire du linézolide n'a pu être définie avec certitude.

L'étude rétrospective de Pea et ses collaborateurs réalisée en 2010 propose une dose fixe de linézolide de 600 mg aux 12 heures afin d'assurer une exposition pharmacodynamique adéquate dans 60 à 70 % des cas. En revanche, pour les autres 30 à 40 % de cas, un suivi thérapeutique pharmacologique permettra d'éviter l'échec du traitement ou la toxicité médicamenteuse associée à la dose.

Une étude prospective observationnelle a été réalisée pour comparer les concentrations

plasmatiques minimales chez des patients ayant développé ou non une toxicité hématologique [Cattaneo *et al.*, 2013b]. Le tableau 1, tiré de cet article de référence, indique les concentrations plasmatiques de linézolide chez 50 patients selon qu'ils ont développé ou non une toxicité hématologique. Les neuf patients qui ont manifesté un effet toxique avaient tous des valeurs de C_{\min} significativement supérieures durant la première semaine de traitement de même qu'après la fin du traitement au linézolide.

Tableau 1 Concentrations plasmatiques minimales (C_{\min}) de linézolide mesurées chez des patients ayant développé ou non une toxicité hématologique

		JOUR DU PRÉLÈVEMENT	C_{\min} LINÉZOLIDE mg/L (moyenne \pm écart-type)
Patients avec toxicité (n = 9)	1 ^{re} évaluation	3	9,0 \pm 6,4
	2 ^e évaluation	9	10,7 \pm 5,3
	3 ^e évaluation	12 ^a	10,7 \pm 5,8
	4 ^e évaluation (n = 5) ^b	16	4,0 \pm 1,4
Patients sans toxicité (n = 41)	1 ^{re} évaluation	3	4,9 \pm 3,7
	2 ^e évaluation	10	4,8 \pm 3,3
	3 ^e évaluation	15	5,0 \pm 1,9
	4 ^e évaluation	24	4,9 \pm 4,6

Source : Cattaneo *et al.*, 2010.

a. Durée moyenne de traitement au linézolide jusqu'au développement d'une toxicité hématologique.

b. Quatre patients se sont retirés de l'étude après l'apparition d'effets secondaires alors que cinq ont reçu un dosage réduit.

Tous les patients (n = 9) ayant développé une toxicité hématologique associée au linézolide avaient des valeurs de C_{\min} plus élevées pendant la première semaine de traitement (9,0 \pm 6,4 mg/L versus 4,9 \pm 3,7 mg/L; $p < 0,01$). L'association entre les concentrations plasmatiques de linézolide et la toxicité hématologique permet de conclure que le suivi thérapeutique pharmacologique peut améliorer la sécurité des patients recevant un traitement au linézolide.

Dans une étude de suivi thérapeutique pharmacologique de Pea et ses collaborateurs [2012] avec ou sans cotraitement à la rifampicine, des ajustements posologiques se sont révélés nécessaires chez 40 % des patients (n = 35) dans le groupe recevant le linézolide seul après un traitement médian de 21,5 jours. La thrombocytopénie est apparue chez 51,4 % des cas dans le groupe recevant le linézolide seul comparativement à 0 % dans le groupe recevant le linézolide avec la rifampicine. Les 35 patients du groupe « linézolide » avaient des C_{\min} et des ASC_{24} (médianes et écarts interquartiles : EIQ) significativement plus élevés [C_{\min} : 3,71 mg/L (1,43-6,38) versus 1,37 mg/L (0,67-2,55); $p < 0,001$] ou [ASC_{24} : 212,77 mg/L·h (166,67 – 278,42) versus 123,33 mg/L·h (97,36 – 187,94); $p < 0,001$].

Le maintien en fonction du temps d'une C_{\min} entre 2 et 7 mg/L et/ou d'une ASC_{24} entre 160 et 300 mg/L·h améliorerait la sécurité du traitement tout en offrant une efficacité adéquate chez les patients adultes recevant un traitement prolongé au linézolide.

Ces données suggèrent une relation de cause à effet entre de hautes concentrations de linézolide et les effets indésirables.

En 2010, Alffenaar et ses collaborateurs ont vérifié si une réduction de la posologie du linézolide donnait des concentrations sériques excédant un ratio $ASC_{24}/CMI > 100$. Cette étude prospective a évalué deux dosages de linézolide, soit 300 mg BID pendant 3 jours consécutifs suivis par 600 mg BID, chez des patients résistants aux traitements usuels pour la tuberculose. Des échantillons sanguins ont été pris à intervalles définis chez huit patients afin de mesurer les concentrations sériques du linézolide par LC-MS/MS. Dans cette étude, le rapport ASC_{24}/CMI est utilisé comme modèle afin de prédire l'efficacité. Les effets indésirables du linézolide, y inclus la neuropathie périphérique, ont été évalués cliniquement et par des mesures de laboratoire.

La durée moyenne du traitement était de 56 jours. Le tableau suivant présente différents ratios de l' ASC_{24}/CMI du linézolide pour des doses de linézolide de 300 et 600 mg deux fois par jour.

Tableau 2 Rapports ASC_{24}/CMI pour des doses de linézolide de 300 et 600 mg administrées aux 12 heures

Patient CMI_{90} (mg/L)		300 mg			600 mg		
		ASC_{12} (mg/L·h)	ASC_{24}/CMI	T > CMI (%)	ASC_{12} (mg/L·h)	ASC_{24}/CMI	T > CMI (%)
1	0,25	83,4	667	100	155,9	1247	100
2	0,5	41,8	167	100	86,6	347	100
3	0,25	50,2	402	100	94,7	757	100
4	0,25	63,6	509	100	181,0	1448	100
5	0,25	65,9	527	100	131,9	1055	100
6	0,25	27,8	445	100	115,6	1850	100
7	<0,125	28,7	460	100	103,4	1654	100
8	1,0	46,2	92	100	176,0	352	100

Source : Alffenaar *et al.*, 2010.

Abréviations : ASC_x = aire sous la courbe au temps x; CMI = concentration minimale inhibitrice; CMI_{90} = concentration minimale inhibitrice nécessaire pour inhiber la croissance de 90 % des organismes; T > CMI = temps durant lequel les concentrations excèdent la concentration minimale inhibitrice.

Dans cette étude [Alffenaar *et al.*, 2010], les concentrations sériques efficaces sont atteintes après 3 jours d'administration biquotidienne de 300 mg de linézolide, et chez 7 des 8 patients le rapport ASC_{24}/CMI est ≥ 100 . La posologie devra être adaptée en fonction des valeurs de concentration moyennes obtenues à l'état d'équilibre (300 mg = C_{min} de 1,9 mg/L et C_{max} de 9,5 mg/L et 600 mg = C_{min} de 5,8 mg/L et C_{max} de 20,4 mg/L) afin d'optimiser l'efficacité du produit dans certaines populations de patients que l'on sait à risque d'avoir une variabilité importante de la pharmacocinétique du produit (p. ex. fibrose kystique du pancréas), et plus particulièrement dans la forme orale. Par exemple, Stalker et ses collaborateurs [2003] ont rapporté que le ratio C_{max}/CMI du linézolide et le temps d'exposition au-dessus de la CMI sont gages d'efficacité pour contrer les infections à Gram positif. Auparavant, certains modèles *in vitro* de même que chez l'animal ont démontré que le ratio ASC/CMI serait le meilleur paramètre pour mesurer l'efficacité chez

les patients traités aux fluoroquinolones [Andes et Craig, 2002; Craig, 1998; Drusano *et al.*, 1993; Forrest *et al.*, 1993].

À noter que d'autres paramètres biochimiques et cliniques sont mentionnés pour des patients avec des conditions critiques telles que les grands malades en soins intensifs [Zoller *et al.*, 2014] ou ceux avec une clairance de la créatinine diminuée [Matsumoto *et al.*, 2014].

En conclusion, même si, dans certaines populations, des études sont en cours [Gostelow *et al.*, 2014], il serait approprié d'entreprendre un suivi thérapeutique pharmacologique chez les patients recevant le linézolide [Morata *et al.*, 2013].

5.2 Validité clinique : aucune étude d'évaluation de la validité clinique n'été repérée.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Selon l'information transmise par le requérant, l'analyse actuelle repose sur l'utilisation d'une droite de calibration sans standard interne. Des contrôles de qualité interne (dilution différente) et des contrôles « patients » sont également utilisés. Les résultats sont aussi comparés avec les valeurs analytiques historiques. Les résultats sont colligés selon une procédure reconnue par Agrément Canada.

Présentement, il n'existe aucun programme de contrôle externe, mais le laboratoire a exprimé à la KKG (sous la gouvernance de la Dutch Foundation for Quality Assessment in Medical Laboratories) son intérêt à participer, lorsqu'il sera disponible, à un programme de contrôle de la qualité interlaboratoire sur le suivi thérapeutique de certains antibactériens.

Les données sur la validité analytique de la méthode HPLC-DAD sont tirées des résultats de douze études dont sept études comparatives réalisées avec la méthode HPLC-UV :

PARAMÈTRES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité	X		
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice		X	
Concordance		X	
Corrélation entre test et comparateur	X		

Les résultats de répétabilité, de reproductibilité et d'exactitude sont présentés au tableau 3. La variation intraessai (*intraday*) n'a pas été rapportée avec la méthode HPLC-DAD. La reproductibilité de la HPLC-DAD (méthode utilisée par le requérant) présente des coefficients de variation interjournaliers (*interday*) inférieurs à 5,5 % et des biais inférieurs à 11 % alors que les autres méthodes chromatographiques présentent des valeurs similaires ou généralement inférieures à 15 %. Malgré l'augmentation des concentrations ajoutées, les coefficients de variation demeurent acceptables.

Tableau 3 Répétabilité, reproductibilité et exactitude de la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) et des autres méthodes chromatographiques

ÉTUDE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	INTRAESSAI		INTERJOURNALIER	
			CV (%)	% BIAIS*	CV (%)	% BIAIS*
HPLC-DAD						
Cios <i>et al.</i> , 2013	7 courbes de calibration sur 7 jours différents	0,5	-	-	5,42	10,85
		2,5	-	-	1,74	3,18
		5	-	-	0,67	1,1
		10	-	-	0,76	1,06
		20	-	-	0,92	1,53
		30	-	-	0,97	0,74
UPLC-PDA ou HPLC-PDA						
Baietto <i>et al.</i> , 2013	<i>Intraessai</i> : 5 réplicats <i>Interjournalier</i> : 5 réplicats (5 jours différents)	0.2	7,15	4,41	12,83	4,46
		1	8,75	- 0,49	10,91	9,40
		5	2,09	- 2,76	10,51	- 1,33
		10	7,6	13,96	8,39	- 6,69
Fortuna <i>et al.</i> , 2013	<i>Intraessai</i> : 5 <i>Interjournalier</i> : 17 (5 jours différents)	1	5,34	- 4,76	8,90	- 1,98
	<i>Intra essai</i> : 5 <i>Interjournalier</i> : 17 (5 jours différents)	5	7,22	- 2,59	5,86	- 3,06
	<i>Intra essai</i> : 5 <i>Interjournalier</i> : 17 (5 jours différents)	10	2,67	5,17	7,49	- 0,04
HPLC-UV						
Baietto <i>et al.</i> , 2009	5	0,75	1,87	- 0,75	14,45	0,40
	5	7,5	5,64	3,31	12,14	6,78
	5	15	2,63	- 9,54	4,74	0,56

ÉTUDE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	INTRAESSAI		INTERJOURNALIER	
			CV (%)	% BIAIS*	CV (%)	% BIAIS*
Cattaneo <i>et al.</i> , 2010	5	0,2	10,61	1,6	18,80	- 1,75
	5	0,6	3,92	- 5,71	8,16	- 0,33
	5	4,8	3,34	8,18	5,37	- 0,37
	5	30	2,83	5,99	5,25	2,65
Cios <i>et al.</i> , 2013	7 courbes de calibration sur 7 jours différents	0,5	-	-	4,69	12,63
		2,5	-	-	3,59	6,65
		5	-	-	2,63	2,40
		10	-	-	3,56	3,04
		20	-	-	2,60	1,68
		30	-	-	3,47	0,97
Helmy, 2013	<i>Intraessai</i> : 3 réplicats (courbe de calibration) <i>Interjournalier</i> : 6 courbes de calibration sur 6 jours différents	0,1	9,1	105†	8,9	100†
		0,5	4,36	97,9†	4,24	97,3†
		2	3,22	106,2†	4,15	104,1†
		10	0,66	101,1†	0,35	107†
Polillo <i>et al.</i> , 2010	3 courbes de calibration en 3 jours consécutifs	0,7813	-	-	6,19	103,78†
		1,5625	-	-	6,31	105,49†
		3,125	-	-	7,83	107,38†
		6,25	-	-	0,66	105,09†
		12,5	-	-	9,66	104,06†
		25	-	-	2,29	95,54†
		50	-	-	4,53	95,83†
		100	-	-	0,12	101,78†

ÉTUDE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	INTRAESSAI		INTERJOURNALIER	
			CV (%)	% BIAIS*	CV (%)	% BIAIS*
Swoboda <i>et al.</i> , 2007	6	2	2,63	101,2†	2,08	103,2†
	6	10	4,91	100,6†	1,78	101,7†
	6	40	3,45	101,2†	2,18	102,3†
Traunmuller <i>et al.</i> , 2010	Interjournalier : 4 (4 répliqués) Interjournalier : 12 (4 répliqués, en 3 jours différents)	0,05	13,9	- 13,6	10,2	- 13
		0,5	1,6	- 2,7	2,4	- 3,8
		1	2,5	9,3	4,9	8,3
		10	1	1,6	1,6	2,3
LC-MS/MS						
Szultka <i>et al.</i> , 2013 (par MEPS)	3 répliqués	1	-	104,8†	-	-
	3 répliqués	8	-	99,7†	-	-
	3 répliqués	15	-	100,6†	-	-
Szultka <i>et al.</i> , 2013 (par EPS)	3 répliqués	1	-	113†	-	-
	3 répliqués	8	-	102,6†	-	-
	3 répliqués	15	-	102,2†	-	-
Szultka <i>et al.</i> , 2013 (méthode de préparation non précisée)	10	1	6,83	108,3†	-	-
		3	1,66	107,7†	-	-
		5	6,25	105,5†	-	-
		8	4,41	101,4†	-	-
		10	3,10	101,5†	-	-
		15	3,26	99,1†	-	-
		20	2,44	100,4†	-	-
		30	1,51	99,3†	-	-

ÉTUDE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	INTRAESSAI		INTERJOURNALIER	
			CV (%)	% BIAIS*	CV (%)	% BIAIS*
Zander <i>et al.</i> , 2014 Système 1 (Quattro Micro ^{MC})	5	0,38	2,49‡	106†	2,64¥	-
	5	0,5	3,72‡	99†	7,34¥	-
	5	4	2,62‡	103†	2,48¥	-
	5	6	1,65‡	105†	2,7¥	-
	5	16	5,23‡	101†	2,97¥	-
Zander <i>et al.</i> , 2014 Système 2 (Micromass Quattro LC ^{MC})	5	0,38	1,89‡	102†	2,26¥	-
	5	0,5	2,71‡	98†	4,28¥	-
	5	4	3,22‡	101†	2,01¥	-
	5	6	0,96‡	101†	3,57¥	-
	5	16	3,86‡	101†	4,23¥	-

Abréviations : CV : coefficient de variation; sem. : semaine; HPLC-DAD : chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes; µg/ml : microgramme par millilitre

*Se réfère au pourcentage d'inexactitude ou d'erreur relative; † Pourcentage d'exactitude;‡ Intraessai et ¥ Interessai.

La méthode proposée par le requérant (HPLC-DAD) démontre une sensibilité analytique (limite de détection ou LOD) comparable à celle d'autres techniques reconnues dans la littérature [Baietto *et al.*, 2013; Cattaneo *et al.*, 2013a; Cios *et al.*, 2013; Fortuna *et al.*, 2013; Helmy, 2013; Cattaneo *et al.*, 2010; Polillo *et al.*, 2010; Baietto *et al.*, 2009; Swoboda *et al.*, 2007]. La limite de détection est de 0,1 ug/mL comparativement aux autres techniques utilisées qui varient de 0,04 à 0,4 ug/mL [Baietto *et al.*, 2013; Cios *et al.*, 2013; Helmy, 2013; Cattaneo *et al.*, 2010; Polillo *et al.*, 2010; Baietto *et al.*, 2009; Swoboda *et al.*, 2007]. Il en va de même pour la linéarité (0,5 à 30 ug/mL) pour laquelle la méthode proposée par le requérant rapporte un coefficient de corrélation se rapprochant de l'unité ($r = 0,9997$), qui se compare au coefficient des autres méthodes chromatographiques ([Cios *et al.*, 2013; Baietto *et al.*, 2013; Fortuna *et al.*, 2013; Helmy, 2013; Szultka *et al.*, 2013; Cattaneo *et al.*, 2010; Polillo *et al.*, 2010; Traunmuller *et al.*, 2010; Baietto *et al.*, 2009; Swoboda *et al.*, 2007]).

Tableau 4 Sensibilité et linéarité analytique des différentes méthodes chromatographiques

ÉTUDE	NOMBRE ET TYPE D'ÉCHANTILLONS	VOLUME (µl)*	ANALYSE PAR HPLC						
			MÉTHODE DE PRÉPARATION	CONTRÔLE INTERNE	DÉTECTION (nm)	LOD (µg/ml)	LLOQ (µg/ml)	LINÉARITÉ (µg/ml)	COEFFICIENT DE LINÉARITÉ
HPLC-DAD									
Cios <i>et al.</i> , 2013	Sérum	200 / 50	PP	Piperacillin	258	0,1	0,5	0,5 – 30	$r = 0,9997\$$
UPLC-PDA ou HPLC-PDA									
Baietto <i>et al.</i> , 2013	Plasma	- / 4	PP	Quinoxaline	254	0,058	0,117	0,117 – 30	$r^2 > 0,999$
Fortuna <i>et al.</i> , 2013	Plasma	- / 25	EPS	6,7-Dimethyl-2,3-di (2-pyridyl)-quinoxaline	254	-	-	0,025 – 25,6€	$R = 0,9997\$$
HPLC-UV									
Baietto <i>et al.</i> , 2009	Plasma	300 / 40	PP	Quinoxaline	280	0,04	0,31	-	$r^2 > 0,998†$
Cattaneo <i>et al.</i> , 2010	10 Plasma	300 / 20	PP	Acide paratoluïque	254	-	0,2	0,2 – 48	$r^2 = 0,9996†$
Cios <i>et al.</i> , 2013	Sérum	200 / 50	PP	Piperacillin	258	0,1	0,25	0,5 – 30	$R = 0,9995\$$
Helmy, 2013	12 Plasma	250 / 25	PP	Métronidazole	260	0,05	0,1	0,1 – 30	$r^2 = 0,9999†$
Polillo <i>et al.</i> , 2010	Plasma	100 / -	PP	-	214	0,3775	0,7813	0,7813 - 100	$r^2 = 0,9976$
Swoboda <i>et al.</i> , 2007	Plasma	- / 100	PP	-	251	0,1	0,3	0,5 – 40	$> 0,999$
Traunmuller <i>et al.</i> , 2010	Plasma	20 / 12	ELL	Fluconazole	251	-	0,05	0,05 – 40	$R \geq 0,9992$

ÉTUDE	NOMBRE ET TYPE D'ÉCHANTILLONS	VOLUME (µl)*	ANALYSE PAR HPLC						
			MÉTHODE DE PRÉPARATION	CONTRÔLE INTERNE	DÉTECTION (nm)	LOD (µg/ml)	LLOQ (µg/ml)	LINÉARITÉ (µg/ml)	COEFFICIENT DE LINÉARITÉ
LC-MS/MS									
Szultka <i>et al.</i> , 2013	3 Plasma	50 / -	MEPS	Gemifloxacin	251 ESI, mode MRM (positif)	0,1407 ng/ml	0,3814 ng/ml	1 – 30	$r^2 = 0,9988$
		120 / 15	EPS						$r^2 = 0,9889$
Zander <i>et al.</i> , 2014	Sérum	50 / 10	PP et EPS	Linezolid-d ₃	ESI, mode MRM (positif) ‡	-	0,5	0,13 – 32	$r^2 > 0,999$ ¥

Abréviations : ELL : extraction liquide-liquide; EPS : extraction en phase solide; ESI : *electron spray ionisation*; HPLC-DAD : chromatographie à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes; HPLC-UV : chromatographie à haute performance couplée à une détection par ultraviolet; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LLOQ : limite inférieure de la quantification; LOD : limite de la détection; MEPS : *microextraction in packed syringe*; MRM : *multiple reaction monitoring*; nm : nanomètre; PP : précipitation de protéines; µg/ml : microgramme par millilitre; UPLC-DAD : *ultra performance liquid chromatography coupled with photo diode array detector*.

* Volume d'échantillon / volume d'aliquote injecté dans le système de HPLC

† Coefficient de détermination

‡ Ionisation

§ Coefficient de corrélation

¥ Coefficient de corrélation de 3 courbes de calibration (régression linéaire)

£ Les unités ont été converties à des fins d'uniformité.

La HPLC-DAD a un recouvrement d'environ 100 % (Cios *et al.*, 2013). Les autres méthodes chromatographiques obtiennent des valeurs similaires variant entre 95 % et 112 %, à l'exception d'une seule étude portant sur la HPLC-UV [Baietto *et al.*, 2013] avec 75,9 % de recouvrement. Aucune interférence n'a été observée avec des substances endogènes, des antibiotiques ou d'autres médicaments. Lorsque l'on ajoute des quantités connues de linézolide, le recouvrement et la justesse de la mesure sont excellents (100,5 %). La méthode chromatographique utilisée par le test proposé nous permet de conclure que celui-ci agit spécifiquement.

Tableau 5 Spécificité analytique, recouvrement, interférences et effets de matrice

ÉTUDE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	RECOUVREMENT (%)	INTERFÉRENCES
HPLC-DAD				
Cios <i>et al.</i> , 2013	-	-	100,5	Aucune interférence avec des substances endogènes ni avec 10 autres antibiotiques
UPLC-PDA ou HPLC-PDA				
Baietto <i>et al.</i> , 2013	-	-	112,2	Aucune interférence avec des substances endogènes ni avec 11 autres antibiotiques
Fortuna <i>et al.</i> , 2013	-	-	104,4	Aucun effet de matrice observé Aucune interférence avec des médicaments
HPLC-UV				
Baietto <i>et al.</i> , 2009	5	-	75,9	Aucune interférence significative avec des antirétroviraux, antibiotiques, antituberculeux et autres médicaments
Cattaneo <i>et al.</i> , 2010	10 spécimens en triplicata	4,8 ng/ml	99,8	Aucune interférence avec des antirétroviraux, antibiotiques et autres médicaments
Cios <i>et al.</i> , 2013	-	-	100,5	Aucune interférence avec des substances endogènes ni avec 10 autres antibiotiques
Helmy, 2013	3	0,5	100,2	Aucune interférence (n = 10 en triplicata)
	3	2	98,44	
	3	10	99,75	

ÉTUDE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	RECOUVREMENT (%)	INTERFÉRENCES
Polillo <i>et al.</i> , 2010	-	-	95,4	-
Swoboda <i>et al.</i> , 2007	6	2	100,62	Aucune interférence avec des substances endogènes
	6	10	98,13	
	6	40	97,97	
Traunmuller <i>et al.</i> , 2010	-	-	-	Aucune interférence avec 14 autres médicaments
LC-MS/MS				
Szultka <i>et al.</i> , 2013 (par MEPS)	3 réplicats	1	14 [†]	Aucune interférence avec des substances endogènes
	3 réplicats	8	12 [†]	
	3 réplicats	15	14 [†]	
Szultka <i>et al.</i> , 2013 (par EPS)	3 réplicats	1	49 [†]	
	3 réplicats	8	47 [†]	
	3 réplicats	15	44 [†]	
Zander <i>et al.</i> , 2014	3	0,5	102,7*	-
	3	≈ 8,6	101,4*	
	3	16	101,1*	

Abréviations : µg/ml : microgramme par millilitre.

* Recouvrement à la température ambiante, après 24 h de conservation.

† Effet de matrice (%)

Corrélation entre le test et le comparateur

Dans l'étude de Cios et ses collaborateurs [Cios *et al.*, 2013], la méthode HPLC-DAD et la méthode HPLC-UV donnent des résultats semblables sur des échantillons sériques (n = 84) avec un coefficient de corrélation entre les deux méthodes de 0,998.

5.1 Recommandations d'autres organismes

Nous n'avons pas trouvé de mention de recommandations d'organismes ou de sociétés savantes concernant la mesure des concentrations de linézolide lors de son administration.

6. RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

L'appareillage nécessaire à l'analyse par HPLC-UV ou HPLC-DAD est généralement présent dans les laboratoires. Toutefois, les étapes de préparation des échantillons, préalables à l'analyse, peuvent varier selon les différents protocoles envisagés. Les ressources matérielles et humaines sont donc à prévoir en conséquence.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été analysés.

7. EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Selon des opinions d'experts, l'analyse du linézolide permet d'assurer un suivi thérapeutique pharmacologique afin d'optimiser le dosage du médicament tout en évitant une toxicité hématologique.

7.2 Validité clinique : aucune donnée relative à la validité clinique n'a été repérée.

7.3 Validité analytique

Les données de validité analytique présentent la HPLC-DAD comme une méthode fiable (précise, exacte et reproductible) pour la quantification du linézolide dans le plasma et dans le sérum. Aucune interférence significative n'a été observée avec des substances endogènes, des antirétroviraux, d'autres antibiotiques, antituberculeux et autres médicaments.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Nous n'avons pas trouvé de mention de recommandations, par des organismes ou des sociétés savantes, concernant le suivi thérapeutique du linézolide lors de son administration.

8. AVIS EN BREF DE L'INESSS

Dosage du linézolide par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC)

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation lorsque :
 - Les valeurs de référence seront établies
 - L'utilité clinique sera mieux étayée
 - Le contrôle de la qualité externe sera précisé
 - La demande sera complétée avec des données de validation locale

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

Cette analyse est sûrement pertinente pour des cas particuliers.

RÉFÉRENCES

- Alffenaar JW, van Altena R, Harmelink IM, Filguera P, Molenaar E, Wessels AM, et al. Comparison of the pharmacokinetics of two dosage regimens of linezolid in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis patients. *Clin Pharmacokinet* 2010b;49(8):559-65.
- Andes D et Craig WA. Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(6):1665-70.
- Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(11):3484-9.
- Baietto L, D'Avolio A, Ariaudo A, Corcione S, Simiele M, Cusato J, et al. Development and validation of a new UPLC-PDA method to quantify linezolid in plasma and in dried plasma spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;936:42-7.
- Baietto L, D'Avolio A, De Rosa FG, Garazzino S, Patanella S, Siccardi M, et al. Simultaneous quantification of linezolid, rifampicin, levofloxacin, and moxifloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography with UV. *Ther Drug Monit* 2009;31(1):104-9.
- Belal F, El-Din MK, Eid MI, El-Gamal RM. Spectrofluorimetric determination of terbinafine hydrochloride and linezolid in their dosage forms and human plasma. *J Fluoresc* 2013;23(5):1077-87.
- Boak LM, Rayner CR, Grayson ML, Paterson DL, Spelman D, Khumra S, et al. Clinical population pharmacokinetics and toxicodynamics of linezolid. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(4):2334-43.
- Cattaneo D, Orlando G, Cordier L. Linezolid for extensively drug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2013a;368(3):291.
- Cattaneo D, Orlando G, Cozzi V, Cordier L, Baldelli S, Merli S, et al. Linezolid plasma concentrations and occurrence of drug-related haematological toxicity in patients with gram-positive infections. *Int J Antimicrob Agents* 2013b;41(6):586-9.
- Cattaneo D, Baldelli S, Conti F, Cozzi V, Clementi E. Determination of linezolid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit* 2010;32(4):520-4.
- Cavazos-Rocha N, Vera-Cabrera L, Welsh-Lozano O, Waksman-de-Torres N, de la Luz Salazar-Cavazos M. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43(5):1775-81.
- Cios A, Kus K, Szymura-Oleksiak J. Determination of linezolid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet and diode array detection. *Acta Pol Pharm* 2013;70(4):631-41.
- Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26(1):1-10.

- Dong HY, Xie J, Chen LH, Wang TT, Zhao YR, Dong YL. Therapeutic drug monitoring and receiver operating characteristic curve prediction may reduce the development of linezolid-associated thrombocytopenia in critically ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(6):1029-35.
- Drusano GL, Johnson DE, Rosen M, Standiford HC. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(3):483-90.
- Dryden MS. Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(Suppl 4):iv7-iv15.
- Eslam RB, Burian A, Vila G, Saueremann R, Hammer A, Frenzel D, et al. Target site pharmacokinetics of linezolid after single and multiple doses in diabetic patients with soft tissue infection. *J Clin Pharmacol* 2014;54(9):1058-62.
- Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(5):1073-81.
- Fortuna S, De Pascale G, Ragazzoni E, Antonelli M, Navarra P. Validation of a new HPLC-UV method for determination of the antibiotic linezolid in human plasma and in bronchoalveolar lavage. *Biomed Chromatogr* 2013;27(11):1489-96.
- Garcia-Prats AJ, Rose PC, Hesselring AC, Schaaf HS. Linezolid for the treatment of drug-resistant tuberculosis in children: A review and recommendations. *Tuberculosis (Edinb)* 2014;94(2):93-104.
- Gostelow M, Gonzalez D, Smith PB, Cohen-Wolkowicz M. Pharmacokinetics and safety of recently approved drugs used to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in infants, children and adults. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014;7(3):327-40.
- Helmy SA. Simultaneous quantification of linezolid, tinidazole, norfloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and gatifloxacin in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies in human volunteers. *Ther Drug Monit* 2013;35(6):770-7.
- Hernandez M, Borrull F, Calull M. Determination of amoxicillin in plasma samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;731(2):309-15.
- Joel J, Graham SM, Peckham-Cooper A, Korres N, Tsouchnica H, Tsiridis E. Clinical results of linezolid in arthroplasty and trauma MRSA related infections. *World J Orthop* 2014;5(2):151-7.
- Li Z, Xiao Z, Zhong Q, Zhang Y, Xu F. 116 cases of neonatal early-onset or late-onset sepsis: A single center retrospective analysis on pathogenic bacteria species distribution and antimicrobial susceptibility. *Int J Clin Exp Med* 2013;6(8):693-9.
- Matsumoto K, Shigemi A, Takeshita A, Watanabe E, Yokoyama Y, Ikawa K, et al. Analysis of thrombocytopenic effects and population pharmacokinetics of linezolid: A dosage strategy according to the trough concentration target and renal function in adult patients. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44(3):242-7.
- Morata L, Cuesta M, Rojas JF, Rodriguez S, Brunet M, Casals G, et al. Risk factors for a low linezolid trough plasma concentration in acute infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(4):1913-7.

- Pea F, Viale P, Cojutti P, Del Pin B, Zamparini E, Furlanut M. Therapeutic drug monitoring may improve safety outcomes of long-term treatment with linezolid in adult patients. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(8):2034-42.
- Pea F, Furlanut M, Cojutti P, Cristini F, Zamparini E, Franceschi L, Viale P. Therapeutic drug monitoring of linezolid: A retrospective monocentric analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(11):4605-10.
- Polillo M, Tascini C, Lastella M, Malacarne P, Ciofi L, Viaggi B, et al. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure linezolid and daptomycin concentrations in human plasma. *Ther Drug Monit* 2010;32(2):200-5.
- Rasigade JP, Bensaid M, Butin M, Picaud JC, Laurent F. Actualités sur la prise en charge des infections néonatales nosocomiales tardives à staphylocoque à coagulase négative. *Arch Pediatr* 2013;20(9):1028-33.
- Stalker DJ, Jungbluth GL, Hopkins NK, Batts DH. Pharmacokinetics and tolerance of single- and multiple-dose oral or intravenous linezolid, an oxazolidinone antibiotic, in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1239-46.
- Swoboda S, Ober M, Anagnostakos K, Geiss HK, Weigand MA, Hoppe-Tichy T. A simple isocratic HPLC assay to determine linezolid concentrations in different biomatrices for in vivo and in vitro studies. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(8):1019-22.
- Szultka M, Krzeminski R, Szeliga J, Jackowski M, Buszewski B. A new approach for antibiotic drugs determination in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013;1272:41-9.
- Traunmuller F, Mauric O, Popovic M, Joukhadar C. Rapid and sensitive determination of the antibiotic linezolid in low plasma volumes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 2010;48(5):325-7.
- Zander J, Maier B, Zoller M, Teupser D, Vogeser M. Quantification of linezolid in serum by LC-MS/MS using semi-automated sample preparation and isotope dilution internal standardization. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(3):381-9.
- Zoller M, Maier B, Hornuss C, Neugebauer C, Dobbeler G, Nagel D, et al. Variability of linezolid concentrations after standard dosing in critically ill patients: A prospective observational study. *Crit Care* 2014;18(4):R148.

PANEL LEUCÉMIE PRÉDISPOSITION FAMILIALE : SÉQUENÇAGE DES GÈNES *RUNX1 (AML1)*, *PAX5* ET *TP53* (RÉFÉRENCE – 2014.02.07)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1. **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2. **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 21 janvier 2014
- 1.3. **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 9 juin 2014
- 1.4. **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Séquençage bidirectionnel des gènes *RUNX1 (AML1)*, *PAX5* et *TP53* par la méthode de Sanger.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'analyse est réalisée sur l'ADN génomique isolé de cellules tumorales et non tumorales. Une amplification par réaction en chaîne de la polymérase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) est d'abord réalisée afin d'amplifier les exons et les points de jonction exon-intron de *RUNX1* ou de *PAX5* et *TP53*, selon le cas. Les amplicons sont ensuite séquencés par la méthode de Sanger. Le choix du ou des gènes sera orienté par le diagnostic (*RUNX1* si leucémie myéloblastique aigüe et *PAX5/TP53* si leucémie lymphoblastique aigüe hypodiploïde).

2.3 **Société ou développeur** : protocole fourni par le demandeur

2.4 **Licence** : ne s'applique pas.

2.5 **Brevet, le cas échéant** : ne s'applique pas.

2.6 **Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)** : ne s'applique pas.

2.7 **Valeurs pondérées** : *PAX5* et *TP53* : 865,79; *AML1 (RUNX1)*: 501,53

3. INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Patients pédiatriques atteints d'une leucémie myéloblastique aigüe ou lymphoblastique aigüe nécessitant une greffe de moelle osseuse allogénique de même que les membres de la fratrie considérés comme donneurs potentiels.

3.2 Description des maladies visées

Les leucémies aigües sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération médullaire de progéniteurs des lignées myéloïde ou lymphoïde et une atteinte de l'hématopoïèse. La classification franco-américano-britannique distingue deux grands types : les leucémies lymphoblastiques aigües (LLA) et les leucémies myéloblastiques aigües (LMA), et elle les classe en plusieurs groupes en se basant sur des critères cytologiques et cytochimiques. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a développé une autre classification selon des critères génétiques [Vardiman *et al.*, 2009].

Les leucémies aigües sont causées par des mutations génétiques des précurseurs des lignées hématopoïétiques et par des anomalies fonctionnelles des facteurs de transcription. Par conséquent, on observe une prolifération anormale de ces lignées dans la moelle osseuse, associée à une perte de capacité de différenciation cellulaire précoce responsable d'une insuffisance médullaire avec accumulation excessive de cellules immatures (blastes) dans la moelle osseuse, le sang périphérique ou d'autres tissus [Jacinthe, 2008].

Les signes cliniques sont associés à l'insuffisance médullaire : anémie, thrombopénie avec signes hémorragiques et neutropénie avec des signes infectieux, et ils se rapportent à la prolifération blastique (adénopathies, splénomégalie ou hépatomégalie). Le diagnostic biologique est basé sur un hémogramme anormal, la présence de blastes à l'examen cytologique du frottis de sang périphérique et la présence d'une blastose médullaire ($\geq 20\%$) avec des critères morphologiques typiques de la LLA ou de la LMA dans un myélogramme. D'autres outils diagnostiques permettent la classification des leucémies aigües : la cytochimie, l'immunophénotypage, la cytogénétique et la biologie moléculaire. Les deux derniers ont également un intérêt pronostique. Le traitement repose sur une polychimiothérapie qui vise la rémission complète (phase d'induction), la prévention des rechutes (phase de consolidation) et la possibilité d'une greffe de moelle osseuse [HAS et INCa, 2011].

Tableau 1 Données épidémiologiques canadiennes concernant les leucémies pédiatriques

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES (0-14 ANS)	LEUCÉMIE LYMPHOÏDE	LEUCÉMIE MYÉLOÏDE AIGÛE
Nouveaux cas (5 ans, de 2006 à 2010)	1 145	200
Taux d'incidence normalisé selon l'âge (par million de personnes pour 1 an)	41,7	7,1
Contribution des leucémies au total des décès par cancer (2005-2009)	26 % (soit 166/640 décès totaux par cancer)	
Survie à 5 ans	91 % [IC à 95 % : 89-93]	73 % [IC à 95 % : 65-79]

Données tirées des Statistiques canadiennes sur le cancer 2014 [SCC, 2014].

Nombre de patients visés

Cinq nouveaux cas par année, et leur famille (comme donneurs de moelle apparentés).

Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Hémato-oncologie, pédiatrie, conseil génétique, diagnostic moléculaire.

Modalités d'administration du test

L'analyse s'effectue conjointement sur l'ADN tumoral et non tumoral provenant d'une biopsie de moelle osseuse ou d'un prélèvement de sang périphérique avec une concentration élevée de blastes et d'un échantillon de tissu normal comme un frottis buccal. L'analyse sera réalisée au laboratoire de diagnostic moléculaire du centre demandeur. Actuellement, les demandes d'analyse moléculaire par séquençage sur des biopsies de moelle osseuse concernant les gènes *RUNX1*, *TP53* et *PAX5* sont envoyées à l'extérieur du Québec. Selon les données du ministère de la Santé et des Services sociaux concernant l'année financière 2012-2013, il n'y a eu aucune demande d'envoi hors Québec pour l'analyse des gènes *RUNX1* (*AML1*) et *PAX5*. Toutefois, pour *TP53*, 70 demandes de séquençage ont été reçues pour la même période, mais ces données incluent des requêtes à d'autres fins cliniques⁷². De son côté, le CHU Sainte-Justine rapporte avoir envoyé à l'extérieur 14 demandes de séquençage de *TP53*, dont 6 associées au syndrome de Li-Fraumeni et 8 pour analyse de mutations familiales; la durée de la période est inconnue⁷³.

72. Les données ont été fournies par Mme Catherine Hamelin, conseillère au dossier génétique de la Direction de la biovigilance et de la biologie médicale du ministère de la Santé et des Services sociaux (26 août 2014).

73. Communications électroniques personnelles avec la Dre Sonia Cellot, M.D., RCPSC, hémato-oncologue pédiatrique du CHU Sainte-Justine, et la Dre Virginie Dormoy-Raclet, Ph. D., du laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine (2 au 15 septembre 2014).

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

La caractérisation moléculaire des tumeurs hématologiques est faite en utilisant trois catégories de techniques différentes : 1) la cytogénétique (marquage en bande G conventionnel, FISH ou PCR) permet de repérer les anomalies structurales des chromosomes; 2) le profilage génomique (hybridation comparative de sondes sur puce) permet la comparaison de l'expression des gènes; et 3) le séquençage à ultra haut débit de tout le génome, de l'exome ou du transcriptome permet une analyse complète de tout l'environnement génomique de la tumeur [Zuckerman et Rowe, 2014].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le demandeur propose d'évaluer le statut mutationnel des gènes *PAX5* et *TP53* ou *RUNX1* (*AML1*) par séquençage par la méthode de Sanger, chez les personnes atteintes de LLA ou LMA familiale, respectivement, afin de mettre en évidence une mutation germinale contributive de la maladie. La même mutation pourrait également se trouver chez un parent considéré comme éventuel donneur de moelle osseuse.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été évalué.

5. DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : non.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Des mutations germinales monogéniques et autres anomalies génétiques héréditaires sont associées à certains syndromes dont les manifestations cliniques incluent une prédisposition élevée aux tumeurs hématologiques. C'est le cas notamment du syndrome d'anomalies plaquettaires familiales (APF) et du syndrome de Li-Fraumeni relativement aux mutations touchant les gènes *RUNX1* et *TP53* respectivement (l'annexe A présente une liste plus exhaustive). Une reconnaissance clinique accrue de ces syndromes et l'émergence en clinique des nouvelles techniques de séquençage à ultra haut débit ont conduit à une augmentation importante du nombre de cas de leucémies d'origine familiale qui ont été reconnus [Churpek et Larson, 2013]. De plus, la mise en évidence de symptômes cliniques précurseurs, comme la thrombocytopénie chronique dans le cas de l'APF, et la documentation de cas de greffes de moelle osseuse qui ont échoué en raison de la sélection d'un donneur allogénique apparenté porteur de la mutation démontrent le besoin clinique lié au repérage de ces cas [Churpek et Larson, 2013; Nickels *et al.*, 2013]. Les requérants rapportent également des cas de greffes problématiques liés au choix d'un donneur apparenté⁷⁴.

74. Communications électroniques personnelles avec la Dre Sonia Cellot, M.D., RCPSC, hématologue pédiatrique du CHU Sainte-Justine (4 septembre 2014).

Les mutations germinales de *TP53* et *PAX5* prédisposent au développement de la LLA

Le produit du gène *TP53*, reconnu comme un important suppresseur de tumeurs, régule des gènes concernés par le cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN, l'autophagie et les changements métaboliques. Des mutations somatiques de *TP53* sont fréquemment reconnues dans plusieurs types tumoraux et, bien que rares, certaines lésions germinales découvertes dans des familles où plusieurs cas de cancer ont été diagnostiqués, comme pour le syndrome de Li-Fraumeni, sont hautement pénétrantes [Malkin, 2011; Vousden et Lu, 2002; Li et Fraumeni, 1969].

Holmfeldt et ses collaborateurs (voir le tableau 2) ont analysé une cohorte de 124 cas pédiatriques de LLA hypodiploïde et ils ont démontré que les cas presque haploïdes (24 à 31 chromosomes) et les hypodiploïdes bas (HDB : 32 à 39 chromosomes) ont des caractéristiques moléculaires distinctes. La majorité des cas presque haploïdes présentent des changements moléculaires touchant la signalisation dépendante des récepteurs à tyrosine-kinase et de la voie Ras (71 %) de même que le facteur de transcription lymphoïde *IKZF3* (13 %). Au contraire, les cas de LLA hypodiploïde bas sont significativement associés à la présence d'une mutation somatique de *TP53* lorsque comparés aux autres cas de LLA (91,2 % vs 3,8 %; $p = 4,7 \times 10^{-19}$). De plus, les chercheurs ont montré, spécifiquement pour *TP53*, que les mutations somatiques se trouvaient également dans les cellules non tumorales dans 43,3 % des cas, démontrant ainsi l'importante présence d'une mutation germinale héritable dans un contexte de quasi-haploïdie. Parmi les mutations germinales *TP53* reconnues, 3 sont associées au syndrome de Li-Fraumeni [Holmfeldt *et al.*, 2013; Malkin, 2011].

Tableau 2 Étude de Holmfeldt et ses collaborateurs relativement à la contribution des mutations germinales de *TP53* à la leucémie lymphoblastique aigüe hypodiploïde

ÉTUDE	COHORTE	GÈNES TESTÉS	MUTATIONS RECONNUES PAR LA MÉTHODE DE SANGER (N)			ANALYSES
			SOMATIQUES	GERMINALES	?	
Holmfeldt, 2013	N = 124 LLA pédiatrique hypodiploïde 34 HDB 68 P-H 22 PD Md : 6,6 ans [1-18]	<i>TP53</i>	19	13	1	<i>TP53</i> muté (HDB vs autres) : 91 % (31/34)* vs 3,8 % (3/80) $p = 4,7 \times 10^{-19}$ HDB <i>TP53</i> muté germinal : 43,3 % (13/30)
		<i>PTPN11</i>	1	1	1	
		<i>CBL CRLF2</i> <i>ETV6 FLT3</i> <i>IKZF1 IKZF2</i> <i>IKZF3 JAK1</i> <i>JAK2 KIF2B</i> <i>KRAS MAPK1</i> <i>NF1 NRAS</i> <i>PAG1 PAX5</i> <i>RB1</i>	44	0	24	

Abréviations : HDB : hypodiploïde bas (*low hypodiploid*); LLA : leucémie lymphoblastique aigüe; Md : médiane; N : nombre; PD : presque diploïde; P-H : presque haploïde (*near haploid*).

* 1 mutation sur 34 n'a pas été reconnue par la méthode de Sanger : 1 large délétion des exons 2 à 6 (RT-PCR).

Peu avant la publication de Holmfeldt démontrant le lien étroit entre *TP53* et la LLA pédiatrique hypodiploïde, Powell et ses collaborateurs ont réalisé un séquençage de nouvelle génération sur tout l'exome de deux cas de LLA à cellules B (LLA-B) pédiatrique hypodiploïde issus d'une famille étendue comprenant trois autres cas de leucémie (voir tableau 3). Le cas probant n° 1 est décédé rapidement d'une récurrence postgreffe allogénique, et ce, 8 ans avant le diagnostic du cas probant n° 2. Considérant l'histoire familiale, les médecins traitants du cas probant n° 2 ont recommandé une greffe de cellules souches venant d'un donneur non apparenté. Toutefois, l'absence d'un donneur étranger compatible a contraint l'équipe médicale à identifier la mutation héréditaire causale afin de repérer un donneur non porteur dans la famille. Le séquençage comparatif des exomes a permis de mettre à jour une mutation non-sens R306X préalablement rapportée dans des familles avec plusieurs cas de sarcomes et autres tumeurs associées au syndrome de Li-Fraumeni. Le séquençage par la méthode de Sanger a été utilisé pour dépister les donneurs potentiels de la fratrie originalement exclus. Les auteurs de l'étude rapportent également que le criblage de la famille a permis de repérer deux porteurs à risque de développer une leucémie ou un cancer du spectre du syndrome de Li-Fraumeni. Le cas n° 2 a reçu une greffe de cellules souches de son frère non porteur de la mutation familiale *TP53* R306X et il se portait bien deux ans plus tard [Powell *et al.*, 2013].

Tableau 3 Étude de Powell et ses collaborateurs relativement à l'analyse de *TP53* pour le choix d'un donneur de moelle osseuse dans une famille à incidence élevée de leucémie

PROBANTS	CARACTÉRISTIQUES, SUIVIS ET ISSUES	FAMILLE ÉTENDUE DES DEUX CAS ÉTUDIÉS		AUTRE INFORMATION PERTINENTE
		LIEN (<i>TP53</i>)	ISSUE (ÂGE EN ANNÉES)	
n° 1 LLA-B 14 ans	Réfractaire à la chimiothérapie GCS allogénique de génotype inconnu. DM 51 jours post GCS	Frère (?) Père (?) Frère (?) Mère (WT)	LLA : DX (7), DM (8) Leucémie : DX (51), DM (54) Cancer œsophage : DX (23), DM (24) Non atteinte	Pour le cas n° 2, le SLF avait été initialement exclu en raison d'une absence de cas de cancers typiques dans la famille (sarcomes ou cancers du sein, du cerveau ou des glandes surrénales).
n° 2 LLA-B HDB 13 ans	Cousin de n° 1. DX 8 ans postdécès de n° 1. GCS allogénique apparentée écartée en raison de l'histoire familiale. L'absence d'un donneur non apparenté a forcé l'identification d'une mutation héréditaire causale. VSM 2 ans post GCS	Grand-père (?) Mère (R306X) Frère (WT) Frère (R306X)	Leucémie : DX (33), DM (36) Suivi pour risque accru de cancer <i>GCS d'un donneur apparenté</i> Suivi pour risque accru de cancer	

Abréviations : DM : décédé de la maladie; DX : diagnostic; GCS : greffe de cellules souches; HDB : hypodiploïde bas (*low hypodiploid*); LLA-B : leucémie lymphoblastique aigüe à cellules B; SLF : Syndrome de Li-Fraumeni; VSM : vivant sans maladie; WT : *wild-type*.

* 1mutation sur 34 non identifiée par la méthode de Sanger : 1 large délétion des exons 2 à 6 (RT-PCR).

Hof et ses collaborateurs ont évalué 265 échantillons de moelle osseuse (254) ou de sang périphérique (11) provenant d'une « première rechute » de LLA chez des patients pédiatriques [Hof *et al.*, 2011]. L'objectif de l'étude était de déterminer la contribution des mutations de *TP53* à la survenue et à l'issue de cette rechute. Parmi les échantillons de LLA testés, une mutation/délétion de *TP53* a été repérée dans 27 des 218 échantillons à cellules B (12,4 %) et dans 3 des 47 échantillons à cellules T (6,4 %). Par séquençage direct et MLPA, la présence au diagnostic original des mutations trouvées à la récurrence a été vérifiée pour 23 échantillons. L'expérience a démontré que 54 % des mutations/délétions de *TP53* n'étaient pas présentes au diagnostic. Relativement aux 10 cas dont les mutations étaient préservées entre le diagnostic et la récurrence, l'évaluation des échantillons de rémission complète a montré que, pour 4 d'entre eux, la mutation était d'origine germinale. De fait, deux de ces cas ont postérieurement développé d'autres cancers dont un astrocytome anaplastique et un syndrome myélodysplasique. Finalement, l'étude montre que, de façon indépendante, une altération moléculaire somatique de *TP53* est associée à une probabilité plus élevée de survie sans événement⁷⁵ raccourcie (*Rapport de risques instantanés* - RRI : 2,28 [ICà 95 %: 1,41-3,69]; p = 0,001).

PAX5, localisé sur le chromosome 9p13, est un facteur transcriptionnel nécessaire à la maturation des lymphocytes B [Nutt *et al.*, 1999]. Des mutations du gène *PAX5* ont été mises en évidence dans 32 % des cas pédiatriques de LLA-B [Mullighan *et al.*, 2007]. Des réarrangements impliquant *PAX5* surviennent dans environ 2,5 % des cas et ils concernent majoritairement les gènes *ETV6* et *JAK2* [Nebral *et al.*, 2009]. Bien que les mutations ou altérations somatiques de *PAX5* soient des caractéristiques déterminantes des LLA-B, Shah S. et ses collaborateurs ont récemment découvert par séquençage exomique une mutation hétérozygote germinale (G183S) qui ségrège avec la LLA-B de pénétrance variable dans deux familles non apparentées [Shah *et al.*, 2013]. De plus, l'analyse détaillée des cellules tumorales de tous les individus affectés des deux familles montre une délétion du chromosome 9p causant la perte d'hétérozygotie et la rétention de l'allèle mutante *PAX5* G183S. Les résultats détaillés de l'étude sont présentés au tableau 4. De plus, les auteurs ont analysé 44 cas de LLA-B sporadiques i(9)(q10) ou dic(9;v) afin de déterminer si la mutation *PAX5* G183S était fréquemment associée à une délétion du chromosome 9p. Deux cas ont été repérés [Shah *et al.*, 2013].

75. Un événement fait référence à un échec thérapeutique ou au décès du patient (*event-free survival*).

Tableau 4 Étude de Shah et ses collaborateurs relativement à la mise en évidence d'une mutation germinale de *PAX5* qui se traduit par un risque accru de LLA-B pédiatrique

FAMILLES	DIAGNOSTIC (ÂGE EN ANNÉES)	CARYOTYPE	GREFFE DE CELLULES SOUCHES (GÉNOTYPE DU DONNEUR)	ISSUE (INTERVALLE)	MUTATION GERMINALE <i>PAX5</i> G183S
1	Proband(e) : LLA-B (2) Frère/sœur : LLA-B (3) Cousin(e) : LLA-B (8) Cousin(e) : LLA-B (0) Oncle/tante : LLA (1)	t(1;9),del(8p21),i(9)(q10) i(9)(q10),del(17p11)del(9p21) ? ? ?	1 non apparenté (S.O.) ? ? ? ?	VSM (+ 6 ans) DM à 14 ans VSM (+ 5 ans) DM à 5 ans VSM (+ 25 ans)	+ + ? + +
2	Proband(e) : LLA- B (5) Enfant : LLA- B (2) Enfant : LLA- B (2) Cousin(e) : LLA- B (8) Oncle/tante : LLA (2)	i(9)(q10) +mar i(9)(q10),+11 i(9)(q10) dic(9;21)(p11;p11.1) Non réalisé	? 1 allogénique (?) 1 allogénique (?) ? ?	VSM (?) VSM (+ 2 ans) VSM (?) VSM (?) DM à ? ans	+ + + + ?

Abréviations : DM : décédé de la maladie; LLA-B : leucémie lymphoblastique aigüe à cellules B; SLF : syndrome de Li-Fraumeni; S.O. : sans objet; VSM : vivant sans maladie.

Tout récemment, Auer et ses collaborateurs ont décrit une troisième famille présentant trois cas de LLA-B pédiatrique avec ségrégation de la mutation germinale *PAX5* G183S concomitante à une anomalie de structure du chromosome 9p. En tout, 8 porteurs ont été répertoriés et un total de 5 cas de leucémie rapportés. Aucune donnée relative à l'issue de la maladie et au choix d'un donneur de moelle n'a été présentée [Auer *et al.*, 2014].

Les mutations germinales de *RUNX1* prédisposent aux anomalies plaquettaires familiales et à la leucémie myéloblastique aigüe.

RUNX1 code pour un facteur transcriptionnel largement impliqué dans l'hématopoïèse [Song *et al.*, 1999]. Les cas de LMA présentant des mutations somatiques de *RUNX1* sont caractérisés par des patrons d'expression génétique distincts et ils sont associés à un faible taux de réponse aux traitements et à un mauvais pronostic [Gaidzik *et al.*, 2011]. Les mutations germinales hétérozygotes dominantes de *RUNX1* sont responsables du syndrome d'anomalies plaquettaires familiales (APF) en raison de l'haploinsuffisance, syndrome caractérisé par une tendance aux saignements ainsi qu'une déficience du nombre et de la fonction des plaquettes [Osato, 2004; Song *et al.*, 1999; Dowton *et al.*, 1985]. Tel que présenté au tableau 5, les manifestations cliniques interfamilles et interindividus de l'APF sont hétérogènes [Liew et Owen, 2011]. Les cas d'APF ont également une propension variable à la progression vers le syndrome myélodysplasique et, ultimement, vers la LMA [Osato, 2004; Song *et al.*, 1999]. En effet, les cas d'APF causés par une mutation germinale de *RUNX1* présentent un risque à vie d'évolution vers la LMA estimé à 40 % avec un âge médian d'apparition de 33 ans [Owen *et al.*, 2008]. Bien que les cancers associés à un APF soient davantage d'origine myéloblastique, quelques cas de LLA à cellules T (LLA-T) ont également été recensés (voir Nishimoto *et al.*, 2010, Preudhomme *et al.*, 2009, et Owen *et al.*, 2008 au tableau 5). Osato et ses collaborateurs avaient répertorié, en 2004, une quinzaine de pédigrées où les individus affectés développaient une leucémie au cours de leur vie et non uniquement durant l'enfance. Plus récemment, Jongmans et ses collaborateurs ont porté ce nombre à 34 pédigrées en 2010, montrant du même coup que 4 cas impliquaient des délétions ou duplications partielles ou totales du gène, révélées uniquement par la MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) [Jongmans *et al.*, 2010].

Pour les besoins du présent dossier, le tableau 5 présente uniquement les études scientifiques repérées qui ont évalué le statut mutationnel de *RUNX1* et qui ont présenté des données cliniques relativement au choix d'un donneur de moelle osseuse et à l'issue clinique de la maladie. Les études publiées par Owen et ses collaborateurs [2008] et Buijs et ses collaborateurs [2001] ont rapporté des cas démontrant que l'utilisation d'un donneur reconnu *a posteriori* comme porteur de la prédisposition germinale conduisait à une faible prise ou à un échec de la greffe de même qu'à une leucémie provenant du donneur.

Tableau 5 Études mutationnelles de *RUNX1* ayant présenté des données cliniques de suivi

ÉTUDE (NOMBRE DE FAMILLES)	APF*	DIAGNOSTIC (ÂGE EN ANNÉES)+	CARYOTYPE TUMORAL	MUTATION GERMINALE <i>RUNX1</i>	GCS (GÉNOTYPE DU DONNEUR)	ISSUE (INTERVALLE)
Jongmans <i>et al.</i> , 2010 (2)	-/+/?	LMA (S.O., 7)	+ 8	Duplication§	?	VSM (+ 2 ans)
	-/+/?	Lymphome (S.O., 49)	?	?	?	DM à 49 ans
	-/+/?	Aucun (44, S.O.)	?	Duplication	S.O.	S.O.
	+/+/?	Aucun (4, S.O.)	?	Duplication	S.O.	VSM à 16 ans
	?/-/?	SDM/LMA (S.O., 4)	+ 21,t(18;21)	del exon 5b§	1 non apparenté	VSM (+ 1 an)
	-/+/?	Aucun (3, S.O.)	?	del exon 5b	S.O.	S.O.
	?/+/?	LMA (? , 35)	?	?	S.O.	DM à 36 ans
	-/+/?	Aucun (5, S.O.)	?	del exon 5b	S.O.	S.O.
Nishimoto <i>et al.</i> , 2010 (1)	+/+/?	LMA (Enfance, 41)	Normal	R174X	1 non apparenté	VSM (+ 3 ans)
	-/+/?	Considéré comme donneur	S.O.	R174X	S.O.	S.O.
	?/+/?	SDM/LMA (? , ?)	?	R174X	?	DM (?)
	?/+/?	LLA-T (? , 20)	t(1;7)	R174X	1 non apparenté	VSM (+ 1 an)
Ripperger <i>et al.</i> , 2009 (1)	-/-/?	SDM/LMA (? , 47)	-Y	R174X	?	?
	-/-/?	SDM/LMA (? , 13)	+ 2q,-5q,t(2;6)	R174X	1 non apparenté	?
Preudhomme <i>et al.</i> , 2009 (4)	?/?/?	LMA (? , 25)	?	A129E	1 Allo. (-)	DM (?)
		LMA (? , 25)	?	A129E	S.O.	DM (?)
		LMA (? , 42)	+ 21	A129E	S.O.	DM (?)
	?/?/?	LMA (? , 60)	Normal	R177Q	S.O.	VSM (?)
	LLA-T (? , 28)	Normal	R177Q	1 Allo. (-)	VSM (?)	
?/?/?	LMA (? , 55)	Normal	Q308RfsX259	1 Allo. (non testé)	VSM (?)	
	LMA (? , 24)	t(1;3)	Q308RfsX259	S.O.	DM (?)	
?/+/?	LMA (2, 12)	+ X, + 21	Délétion§	1 Allo. (non testé)	VR (?)	
Owen <i>et al.</i> , 2008 (5)	-/+/?	SMD/LMA (35, 63)	?	?	?	DM (+ 1 an)
	-/-/?	SMD (S.O., 37)	Normal	G336fsX563	2 Allo. (+)	VSM (+ 6 ans)
	+/+/?	Dysplasie (40, S.O.)	Normal	G336fsX563	S.O.	S.O.
	-/-/?	LLA-T (S.O., 12)	?	G336fsX563	S.O.	VSM (+ 30 ans)

	+/?/? +/?/? +/-/+ -/+/? +/?/?	LMA (S.O., 72) SMD/LMA (?, ?) LMA (Enfance, 51) Dysplasie (?, S.O.) LMA (20, 28)	? ? - 5 Normal Normal	? ? A28fsX109 A28fsX109 A28fsX109	? ? 1 Allo. (non testé) S.O. 2 Allo. (-)	DM (?) DM (?) DM (+ 3 mois) S.O. DM (+ 2 ans)
	-/?/? +/?/? -/+/?	LMA (S.O., 29) SMD (10, 49) SMD/LMA (7, 45)	? Normal + 8	? D96H D96H	? S.O. 1 non apparenté	DM à 29 ans S.O. VSM (+ ?)
	+/?/? +/-/- +/?/? ?/?/?	SMD/LMC (29, 48) LMA (S.O., 64) Aucun (21, S.O.) SMD/LMA (12, 23)	- 11q ? ? Normal	? ? K90fs ?	? ? ? ?	DM? (+ 8 ans) DM à 64 ans S.O. DM à 23 ans
	+/?/? -/?/?	SMD (10, 52) LMA (S.O., 8)	Normal ?	R292X R292X	1 Allo. (-) 1 Allo. (-)	VSM (+ ?) VSM (+ 18 ans)
Buijs <i>et al.</i> , 2001 (1)	+/?/? +/?/? +/?/?	LMA (NA, 33) SMD/LMA (?, ?) SMD (?, ?)	Tétraploïde Normal Normal	D198Y D198Y D198Y	1 Allo. (+) 1 non apparenté ?	DM (+ 3 ans) VSM (+ 2 ans) ? (+ 1 an)

Abréviations : AFP : anomalies plaquettaires familiales; Allo. : allogénique reliée; DM : décédé de la maladie; GSC : greffe de cellules souches; LLA-T : leucémie lymphoblastique aigüe à cellules T; LMA : leucémie myéloïde aigüe; LMC : leucémie myéloïde chronique; NR : non reliée; SMD : syndrome myélodysplasique; S.O. : sans objet; VSM : vivant sans maladie.

* Symptômes d'une anomalie plaquettaire familiale : Histoire de saignements/Thrombocytopénie/Déficience de la fonction plaquettaire.

† Âge à l'apparition des anomalies plaquettaires et au diagnostic de la tumeur hématologique.

§ Non identifiée par la méthode de Sanger.

|| La personne atteinte avait seulement une sœur porteuse de la mutation *RUNX1*.

5.1.3 Valeur thérapeutique : ces données sont incluses dans les sections précédentes.

5.2 Validité clinique

Les tests présentés dans ce dossier visent à améliorer les chances de réussite d'une greffe de cellules souches provenant d'un donneur allogénique apparenté. Les conditions qui entourent la réussite de ce traitement visant à sauver la vie du patient atteint sont multiples et difficiles à quantifier. En conséquence, les paramètres classiques d'évaluation de la validité clinique d'un test diagnostic tels qu'ils sont présentés dans le tableau suivant sont difficilement évaluables. De fait, aucune des études répertoriées n'a présenté de données à cet effet.

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité			X
Spécificité			X
Valeur prédictive positive (VPP)			X
Valeur prédictive négative (VPN)			X
Rapport de vraisemblance (LR)			X
Courbe ROC			X
Exactitude			X
Valeur diagnostique (leucémie familiale) <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>TP53</i> ▪ <i>PAX5</i> ▪ <i>RUNX1</i> 	X X X		
Valeur pronostique (risque de récurrence) <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>TP53</i> ▪ <i>PAX5</i> ▪ <i>RUNX1</i> 	X X	X	
Valeur thérapeutique <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>TP53</i> ▪ <i>PAX5</i> ▪ <i>RUNX1</i> 	X X	X	

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		X	
Reproductibilité		X	
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique		X	
Effet de matrice	X		
Concordance		X	
Corrélation entre test et comparateur		X	

Sensibilité analytique

Behjati et ses collaborateurs ont récemment décrit le cas d'un enfant de deux ans chez qui trois cancers séparés ont été diagnostiqués à l'intérieur de 6 mois, suggérant la présence d'un syndrome de Li-Fraumeni. En effet, deux tumeurs mésoenchymateuses des tissus mous et un neuroblastome métastatique agressif ont été diagnostiqués. Comme la recherche de mutation germinale des gènes *TP53*, *ALK* et *SDH* au moyen du séquençage direct par la méthode de Sanger était négative, un séquençage exomique comparatif de l'enfant et de ses parents a été réalisé afin de vérifier le statut mutationnel de plusieurs gènes en simultané. Chez le patient, mais non dans l'ADN germinale de ses parents, une mutation faux-sens R248Q a été identifiée dans 3 à 20 % des séquences générées, un niveau non détectable par la méthode de Sanger. Cette mutation homozygote a été détectée chez l'enfant dans tous les échantillons tumoraux évalués. Un mosaïsme germinale a par la suite été démontré dans l'échantillon sanguin prélevé à la naissance de l'enfant [Behjati *et al.*, 2014].

Concernant la mise en évidence de mutations germinales de *RUNX1* chez des individus suspectés d'être atteints d'une forme familiale de LMA, les études de Jongmans et ses collaborateurs [2010] et de Preudhomme et ses collaborateurs [2009] ont montré la présence de délétions/duplications non détectables par séquençage direct. Ainsi, les auteurs de ces études de même que plusieurs autres confirment l'importance d'utiliser la MLPA en combinaison avec la méthode de Sanger ou une hybridation génomique comparative (CGH) [Churpek et Larson, 2013; Nickels *et al.*, 2013; Jongmans *et al.*, 2010; Preudhomme *et al.*, 2009].

Effet de matrice

Chez une personne atteinte de SMD/LMA, le sang est un tissu affecté et plusieurs gènes avec des mutations germinales ont aussi des mutations somatiques; ces éléments agissent comme facteurs de confusion lors de l'interprétation des résultats issus d'une recherche de mutations germinales de *RUNX1* effectuée sur un échantillon de sang ou de moelle osseuse. Bien que demandant un temps de réponse plus long, une biopsie de peau dans le but d'en faire une culture de fibroblastes serait préférable. Pour les cas urgents, un frottis buccal ou un échantillon de salive pourrait être utilisé, mais ceux-ci contiennent jusqu'à 50 % de lymphocytes contaminants, ce qui pourrait altérer les résultats de l'analyse [Nickels *et al.*, 2013].

Données locales de validation⁷⁶

Brièvement, le laboratoire du demandeur a choisi de séquencer toute la région codante ainsi que les jonctions introns-exons. La technique a été testée sur des échantillons normaux. Au total, deux échantillons pour chaque gène ont été utilisés.

- Pour *PAX5*, 1 variant codant homozygote synonyme et 1 variant hétérozygote non codant ont été mis en évidence.
- Pour *RUNX1*, 1 variant hétérozygote non codant connu et rapporté dans dbSNP de même que 1 variant homozygote non codant ont été mis en évidence.
- Pour *TP53*, 1 variant codant hétérozygote décrit comme polymorphisme.

Les requérants ont été capables de détecter ces variations sans aucune difficulté. Leur

76. Communications électroniques personnelles avec Mme Virginie Dormoy-Raclet, Ph. D., du laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine (5 septembre 2014).

laboratoire réalise des centaines de séquences par mois, ce qui les rend parfaitement à l'aise avec cette technique. Leur processus de développement a suivi celui recommandé par des organisations professionnelles internationales comme le Canadian College of Medical Geneticists (CCMG).

5.4 Recommandations d'autres organismes

Dans un effort pour combler le manque de lignes directrices concernant l'analyse moléculaire et la prise en charge clinique des patients ayant une prédisposition génétique aux leucémies myéloïdes, quelques auteurs se sont prononcés afin de lancer une réflexion sur les meilleures pratiques cliniques à adopter dans ces situations. Toutefois, aucune recommandation d'un organisme officiel n'a été repérée.

À titre d'information, mentionnons que le répertoire des analyses de laboratoire de l'hôpital SickKids de Toronto inclut l'analyse moléculaire de *TP53* dans le cas du syndrome de Li-Fraumeni, par séquençage complet et MLPA (délétions/duplications). Aucune analyse associée à *PAX5* n'a été trouvée, et celles concernant *RUNX1* visent toutes les translocations chromosomiques ou les fusions de gènes somatiques tumorales⁷⁷.

Par ailleurs, le *Registre des tests génétiques*⁷⁸ mentionne 6 laboratoires (5 américains et 1 allemand) approuvés par le CLIA⁷⁹ relativement aux anomalies plaquettaires familiales avec propension à la leucémie myéloblastique aigüe. Tous les laboratoires effectuent l'analyse complète de la séquence du gène, 3 font en plus l'analyse des délétions/duplications et 1 seul laboratoire (Medizinisch Genetisches Zentrum München) offre le séquençage de *PAX5* relativement à la prédisposition aux leucémies lymphoblastiques aigües (séquence complète et délétion/duplication). Concernant l'analyse moléculaire de *TP53* dans le cadre du syndrome de Li-Fraumeni, 10 laboratoires sont approuvés par le CLIA (8 américains et 2 européens). De ceux-ci, 3 offrent uniquement le séquençage complet, 1 uniquement la recherche de délétions/duplications et 6 les deux types d'analyse.

6. RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

La démonstration manifeste qu'une famille est atteinte par une mutation dans un gène de prédisposition aux tumeurs hématologiques ou autres conduira les cliniciens à surveiller plus étroitement les personnes jugées à risque. Cela pourrait se traduire, entre autres, par un décompte annuel complet des cellules sanguines et par l'analyse de biopsies de la moelle osseuse répétées advenant la présence d'anomalies [Churpek et Larson, 2013; Nickels *et al.*, 2013].

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été évaluées.

77. SickKids. Test Catalogue [site Web]. Disponible à : <http://www.sickkids.ca/paediatriclabmedicinems/test-catalogue/lab-services.html>.

78. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Genetic Testing Registry (GTR) [site Web]. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>.

79. Le *Clinical Laboratory Improvement Act* (CLIA) de 1988 vise à standardiser tous les tests réalisés sur des échantillons cliniques. Tous les laboratoires qui réalisent des analyses doivent être enregistrés au programme CLIA, dont les normes tiennent compte du niveau de complexité des tests effectués. La catégorie de complexité d'un test détermine les règles qu'un établissement doit suivre dans les domaines des épreuves de compétence, du contrôle et de l'assurance de la qualité, du type de personnel qui réalise les tests et de la prise en charge du test et du patient [AETMIS, 2008].

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

Dans l'éventualité où la recherche de mutations germinales dans les gènes de prédisposition aux tumeurs hématologiques chez une personne atteinte ou un donneur potentiel est réalisée, la personne concernée devrait être au fait des risques éventuels pour sa santé, des répercussions du suivi médical accru de même que de la responsabilité inhérente au partage de l'information avec les autres membres de la famille [Churpek et Larson, 2013; Nickels *et al.*, 2013].

7. EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La greffe de cellules souches allogéniques vise à traiter les formes aiguës des leucémies pédiatriques. Des cas d'échec de la greffe ont été rapportés en raison de l'utilisation d'un donneur apparenté porteur d'une mutation germinale héréditaire associée à un risque accru de tumeurs hématologiques. Le séquençage servirait à reconnaître un donneur apparenté lorsqu'il est démontré qu'il est porteur de ce type de mutation.

7.2 Validité clinique

Les gènes *RUNX1*, *PAX5* et *TP53* sont essentiels à l'hématopoïèse normale, à la différenciation des cellules B et à la suppression des tumeurs, respectivement. Les mutations germinales de *RUNX1* et *TP53* sont associées à des formes syndromiques de prédisposition au cancer. Récemment, *PAX5* a lui aussi été associé à une forme familiale de leucémie aiguë. Relativement au choix d'un donneur de greffe et à l'issue clinique de celle-ci, le séquençage de *RUNX1* a fait l'objet de plusieurs études cliniques. Par contre, seulement quelques familles ont été rapportées relativement à l'analyse de *PAX5* et *TP53* (non affectées du syndrome de Li-Fraumeni).

7.3 Validité analytique

Aucune étude de validité analytique publiée n'a été repérée. Toutefois, certaines études montrent que l'unique utilisation du séquençage direct afin de mettre en évidence des mutations germinales pathogéniques pourrait s'avérer moins sensible, notamment concernant les délétions/duplications ou le mosaïsme.

Le laboratoire du demandeur a procédé à la validation interne du protocole proposé. Le séquençage des régions codantes et des points de jonction introns-exons de 6 échantillons normaux, soit 2 échantillons par gène, a été réalisé. Quelques variations ponctuelles dans la séquence de tous les gènes ont ainsi été constatées.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Les cliniciens concernés sont de plus en plus au fait de l'impact que ces mutations peuvent avoir sur l'issue d'une greffe de cellules souches lorsque le donneur est choisi dans la fratrie. Certains ont publié des recommandations de pratique clinique à cet effet. Par contre, aucune recommandation provenant d'un groupe d'experts reconnu en oncologie pédiatrique n'a été repérée.

8. AVIS EN BREF DE L'INESSS

Panel leucémie prédisposition familiale : séquençage des gènes *RUNX1 (AML1)*, *PAX5* et *TP53*

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS). Analyses hors laboratoire dans le secteur privé. Rapport préparé par Carole St-Hilaire. ETMIS 2008;4(1):1-64.
- Auer F, Ruschendorf F, Gombert M, Husemann P, Ginzl S, Izraeli S, et al. Inherited susceptibility to pre B-ALL caused by germline transmission of PAX5 c.547G>A. *Leukemia* 2014;28(5):1136-8.
- Behjati S, Maschietto M, Williams RD, Side L, Hubank M, West R, et al. A pathogenic mosaic TP53 mutation in two germ layers detected by next generation sequencing. *PLoS One* 2014;9(5):e96531.
- Buijs A, Poddighe P, van Wijk R, van Solinge W, Borst E, Verdonck L, et al. A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood* 2001;98(9):2856-8.
- Churpek JE et Larson RA. The evolving challenge of therapy-related myeloid neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26(4):309-17.
- Downton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood* 1985;65(3):557-63.
- Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Rock J, Paschka P, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: Results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1364-72.
- Haute Autorité de Santé (HAS) et Institut National du Cancer (INCa). Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique – Leucémies aiguës de l'adulte. Saint-Denis la Plaine, France : HAS; 2011. Disponible à : http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-02/ald_30_gm_leucemies_aigues_adulte_web.pdf.
- Hof J, Krentz S, van Schewick C, Korner G, Shalapour S, Rhein P, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29(23):3185-93.
- Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013;45(3):242-52.
- Jacinthe P. Étude des interactions protéiques impliquant NPM-MLF1 dans la leucémie myéloïde aiguë. Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de maîtrise en Biologie Moléculaire. Montréal, Qc : Université de Montréal; 2008. Disponible à : https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/2694/Jacinthe_Patricia_2008_m%C3%A9moire.pdf.
- Jongmans MC, Kuiper RP, Carmichael CL, Wilkins EJ, Dors N, Carmagnac A, et al. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: Clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia* 2010;24(1):242-6.

- Li FP et Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969;71(4):747-52.
- Liew E et Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: A review of the literature. *Haematologica* 2011;96(10):1536-42.
- Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2011;2(4):475-84.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758-64.
- Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, Konig M, Mann G, Haas OA, Strehl S. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009;23(1):134-43.
- Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE, Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults. *Ther Adv Hematol* 2013;4(4):254-69.
- Nishimoto N, Imai Y, Ueda K, Nakagawa M, Shinohara A, Ichikawa M, et al. T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. *Int J Hematol* 2010;92(1):194-7.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999;401(6753):556-62.
- Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: Another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* 2004;23(24):4284-96.
- Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood* 2008;112(12):4639-45.
- Powell BC, Jiang L, Muzny DM, Trevino LR, Dreyer ZE, Strong LC, et al. Identification of TP53 as an acute lymphocytic leukemia susceptibility gene through exome sequencing. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(6):E1-3.
- Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 2009;113(22):5583-7.
- Ripperger T, Steinemann D, Gohring G, Finke J, Niemeyer CM, Strahm B, Schlegelberger B. A novel pedigree with heterozygous germline RUNX1 mutation causing familial MDS-related AML: Can these families serve as a multistep model for leukemic transformation? *Leukemia* 2009;23(7):1364-6.
- Shah S, Schrader KA, Waanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013;45(10):1226-31.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2014. Toronto, ON : SCC; 2014. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2014-FR.pdf>.

- Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):166-75.
- Stieglitz E et Loh ML. Genetic predispositions to childhood leukemia. *Ther Adv Hematol* 2013;4(4):270-90.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.
- Vousden KH et Lu X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):594-604.
- Zuckerman T et Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep* 2014;6:59.

ANNEXE A

Prédispositions héréditaires aux leucémies pédiatriques

MALADIE/SYNDROME	GÈNE	TRANSMISSION	TYPE	INCIDENCE DE LEUCÉMIE (%)
Leucémie familiale CEBPA	<i>CEBPA</i>	AD	SDM/LMA	Inconnue
Anomalie plaquettaire familiale	<i>RUNX1</i>	AD	SDM/LMA	35
Syndrome monomac	<i>GATA2</i>	AD	SDM/LMA	Inconnue
Monosomie 7	-	AD	LLA, SDM/LMA	Inconnue
Anémie de Diamond Blackfan	<i>RPS19, RPL5, RPL11</i>	Sp, AD, AR	LLA, SDM/LMA	2
Syndrome de Shwachman-Diamond	<i>SBDS</i>	AR	LLA, SDM/LMA	19-36
Thrombocytopénie amégacaryocytaire	<i>c-MPL</i>	AR	SDM/LMA	2
Thrombocytopénie/ absence de radius	<i>RBM8A</i>	AR, Sp	LMA, LLA	1
Dyskératose congénitale	<i>DKC1, TIN2, TERC, TERT, NOP10</i>	XL, AD, AR	SDM/LMA	2
Neutropénie congénitale sévère	<i>ELA2, HAX1, G6PC3, WASP</i>	AD, AR, XL	SDM/LMA	10
Syndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	AD	LLA	2-4
Neurofibromatose type 1	<i>NF1</i>	AD	JMML, SDM/LMA	Inconnue
Syndrome CBL	<i>CBL</i>	AD	JMML	< 1
Syndrome de déficit de la réparation des mésappariements	<i>PMS2, MSH6, MLH1, MSH2</i>	AR	LLA	Inconnue
Anémie de Fanconi	<i>FANC A-E, BRCA</i>	AR	LLA, LMA	10
Ataxie télangiectasie	<i>ATM</i>	AR	LLA	Inconnue
Syndrome des cassures de Nijmegen	<i>NBS1</i>	AR	LLA	50
Syndrome de Bloom	<i>BLM</i>	AR	LLA	12
Syndrome de Werner	<i>WRN</i>	AR	SDM/LMA	Inconnue
Rothmund-Thompson	<i>RECQL4</i>	AR	LMA	Inconnue
Syndrome de Wiskott-Aldrich	<i>WASP</i>	XL	LLA	13
Agammaglobulinémie de Bruton	<i>BTK</i>	XL	LLA	Inconnue
Trisomie 21	-	Sp	LLA, LMA	1-2

Adapté de Stieglitz et Loh, 2013.

ANNEXE B

Valeur pronostique des principales anomalies génétiques trouvées dans les cas de leucémie lymphoblastique aigüe de l'enfant

ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES	GÈNES IMPLIQUÉS	FRÉQUENCE PÉDIATRIQUE (%)	PRONOSTIC
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	4-6	Standard
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	3-5	Défavorable
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	2-3	Défavorable
Hyperdiploïdie	-	20-30	Favorable
Hypodiploïdie	-	5-6	Défavorable
t(12;21)	<i>ETV6-RUNX1</i>	25	Défavorable
LLA-T T(7;14)(14q;7q34 or 7p14)	TCR Non TCR (<i>NOTCH1</i> , <i>HOX11</i> , <i>JAK1</i>)	60	Favorable

Adapté de Zuckerman et Rowe, 2014.

ANALYSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL ET DES COMPLEXES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE (RÉFÉRENCE – 2014.02.09)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1. **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2. **Dates de transmission des demandes d'examen au MSSS** : 12 décembre 2013 et 14 janvier 2014
- 1.3. **Date de réception des demandes à l'INESSS** : 10 juillet 2014
- 1.4. **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom des technologies

Cinq demandes d'ajout au répertoire ont été reçues, concernant quatre techniques différentes destinées au diagnostic des maladies mitochondriales :

- dosages enzymatiques individuels des complexes I à V de la chaîne respiratoire mitochondriale par spectrophotométrie sur fibroblastes ou muscle;
- détection des complexes I à V de la chaîne respiratoire mitochondriale par BN-PAGE (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou électrophorèse Blue Native) sur fibroblastes ou muscle;
- Séquençage de l'ADN mitochondrial (méthode de Sanger)
- MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

2.2 Description brève des technologies et précisions techniques et cliniques

Analyses biochimiques des complexes I à V de la chaîne respiratoire mitochondriale

Selon l'information fournie par le demandeur, les analyses biochimiques mitochondriales (activité enzymatique par spectrophotométrie et BN-PAGE) sont faites à partir des tissus communément affectés tels que les muscles squelettiques, le muscle cardiaque et le foie ou à partir de fibroblastes en culture. Les tissus frais ou congelés sont traités afin de produire des fractions appropriées pour la mesure de l'activité enzymatique par la BN-PAGE. On obtient d'abord la fraction analytique H (homogénat) où les mitochondries sont libérées par rupture des parois cellulaires. Après une étape de centrifugation, on obtient un surnageant contenant des mitochondries intactes (fraction S). La fraction S1 est utilisée pour le dosage

des activités des complexes I à IV. Le dosage de l'activité du complexe V (sur tissu frais seulement) et l'extraction des complexes de la chaîne respiratoire pour l'électrophorèse Blue Native requièrent des étapes supplémentaires de purification à partir des mitochondries isolées. Spécifiquement, le dosage de l'activité du complexe V se fait après une étape de purification additionnelle afin de produire une fraction M. Cette étape est nécessaire afin de réduire les interférences causées par des enzymes présentes dans la fraction S1. Pour les échantillons de fibroblastes, une fraction enrichie en mitochondries doit être utilisée afin que le ratio des activités des complexes par rapport aux activités des contaminants enzymatiques soit plus élevé.

Dosages enzymatiques individuels par spectrophotométrie

Le dosage de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire est fait par spectrophotométrie à l'aide d'un analyseur automatisé. L'automate est à la fois muni de filtres qui permettent la mesure à chacune des longueurs d'onde requises et d'une sonde qui prélève des volumes précis de réactifs et d'échantillons en réponse à une programmation informatisée. Chacun des complexes est dosé dans une cuvette individuelle en utilisant une réaction chimique distincte. L'activité totale de chaque complexe est comparée à l'activité résiduelle en présence d'un inhibiteur qui lui est spécifique ou à l'activité initiale en l'absence de substrat. Pour évaluer adéquatement l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire, les résultats sont exprimés relativement au citrate synthase (enzyme codée par l'ADNn) en tant que marqueur enzymatique de l'abondance des mitochondries [Spinazzi *et al.*, 2011].

Détection des complexes I à V par électrophorèse Blue Native (BN-PAGE)

Il s'agit d'une technique d'électrophorèse non dénaturante développée par Schagger et von Jagow [1991] pour l'analyse de complexes protéiques membranaires tels que le système OXPHOS⁸⁰ mitochondrial constitué des complexes de la chaîne respiratoire. Cette technique permet de maintenir les complexes dans leur état natif biochimiquement actif et de les séparer sans les dissocier pour étudier leur organisation structurale. Afin de conserver l'état natif des complexes protéiques, on utilise le Serva Blue G (aussi appelé Bleu de Coomassie G250) dans les tampons d'extraction et de migration électrophorétique. Le Serva Blue G permet, tout comme le SDS (*sodium dodecyl sulfate*) utilisé dans l'électrophorèse conventionnelle, d'obtenir des complexes protéiques chargés nécessaires à la mobilité dans le champ électrique appliqué lors de l'électrophorèse sur gel. À la suite de la migration, les bandes de protéines obtenues sont transférées du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose et révélées à l'aide d'anticorps spécifiques des complexes (technique *western blot*). L'intensité des bandes est mesurée par densitométrie et les résultats sont exprimés sous forme de ratio en les rapportant sur le complexe II. Le complexe II, entièrement codé par l'ADN nucléaire (non affecté par des mutations à l'ADNmt), est un bon marqueur de l'abondance des mitochondries [DiMauro *et al.*, 2013]. Cette technique permet d'analyser la taille, l'assemblage et l'abondance relative des complexes individuels [Leary, 2012].

80. OXPHOS : phosphorylation oxydative, processus associé à la production d'ATP par les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Séquençage de l'ADN mitochondrial (méthode de Sanger)

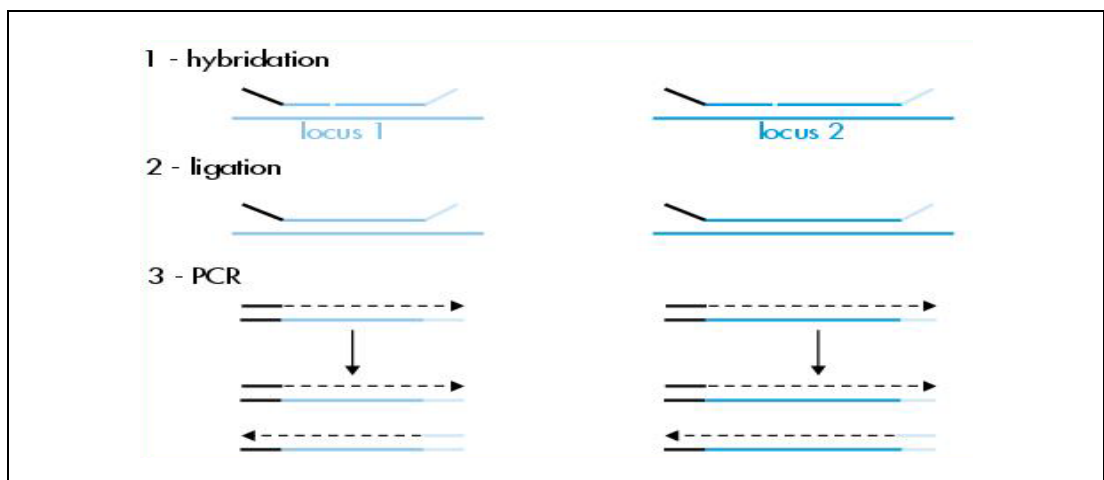
La description suivante est celle de la méthode classique décrite par Sanger. Nous n'avons pas reçu le détail de la méthode telle qu'utilisée par le requérant. La méthode de séquençage de type Sanger [Sanger *et al.*, 1977] comporte les étapes suivantes :

1. Choix d'une amorce spécifique complémentaire à un seul brin d'une matrice d'ADN amplifiée (par PCR ou RT-PCR);
2. La matrice d'ADN simple brin est mise en présence de l'amorce, de l'ADN polymérase et des quatre bases (désoxyribonucléotides triphosphates, soit A, G, T et C);
3. Le mélange est par la suite partagé en aliquots réactionnels contenant chacun une des quatre *bases-stop* marquées d'un fluorochrome unique (didésoxyribonucléotides triphosphates, soit A, G, T et C qui n'ont pas le groupement hydroxyle nécessaire à la synthèse) (ddNTP);
4. La réaction se poursuit jusqu'à l'incorporation d'une *base-stop* (ddNTP), ce qui se produit au hasard, empêche l'incorporation d'autres bases et arrête donc la synthèse d'un fragment;
5. On obtient ainsi quatre mélanges qui contiennent des fragments séparés en fonction de leur taille (par électrophorèse capillaire ou sur gel);
6. Un laser parcourt le capillaire et excite le fluorochrome du ddNTP terminal de chaque fragment séparé selon sa longueur;
7. La séquence de l'ADN original est révélée (p. ex. par un chromatogramme) puis habituellement analysée à l'aide d'un logiciel.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La MLPA est une technique qui permet de détecter une variation dans le nombre de copies d'un locus [Schouten *et al.*, 2002]. Il s'agit d'une méthode de détection ciblée qui possède l'avantage d'étudier plusieurs loci simultanément. Le principe est d'obtenir, pour chaque locus, un fragment amplifié de taille différente afin de les différencier et de les quantifier (figure 1).

Figure 1 Principe de la MLPA



Source : Keren et Sanlaville, 2008.

À chaque locus correspondent deux sondes de taille différente. Ces sondes comportent deux parties : l'une complémentaire à la séquence cible (hybridation spécifique) et l'autre nécessaire à l'amplification PCR de tous les loci étudiés. Chaque fragment peut alors être quantifié et comparé à un témoin, permettant ainsi la détection du nombre de copies d'un locus. Cette méthode est également utilisée pour détecter les délétions ou duplications impliquant une ou plusieurs régions dans l'ADN mitochondrial [Kwon *et al.*, 2011].

2.3 Société ou développeur : protocoles fournis par le demandeur

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

- Dosages enzymatiques et BN-PAGE : il s'agit de protocoles maison. L'ensemble des réactifs et solutions est préparé au laboratoire de génétique biochimique du centre demandeur, selon des procédures strictes et détaillées décrites dans les procédures opérationnelles normalisées (PON) fournies par le demandeur.
- Séquençage de type Sanger et MLPA : protocoles maison.

2.7 Valeurs pondérées

- Dosages enzymatiques : 713,46
- BN-PAGE : 410,52
- Séquençage ADN mitochondrial : 1524,43
- MLPA : 318,09
- Séquençage + MLPA : 1627,67

3. INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Ces analyses sont indiquées pour les patients qui ont reçu un diagnostic clinique de maladie mitochondriale ou dans les cas d'une forte suspicion de maladie mitochondriale.

3.2 Description des maladies visées

Les mitochondries sont les organites cellulaires responsables de la phosphorylation oxydative qui produit l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Ce processus est accompli par la chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale interne. Un mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale affectant le processus de phosphorylation oxydative est à l'origine des maladies mitochondriales. Ce groupe de maladies est reconnu comme le plus hétérogène génétiquement, impliquant à la fois le génome mitochondrial de 16,6 kb et environ 1500 gènes codés par le génome nucléaire [Tang *et al.*, 2013; Wong, 2013].

La chaîne respiratoire est constituée de cinq complexes (composés de 85 sous-unités) intégrés dans la membrane mitochondriale interne; le complexe I est le plus gros (plus de 40 sous-unités). Seulement 13 sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ainsi, chacun des cinq complexes est en partie codé par l'ADNmt et l'ADN nucléaire (ADNn),

excepté le complexe II qui est entièrement codé par l'ADNn [DiMauro *et al.*, 2013]. La chaîne respiratoire exécute une série de réactions d'oxydoréduction où les électrons provenant du cycle de Krebs et de la β -oxydation sont transférés d'un complexe à l'autre de façon concomitante à la création d'un gradient électrochimique de protons, permettant ultimement la formation d'ATP par le complexe V [DiMauro *et al.*, 2013].

Le rôle des mitochondries dans la chaîne de production énergétique (production d'ATP) explique l'atteinte préférentielle des organes et tissus qui en dépendent, tels que les muscles squelettiques et cardiaque et le système nerveux central. Les maladies mitochondriales se manifestent par un large éventail de phénotypes cliniques allant d'une maladie multisystémique précoce avec détérioration rapide et décès à un jeune âge à une légère intolérance à l'exercice se présentant à un âge avancé [Rodenburg *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2007]. Certaines caractéristiques cliniques suggèrent la présence d'une maladie mitochondriale (retard de croissance, encéphalopathie, cardiomyopathie, intolérance à l'exercice, anomalies ophtalmologiques, faiblesse musculaire, etc.) tandis que d'autres signes et symptômes sont spécifiques à certains syndromes [Liang *et al.*, 2014]. Bien que les maladies mitochondriales multisystémiques impliquent à la fois l'ADN mitochondrial et nucléaire, certains syndromes sont associés spécifiquement à des mutations de l'ADNmt (KSS, PS, MELAS, MERRF, NARP, MILS, LHON) et d'autres à l'ADNn (MNGIE, SANDO, syndrome d'Alpers, DOA⁸¹) [DiMauro *et al.*, 2013].

On rapporte maintenant plus de 300 mutations ponctuelles, délétions et duplications dans l'ADNmt [Vafai et Mootha, 2012]. Des mutations ont été reconnues dans les cinq complexes de la chaîne respiratoire, mais la plupart l'ont été dans les gènes du complexe I affectant 16 de ses 45 sous-unités [DiMauro *et al.*, 2013]. Ainsi, le déficit du complexe I est l'anomalie la plus fréquente chez les patients atteints de maladie mitochondriale, et le syndrome de Leigh associé à ce déficit est la présentation clinique la plus fréquemment observée [Leshinsky-Silver *et al.*, 2009]. Le déficit du complexe I compte pour 23 % de tous les cas chez l'enfant [Hoefs *et al.*, 2010]. Les déficits des complexes II, III, IV et V sont quant à eux plus rares [Menezes *et al.*, 2014]. À cet égard, un moins grand nombre de gènes nucléaires ont été associés à des déficits de ces complexes par comparaison avec le complexe I [Menezes *et al.*, 2014].

Épidémiologie

Selon des données recueillies en Angleterre sur une période de 15 ans (1990 à 2004), la prévalence des maladies de l'ADNmt chez les adultes en âge de travailler (16 à 65 ans) est de 9,18 sur 100 000 (IC à 95 % : de 7,8 à 10,8 sur 100 000). De plus, chez les apparentés asymptomatiques du premier degré de patients avec mutations ponctuelles de l'ADNmt, adultes et enfants, la prévalence est de 16,5 sur 100 000 (IC à 95 % : 14,8 à 18,3 sur 100 000) [Schaefer *et al.*, 2008]. Aucune information quant à la prévalence des maladies mitochondriales au Québec n'a pu être trouvée.

Pronostic

Le pronostic des patients ayant un déficit du complexe I lié à l'ADN nucléaire est généralement très défavorable [Distelmaier *et al.*, 2009]. Plus de la moitié des patients décèdent avant l'âge de 2 ans et 79 % décèdent avant l'âge de 10 ans [Koene *et al.*, 2012].

81. DOA : *dominant optic atrophy*; KSS : *Kearns-Sayre syndrome*; LHON : *Leber hereditary optic neuropathy*; MELAS : *mitochondrial encephalomyopathy*; MERRF : *myoclonus epilepsy with ragged-red fibres*; MILS : *maternally inherited Leigh syndrome*; MNGIE : *mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy*; NARP : *neuropathy ataxia and retinitis pigmentosa*; PS : *Pearson syndrome*; SANDO : *sensory ataxic neuropathy dysarthria and ophthalmoparesis*.

Les patients ayant un déficit du complexe I lié à l'ADNmt ont une survie supérieure à ceux dont le déficit du complexe I est d'origine nucléaire, bien que cette différence ne soit pas significative [Swalwell et al., 2011].

Traitement

Seuls des traitements de soutien peuvent être offerts afin de prolonger et d'améliorer la qualité de vie des patients atteints. Parmi ceux-ci, signalons l'aide respiratoire, la chirurgie des paupières (cas de ptosis) et de la cataracte ainsi que les médicaments antiépileptiques [Genge et Massie, 2014; DiMauro *et al.*, 2013; Pfeffer et Chinnery, 2013].

3.3 Nombre de patients visés

- Dosage enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire et BN-PAGE : le volume provincial attendu est de 100 cas par année.
- Séquençage et MLPA : le volume provincial attendu est de 15 cas par année (volume minimal de 50 tests pour les trois prochaines années).

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Biochimie médicale, biologie moléculaire, génétique moléculaire, cardiologie, neurologie, ophtalmologie, conseil génétique.

3.5 Modalités d'administration des tests

Les descriptions qui suivent sont basées notamment sur l'information fournie par le demandeur.

- 1 Biopsie musculaire : un spécimen de 250 mg est prélevé sous anesthésie locale ou générale. Il est envoyé à l'état frais (délai maximal de 2 heures postprélèvement) ou sur glace sèche (pouvant donc provenir de partout au Québec) directement au laboratoire de génétique biochimique du centre demandeur. En fonction des analyses demandées par le médecin prescripteur (selon l'algorithme présenté à l'annexe A), l'échantillon sera divisé en aliquots et, au besoin, une partie sera acheminée au laboratoire de diagnostic moléculaire pour séquençage de l'ADN mitochondrial. Le cas échéant, les autres aliquots seront utilisés pour l'analyse enzymatique ou BN-PAGE.
- 2 Biopsie cutanée : les échantillons prélevés sont mis en culture au laboratoire de génétique biochimique. Lorsque la biopsie cutanée est faite dans un autre centre hospitalier universitaire, la culture des fibroblastes est réalisée sur place. Après obtention du nombre adéquat de flacons de cellules, le tout est envoyé au laboratoire de génétique biochimique du centre demandeur pour l'analyse enzymatique ou BN-PAGE. Au besoin et selon l'algorithme présenté en annexe, des fibroblastes sont envoyés au laboratoire de biologie moléculaire pour extraction et séquençage de l'ADN mitochondrial.
- 3 Échantillons sanguins : un tube de sang EDTA est acheminé au laboratoire de biologie moléculaire pour effectuer l'extraction de l'ADN et l'analyse.

Pour les analyses biochimiques (dosages enzymatiques et BN-PAGE), le temps de réponse sera d'environ 8 semaines; dans le cas des fibroblastes, la culture cellulaire seule prend environ 4 semaines. La périodicité sera de 2 à 4 semaines, variable en fonction des volumes qui seront reçus. Pour les tests moléculaires (ADN mitochondrial), le temps de réponse sera de un mois suivant la réception de l'échantillon.

L'algorithme de diagnostic intégré pour les échantillons provenant de patients chez qui une maladie mitochondriale est soupçonnée et l'algorithme de diagnostic moléculaire des maladies de l'ADN mitochondrial annexés à la demande d'addition sont présentés à l'annexe A.

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

La mesure de l'activité des enzymes (complexes I à V) de la chaîne respiratoire par spectrophotométrie et la quantification des complexes par BN-PAGE sont deux techniques complémentaires. L'analyse moléculaire de l'ADNmt est également complémentaire aux analyses biochimiques. Elle permet de repérer deux catégories de mutations : les grandes délétions et duplications (par MLPA) et les mutations ponctuelles (par séquençage par la méthode de Sanger).

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

La recherche des maladies mitochondriales est faite principalement à quatre niveaux : métabolique, histochimique, biochimique et génétique. Les analyses métaboliques apportent des éléments en faveur ou non d'une maladie mitochondriale. Toutefois, seules les analyses biochimiques et moléculaires permettent de confirmer le diagnostic. La présentation clinique et les antécédents familiaux du patient, les techniques d'imagerie et les analyses histochimiques musculaires font également partie intégrante de l'ensemble des aspects qui sont pris en considération dans l'exploration et le diagnostic associés à ce groupe diversifié de maladies. La stratégie diagnostique de Chausseot et ses collaborateurs (annexe B) démontre bien la complexité et le caractère multidisciplinaire du diagnostic des maladies mitochondriales [Chausseot *et al.*, 2011].

Analyses métaboliques

Les analyses métaboliques les plus courantes sont : la recherche d'acidose lactique par dosage du lactate, le rapport lactate/pyruvate, le rapport des corps cétoniques 3-hydroxybutyrate/acétoacétate, la chromatographie des acides aminés sanguins, la créatine kinase sérique et le FGF-21 (*fibroblast growth factor 21*) [DiMauro *et al.*, 2013; Chausseot *et al.*, 2011].

L'acidose lactique est caractéristique de toutes les maladies mitochondriales, mais celles-ci ne sont pas toujours présentes ni forcément sévères; la créatine kinase sérique est modérément élevée dans la plupart des maladies mitochondriales, et le dosage du FGF-21 n'est pas largement utilisé bien que son exactitude diagnostique soit meilleure que celle des biomarqueurs conventionnels, y compris le lactate [DiMauro *et al.*, 2013].

Histochimie musculaire

En dépit de son caractère invasif, la biopsie musculaire demeure l'étalon or pour le diagnostic des maladies mitochondriales. L'analyse histochimique de coupes congelées de tissu musculaire par coloration de l'enzyme succinate déshydrogénase (SDH, complexe II de la chaîne respiratoire) et cytochrome c oxydase (COX, complexe IV de la chaîne respiratoire) fournit d'importantes indications diagnostiques relativement à l'activité de la chaîne respiratoire [DiMauro *et al.*, 2013; Pfeffer et Chinnery, 2013].

Une caractéristique histologique de certaines myopathies mitochondriales est la présence de fibres musculaires rouges irrégulières (*ragged red fibers* ou RRF) mises en évidence par

coloration au trichrome de Gomori modifié. La présence de RRF est indicative de la prolifération et de l'accumulation de mitochondries à la périphérie des fibres musculaires [Sarnat et Marin-Garcia, 2005].

Analyses biochimiques

Présentement, la mesure de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire de tissus congelés est faite au Nijmegen Centre for Mitochondrial Disorders (Pays-Bas), au coût unitaire de 1 400 \$CAD. Le problème associé est qu'il n'est pas possible d'effectuer la mesure du complexe V sur les tissus congelés. Conséquemment, les analyses réalisées sont partielles et ne permettent pas d'éliminer complètement un défaut de la chaîne respiratoire.

Analyses génétiques

L'analyse de l'ADN mitochondrial débute généralement par un criblage des mutations ponctuelles courantes et des grandes délétions par PCR en temps réel, PCR sur longs fragments (*long-range PCR*) ou par MLPA [Pfeffer *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2011; Finsterer *et al.*, 2009]. Si les résultats sont négatifs, le séquençage du génome mitochondrial en entier est couramment effectué par la méthode de Sanger [Tang *et al.*, 2013]. Le séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing* ou NGS) est une technique récente qui permet de détecter les mutations ponctuelles courantes et rares ainsi que les délétions, en plus de mesurer le niveau d'hétéroplasmie⁸² [Tang *et al.*, 2013]. Toutefois, l'interprétation de la signification clinique des mutations ou des variants détectés par cette technique est complexe en raison de la nature hautement polymorphique de l'ADNmt [Liang *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2013; Wong, 2013].

L'analyse de l'ADNmt est actuellement réalisée au Baylor College of Medicine (Texas, USA), au coût unitaire de 3 000 \$USD.

4.3 Brève description des avantages évoqués des nouvelles technologies

La spectrophotométrie et la BN-PAGE permettent toutes les deux de préciser le diagnostic. À cet égard, quelques exemples démontrant la pertinence de ces deux analyses ont été fournis par le demandeur.

- Un défaut léger et ambigu est confirmé si les deux tests sont anormaux. Cela peut se présenter chez les patients adultes avec une atteinte clinique plus légère.
- Un défaut au niveau de la coenzyme Q est vu uniquement au dosage enzymatique.
- Un défaut au site catalytique des enzymes est vu uniquement au dosage enzymatique.
- Dans certains cas, l'activité des enzymes est normale, mais l'analyse clinique est révélatrice d'une maladie mitochondriale. La BN-PAGE montrera alors un défaut d'assemblage d'un des cinq complexes et confirmera le diagnostic.
- Lorsqu'une quantité très limitée de tissu est disponible, l'analyse BN-PAGE sera réalisée puisqu'elle exige moins de matériel que l'analyse de l'activité enzymatique.

Ces analyses évaluant la fonction de la chaîne respiratoire permettent de mettre en évidence un déficit isolé d'un complexe ou un déficit combiné suggérant, par exemple, la

82. L'hétéroplasmie est une caractéristique des maladies génétiques mitochondriales pour lesquelles peuvent coexister des copies normales et mutantes du génome mitochondrial à l'intérieur d'un tissu ou d'un organe. Lorsque toutes les molécules d'ADNmt sont identiques (normales ou mutantes), il s'agit d'homoplasmie. L'expression clinique (phénotype) d'une mutation pathogénique de l'ADNmt est largement déterminée par la proportion relative de copies de génomes normales et mutantes dans les tissus, aussi appelée niveau d'hétéroplasmie [Dimauro et Davidzon, 2005].

présence d'une délétion mitochondriale. Cela permettra, par la suite, d'orienter et de cibler le diagnostic moléculaire. Le séquençage de l'ADN mitochondrial et la MLPA sont ainsi tout à fait complémentaires aux analyses biochimiques.

Le tissu musculaire frais est préférable au tissu congelé car il permet de mesurer l'activité de tous les complexes de la chaîne respiratoire, y inclus le complexe V pour lequel les analyses sur tissus congelés sont moins fiables (information fournie par le demandeur, [Kirby *et al.*, 2007]). Selon le demandeur, l'utilisation de tissu frais constituerait un argument en faveur de l'offre de ces analyses localement.

4.4 Coût de la technologie et des options : information non disponible.

5. DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

La spectrophotométrie et la BN-PAGE ne remplacent aucune analyse présentement inscrite dans le répertoire du MSSS pour le diagnostic des maladies mitochondriales. Toutefois, la BN-PAGE était dans le répertoire (code 50047), mais elle a été retirée en 2011 (possiblement effectuée uniquement dans un laboratoire de recherche à ce moment –là information du demandeur). Ces deux méthodes complémentaires permettent généralement d'obtenir des résultats similaires, mais certains déficits peuvent être révélés préférentiellement avec l'une ou l'autre de ces deux méthodes⁸³.

Le séquençage de l'ADNmt et la MLPA remplaceraient l'analyse moléculaire de l'ADNmt actuellement acheminé hors Québec; cette analyse était en partie réalisée au Québec dans le passé, par un laboratoire de recherche. Ces techniques ne permettent pas de déceler des mutations de gènes nucléaires pour lesquels l'envoi d'échantillons à l'extérieur est également requis (voir le point 8 dans l'algorithme du demandeur, annexe A).

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Une confirmation du diagnostic est essentielle pour :

- optimiser la prise en charge de la maladie et le suivi des patients;
- offrir un traitement de soutien afin d'améliorer la qualité de vie des patients atteints;
- déterminer le type et la fréquence des analyses de suivi;
- prédire l'évolution de la maladie chez les individus atteints;
- offrir un conseil génétique approprié aux familles ainsi qu'un diagnostic prénatal.

Aucune étude recensée n'a porté sur l'utilité de ces analyses pour le patient, en termes de mortalité, morbidité, qualité de vie, etc.

Le diagnostic des maladies mitochondriales est complexe en raison de l'implication des génomes mitochondrial et nucléaire, du niveau d'hétéroplasmie et de la ségrégation mitotique (changement de phénotype avec l'âge) [Liang *et al.*, 2014; DiMauro et Davidzon, 2005]. La faible corrélation génotype-phénotype peut compromettre l'exactitude du diagnostic clinique [Liang *et al.*, 2014]. Quelques études récentes ont permis d'illustrer la valeur diagnostique de l'analyse des complexes de la chaîne respiratoire et des mutations

83. Information tirée d'une lettre de la Dre Catherine Brunel-Guitton, datée du 7 janvier 2014.

de l'ADNmt ou de l'ADNn (tableau 1).

Tableau 1 Valeur diagnostique de l'analyse des complexes de la chaîne respiratoire et des mutations de l'ADNmt ou de l'ADNn

ÉTUDE	CAS/COHORTE	DIAGNOSTIC	MÉTHODE	TISSUS	VALEUR DIAGNOSTIQUE
Budde <i>et al.</i> , 2000	N = 2	Syndrome de type Leigh	Dosage de l'activité enzymatique Séquençage direct	Muscle Fibroblastes	↓ de l'activité CI et CIII Mutation ADNn gène <i>NDUFS4</i>
Leshinsky-Silver <i>et al.</i> , 2009	M, 28 mois	Syndrome de Leigh	Spectrophotométrie CI à CV BN-PAGE CI à CIV Séquençage ADNmt et ADNn	Muscle frais Fibroblastes	↓ partielle de l'activité du CI (muscle) Activité CI normale (fibroblastes) Défaut d'assemblage CI 2 mutations du gène <i>NDUFS4</i>
Hoefs <i>et al.</i> , 2010	N = 3 (enfants)	Symptômes variés Activité CI résiduelle faible	Séquençage direct BN-PAGE 2D BN/SDS-PAGE <i>in-gel activity</i> Spectrophotométrie	Muscle frais Muscle congelé Fibroblastes	↓ sévère de l'activité du CI (< 30 % de la plus faible valeur de contrôle) 5 mutations du gène <i>NDUFS1</i>
Kwon <i>et al.</i> , 2011	M, 45 ans	CPEO, ptosis	MLPA Sanger Gap-PCR	Sang Muscle	Détection de la délétion du segment de 4,407bp ADNmt
Assouline <i>et al.</i> , 2012	N = 7	Syndrome de Leigh et déficit CI	BN-PAGE	Fibroblastes	Mutations du gène <i>NDUFS4</i> associées à un profil BN-PAGE anormal
Pfeffer <i>et al.</i> , 2014	N = 68 (adultes)	CPEO avec ou sans délétions de l'ADNmt	Sanger MLPA Séquençage de l'exome entier qRT-PCR, histochimie, <i>western blot</i>	Muscle squelettique	Délétions d'exons, mutations hétérozygotes simples et composées du gène <i>SPG7</i>

Abréviations : ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial; ADNn : acide désoxyribonucléique nucléaire; BN-PAGE : *blue native polyacrylamide gel electrophoresis*; bp : *base pair*, paires de bases en français; CI : complexe I; CIII : complexe III; CIV : complexe IV; CV : complexe V; CPEO : *chronic progressive external ophthalmoplegia*; M : mâle; qRT-PCR : réaction en chaîne de la polymérase-transcription inverse ou *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*.

Deux études de cas et une étude de cohorte ont porté sur l'importance de l'analyse des complexes de la chaîne respiratoire (activité enzymatique et détection des complexes I à IV) pour guider le diagnostic moléculaire. Celle de Budde et ses collaborateurs portant sur deux patients avec syndrome de type Leigh a montré qu'une mutation dans le gène *NDUFS4* (codant pour une sous-unité du complexe I) peut causer un déficit combiné en complexe I et III, et elle suggère qu'une recherche de mutations dans ce gène soit réalisée chez les patients présentant ce type de déficit combiné [Budde *et al.*, 2000]. Dans un autre cas de syndrome de Leigh, on a observé un déficit partiel de l'activité du complexe I dans le tissu musculaire avec un résultat normal dans les fibroblastes en culture. L'analyse d'un groupe de mutations associées au syndrome de Leigh n'a révélé la présence d'aucune mutation

pathogène. Par ailleurs, les résultats de BN-PAGE ont révélé un défaut d'assemblage du complexe I impliquant la possibilité de détecter des mutations dans le gène *NDUFS4* (sous-unité du complexe I). Deux mutations ont été détectées dans ce gène. Ainsi, les auteurs concluent que la BN-PAGE constitue un outil important pour orienter le diagnostic moléculaire [Leshinsky-Silver *et al.*, 2009]. Une étude sur sept patients atteints du syndrome de Leigh avec un déficit en complexe I a démontré que la présence de mutations du gène *NDUFS4* était associée à un profil BN-PAGE anormal révélant un défaut d'assemblage du complexe I [Assouline *et al.*, 2012]. Les auteurs concluent que la BN-PAGE permet de repérer les patients susceptibles d'avoir des mutations du gène *NDUFS4* et de mieux les cibler avant d'effectuer un séquençage de l'ADN.

Une étude de cas portant sur trois patients a montré que la présence de mutations dans le gène *NDUFS1* du complexe I de la chaîne respiratoire permet d'expliquer la très faible activité résiduelle du complexe I (< 30 % de la plus faible valeur de contrôle) exprimée dans les fibroblastes en culture de ces patients [Hoefs *et al.*, 2010]. Une étude d'un cas de CPEO, un type de myopathie mitochondriale avec ptosis bilatérale progressive, montre que la MLPA a détecté la délétion d'un segment de 4,407 bp d'ADNmt; la délétion a été ensuite confirmée par gap-PCR et séquençage par la méthode de Sanger [Kwon *et al.*, 2011]. Une étude de cohorte récente regroupant 68 patients atteints de CPEO, dont l'objectif était de comprendre le fondement génétique de cette maladie, montre que des mutations du gène *SPG7* seraient une cause importante de la CPEO associée à de multiples délétions à l'ADNmt [Pfeffer *et al.*, 2014].

Par ailleurs, un conseil génétique approprié ainsi qu'un diagnostic prénatal ont été proposés afin d'informer les familles concernées à propos de la possibilité d'une récurrence de maladies mitochondriales. À titre d'exemple, dix couples qui avaient déjà donné naissance à un enfant atteint de maladie mitochondriale ont reçu un diagnostic prénatal réalisé par la mesure de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire sur les cellules chorales (12 tests) ou les amniocytes (16 tests) prélevés à l'occasion de 21 grossesses [Faivre *et al.*, 2000]. Dans 7 des 21 grossesses, le test a été réalisé deux fois, à la fin du premier et du deuxième trimestre. Douze nouveau-nés en santé dont le résultat était normal sont demeurés en santé après un suivi qui a dépassé l'âge du début de la maladie chez le cas de référence, sept grossesses ont été interrompues en raison de la détection d'un déficit enzymatique dont cinq ont été confirmés par analyse des tissus et deux fœtus en apparence normaux au moment du diagnostic prénatal se sont révélés affectés à la naissance. Les auteurs concluent qu'un déficit d'activité enzymatique est indicatif de récurrence, mais qu'un résultat normal à dix semaines de gestation n'est pas nécessairement concluant. Des lignes directrices sont également proposées, qui mentionnent, entre autres, le fait que l'activité du complexe I ne peut être adéquatement mesurée dans les cellules fœtales.

Une étude de cas plus récente montre qu'un défaut d'assemblage du complexe I de la chaîne respiratoire mis en évidence par BN-PAGE a permis d'orienter l'analyse moléculaire et de confirmer le diagnostic. Sur la base de ces résultats, un diagnostic prénatal a été réalisé à l'occasion de la grossesse suivante [Leshinsky-Silver *et al.*, 2009].

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)		X	
Valeur prédictive négative (VPN)		X	
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

Les résultats d'une étude de cohorte de 57 patients ayant des mutations bien caractérisées à l'ADNmt associées à des déficits de l'activité de complexes de la chaîne respiratoire révèlent que l'analyse de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire ne serait pas suffisamment sensible (bien que spécifique) pour diagnostiquer la myopathie mitochondriale chez les patients qui ont des mutations des gènes de l'ARN de transfert (ARNt) [Wibrand *et al.*, 2010]. Une réduction de l'activité enzymatique d'un ou de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire a été observée chez 10 % des patients ayant la mutation 3243A>G. Par ailleurs, 83 % des patients avaient d'autres mutations ponctuelles et 62 % des patients des mutations avec délétions. L'analyse enzymatique a été comparée à l'histochimie des fibres musculaires, au dosage du lactate et à la mesure du VO₂max. L'histochimie anormale du muscle semble être un meilleur indicateur de myopathie mitochondriale que l'activité enzymatique (sensibilité globale de 77 % et 39 % respectivement). Le dosage du lactate et la mesure du VO₂max ont une sensibilité de 50 % et 27 % respectivement. La spécificité des quatre tests est par ailleurs très élevée (93 à 100 %).

Deux études de cohorte rétrospectives basées sur la révision de bases de données ont mis en évidence la variabilité phénotypique de mutations fréquemment rapportées dans la littérature. La première étude de cohorte constituée de 129 patients [Nesbitt *et al.*, 2013] a révélé que, bien que la mutation 3243A>G dans le gène *MTTL1* de l'ADNmt soit détectée dans la majorité des cas de syndrome MELAS⁸⁴, seulement 10 % des patients de cette cohorte présentaient le phénotype classique de MELAS. Une grande proportion de patients (30 %) présentait le syndrome MIDD⁸⁵, 28 % une diversité de caractéristiques cliniques non apparentées à un syndrome classique associé à cette mutation, et 9 % des patients étaient asymptomatiques. La seconde étude constituée de 42 patients a révélé que la majorité des patients ayant la mutation 8344A>G (ADNmt) ne présentaient pas le syndrome MERRF⁸⁶ classique [Mancuso *et al.*, 2013]. Bien que cette mutation soit rapportée comme étant la cause principale de ce syndrome [Shoffner *et al.*, 1990], celle-ci se manifeste également sous une grande variété de phénotypes.

84. MELAS : *mitochondrial encephalomyopathy*.

85. MIDD : *maternally inherited deafness and diabetes*.

86. MERRF : *myoclonus epilepsy with ragged-red fibres*.

Une étude portant sur le cas d'une personne âgée de 53 ans se présentant avec le phénotype NARP⁸⁷ classique, principalement associé à la mutation m.8993T>C/G de la sous-unité 6 de l'ATP synthase (complexe V), a permis de détecter une nouvelle mutation ponctuelle [Duno *et al.*, 2013]. L'analyse pour trois mutations courantes à l'ADNmt : m.3243A>G (associée au syndrome MELAS), m.8344A>G (associée au syndrome MERRF) et c.8993T>G/C (associée au syndrome NARP) a révélé des séquences normales mais la présence hétéroplasmique de la mutation m.8989G>C dans le sang. Sur le plan musculaire, une diminution de l'activité du complexe V corrobore l'effet pathogénique de la mutation m.8989G>C.

Quelques études montrent la prévalence de détection des mutations de l'ADNmt et de l'ADNn associées à divers phénotypes mitochondriaux (tableau 2).

Tableau 2 Prévalence des mutations associées aux maladies mitochondriales

ÉTUDE	TECHNIQUE	PHÉNOTYPE	NOMBRE DE CAS	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATIONS (%)	TYPE DE MUTATION
Swalwell <i>et al.</i> , 2011	dHPLC, NGS, RFLP	Leigh, MELAS, myopathie mitochondriale, encéphalomyopathie	109	30 (27,5) 44 (40,4)	18 faux-sens ADNmt Ponctuelles AR et délétions ADNn
Janer <i>et al.</i> , 2012	Séquençage du génome (confirmé par Sanger)	Encéphalopathie	1	1 (100)	1 faux-sens, homozygote
Nesbitt <i>et al.</i> , 2013	Séquençage direct	Syndrome de Leigh	4	3 (75)	3 faux-sens
Ma <i>et al.</i> , 2014	PCR	Déficit complexe I, phénotypes hétérogènes	62	32 (51,6)	24 faux-sens dans 15 gènes mitochondriaux

Abréviations : ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial; ADNn : acide désoxyribonucléique nucléaire; AR : autosomique récessif; dHPLC : *denaturing high pressure liquid chromatography*; MELAS : *mitochondrial encephalomyopathy*; NGS : *next generation sequencing*; PCR : *polymerase chain reaction*; RFLP : *restriction fragment-length polymorphism*.

Le déficit du complexe I est l'anomalie la plus fréquemment observée chez les patients atteints d'une maladie mitochondriale, et le syndrome de Leigh associé à ce déficit est la présentation clinique la plus fréquente [Leshinsky-Silver *et al.*, 2009]. L'étude de Swalwell [2011] portant sur les données cliniques et génétiques de 109 patients ayant reçu un diagnostic de maladie mitochondriale avec déficit du complexe I montre l'association entre les différents phénotypes et les mutations des différents gènes de l'ADNmt (tableau 3).

Des mutations pathogènes à l'ADNmt ont été repérées chez 30 des 109 patients (28 %) dont 15 étaient atteints du syndrome de Leigh. Les auteurs rapportent que ces mutations avaient déjà été décrites dans d'autres études et qu'elles étaient considérées comme étant pathogéniques. Dans la moitié des cas, le pourcentage de charge mutationnelle ou hétéroplasmie est égal ou supérieur à 90. Généralement, plus l'hétéroplasmie est élevée, plus la maladie est grave [Steffann *et al.*, 2014].

87. NARP : *neuropathy, ataxia, retinitis, pigmentosa*.

En analysant l'ADN maternel de 19 des 29 probands, Swalwell et ses collègues [2011] ont aussi montré que la charge mutationnelle est beaucoup plus faible dans les tissus des mères que dans ceux de leurs enfants atteints de la maladie. Dans huit cas, aucune mutation n'a été détectée chez la mère, ce qui pourrait indiquer qu'il s'agit de mutations *de novo* chez les enfants ou bien que la mutation n'a pas été détectée. Il faut préciser ici que le tissu analysé provenant de la mère était généralement du sang.

Tableau 3 Mutations à l'ADNmt associées au déficit du complexe I de la chaîne respiratoire

	GÈNE (NOMBRE DE PATIENTS)	MUTATION (NOMBRE DE PATIENTS)	% CHARGE MUTATIONNELLE	TISSU
MELAS (n = 7)	MTND1 (3)	m.3697G>A (1) m.3946G>A (1) m.3949T>C (1)	80 60 93	Muscle
	MTTL1 (4)	m.3243A>G (3) m.3271C>T (1)	de ≈ 60 à ≈ 70 > 98	Muscle
LS (n = 14)	MTND3 (2)	m.10158T>C (2)	91 et 97	Muscle
	MTND5 (6)	m.12706T>C (1) m.13094T>C (1) m.13513G>A (4)	65 ≈ 60 de 26 à 44	Muscle Muscle Divers*
	MTND6 (6)	m.14487T>C (2) m.14453G>A (1) m.14459G>A (3)	> 98 41 95 et 97	Muscle/fibroblastes Fibroblastes Muscle/fibroblastes†
ME (n = 4)	MTND3 (2)	m.10197G>A (2)	≈ 90 et ≈ 100	Muscle/sang
	MTND6 (1)	m.14487T>C (1)	> 98	Muscle
	MTTL1 (1)	m.3242A>G (1)	> 98	Muscle
MM (n = 2)	MTTL1 (2)	m.3250A>G (1) m.3303C>T (1)	81 97	Muscle
LIMD (n = 3)	MTND3 (2)	m.10158T>C (1) m.10191T>C (1)	> 98 > 98	Muscle Foie
	MTTW (1)	m.5567T>C (1)	> 90	Muscle

Source : adapté de Swalwell *et al.*, 2011.

Abréviations : LIMD : *lethal infantile mitochondrial disease*; LS : *Leigh syndrome*; ME : *mitochondrial encephalomyopathy*; MELAS : *mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis, stroke-like episodes*; MM : *mitochondrial myopathy*; n : nombre de patients.

* Pour chacun de 4 patients, les % de charge mutationnelle sont : 31 (muscle), 44 (fibroblastes), 30 (sang) et 26 (muscle).

† Pour chacun de 3 patients, les % de charge mutationnelle sont : 95 (muscle); 97 (fibroblastes), 97 (muscle).

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité	x		
Reproductibilité	x		
Sensibilité analytique	x		
Spécificité analytique	x		
Effet de matrice			x
Concordance	x		
Corrélation entre test et comparateur		x	

Validation interne des analyses biochimiques

Le demandeur mentionne, dans une lettre concernant la demande d'addition adressée au MSSS (en annexe), que la validation interne des tests mitochondriaux (dosage enzymatique et BN-PAGE) est terminée. À titre d'exemple, les résultats de quatre cas de patients ont été présentés avec la demande. Selon l'information reçue du demandeur, le processus de validation a été réalisé par l'analyse de 25 cas positifs (avec déficit du complexe de la chaîne respiratoire). Ces cas ont également été acheminés au centre de référence aux Pays-Bas, et les déficits détectés ont été confirmés.

Contrôle de qualité interne

Chaque dosage d'activité enzymatique est réalisé sur deux aliquots préparés à partir d'une biopsie de tissu ou d'une même culture de fibroblastes. Chaque aliquot est dosé sur deux journées différentes en utilisant des réactifs fraîchement préparés. La moyenne des deux résultats pour chacun des complexes est calculée et transmise au médecin requérant si les valeurs de chacune des mesures ne s'écartent pas de plus de 10 % de la moyenne. Si tel est le cas, une troisième mesure doit être faite sur un troisième aliquot avec des réactifs récemment préparés et la moyenne des deux valeurs les plus proches est rapportée.

La fiabilité des résultats est assurée par l'analyse en parallèle de témoins normaux de fibroblastes et de muscle. Des valeurs de référence ont été établies pour chacun des cinq complexes.

Pour les analyses génétiques de l'ADN mitochondrial, des échantillons de tissu des patients dont le test s'est révélé positif d'après un laboratoire diagnostique externe (Europe, USA) seront analysés à titre de contrôle interne.

Contrôle de qualité externe

Selon le demandeur, il n'existe actuellement aucun programme de contrôle externe de la qualité pour les analyses enzymatiques et la technique BN-PAGE. La possibilité d'échanger une fois par année quelques échantillons avec un autre laboratoire de référence effectuant des analyses similaires sera examinée. Concernant l'analyse de mutations par séquençage et MLPA de l'ADN mitochondrial, un partenariat avec le CAP⁸⁸ (College of American

88. Le CAP offre un programme de contrôle de la qualité par l'envoi d'échantillons de façon régulière et aléatoire afin de vérifier si les techniques utilisées et l'analyse qui en résulte répondent à des normes précises de qualité.

Pathologists) est prévu afin d'assurer la qualité des tests génétiques.

Résultats de validation analytique publiés

Analyses biochimiques : une étude a été réalisée dans le but de mesurer l'effet de différentes conditions sur les performances analytiques du dosage de l'activité enzymatique de chaque complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale [Spinazzi *et al.*, 2011].

Les protocoles de dosage enzymatique ont été optimisés pour chaque complexe et une nouvelle méthode a été développée pour le complexe III, généralement considéré comme plus difficile à mesurer [Chretien *et al.*, 2004]. La procédure d'homogénéisation des tissus, le choix du tampon d'homogénéisation (composition, concentration et pH), le choix des réactifs et les paramètres spectrophotométriques ont été évalués. Les résultats de la performance analytique des dosages de l'activité enzymatique sur des homogénats de muscle ont été présentés pour chaque complexe excepté le complexe V (tableau 4).

Les auteurs concluent que la procédure d'homogénéisation et les conditions analytiques ont un effet important sur les résultats de dosages spectrophotométriques de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire utilisés pour le diagnostic des maladies mitochondriales.

Les résultats de l'activité enzymatique des complexes I à IV des fibroblastes en culture (10 patients) ont été comparés à ceux d'un autre laboratoire [Kramer *et al.*, 2005].

L'interprétation des résultats était concordante pour 91 % des échantillons pour lesquels les déficits de certains complexes de la chaîne respiratoire étaient connus. Le CV intraessai moyen, sur 20 réplicats de chaque complexe, était de 5,9 %. La variation interessai a été évaluée pour deux échantillons analysés trois fois chacun. Le CV moyen était de 13 % pour le complexe I, 18 % pour le complexe II + III (activité combinée) et 13 % pour le complexe IV.

Tableau 4 Performances analytiques des analyses spectrophotométriques de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire sur homogénats de muscle

	CI	CII	CIII	CIV	CI + CIII	CII + CIII	CS
Protéines muscle (µg)	30	24	6	1,5	30	30	15
CV <i>intraday</i> ⁸⁹ (n = 10)	3 %	5,2 %	5,2 %	3 %	1,7 %	2,8 %	5,3 %
CV <i>interday</i> (n = 10)	4,1 %	4 %	7,4 %	3,7 %	6,4 %	6,7 %	5,4 %
% inhibition (n = 3)	98 %	97 % (mal) 85 % (TTFA)	67 %	100 %	79 %	99 % (mal) 92 % (Aa)	-
Index de linéarité (n = 5)	0,89 ± 0,02	0,95 ± 0,05	0,82 ± 0,03	0,77 ± 0,08	0,85 ± 0,012	1,01 ± 0,09	1,01 ± 0,07

Source : Spinazzi *et al.*, 2011.

Abréviations : Aa : antimycine; CI : complexe I; CII : complexe II; CIII : complexe III; CIV : complexe IV; CS : citrate synthase; CV : coefficient de variation; mal : malonate; n : nombre d'échantillons; TTFA : 2-thenoyltrifluoroacétone 500 µM.

89. Définitions : CV *intra-day* : mesures répétées effectuées le même jour; CV *inter-day* : mesures répétées effectuées sur des jours différents; % d'inhibition : degré d'inhibition par un inhibiteur enzymatique approprié, spécificité de l'activité enzymatique; index de linéarité : linéarité de la réaction enzymatique, ratio du taux enzymatique observé durant les 60 premières secondes envers l'activité mesurée entre 120 et 180 secondes, qui permet d'estimer la décroissance du taux enzymatique calculé deux minutes après le début de la réaction; les valeurs inférieures à 1 indiquent un taux de réaction réduit avec le temps.

Une étude comparative de cinq laboratoires diagnostiques européens a porté sur les méthodes de préparation des échantillons et les dosages de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire [Rodenburg *et al.*, 2013]. Trois échantillons témoins de muscle (biopsies et homogénats) ont été analysés en duplicata afin d'évaluer la reproductibilité des essais enzymatiques et l'effet de la méthode de préparation des échantillons. Le CV interlaboratoire moyen pour l'analyse des complexes I à IV était de 16 % pour les biopsies et de 11 % pour les homogénats. Pour le complexe V, les résultats étaient de 28 % pour les biopsies et de 18 % pour les homogénats. Les fibroblastes de 16 patients et cas témoins ont été analysés dans 4 laboratoires (64 mesures) afin de déterminer l'exactitude diagnostique. La plupart des échantillons ont été correctement identifiés en tant que témoin ou échantillon avec déficit enzymatique. Un résultat erroné a été obtenu dans 3 cas, ce qui correspond à un taux d'inexactitude de 5 %. Selon les auteurs, la méthode de préparation des échantillons est une des principales causes de variation, comme nous l'avons précédemment rapporté dans l'étude de Spinazzi et ses collaborateurs décrite ci-dessus.

Analyses moléculaires : la recherche de mutations et de grandes délétions de l'ADNmt à partir d'un échantillon sanguin est habituellement la première étape de l'évaluation d'un patient chez qui on suspecte une maladie mitochondriale ([Wong *et al.*, 2010], algorithme du demandeur à l'annexe A). On recherche en premier lieu les mutations ponctuelles courantes ainsi que les mutations associées aux syndromes dits classiques, par séquençage de l'ADNmt. De plus, le repérage d'un déficit biochimique ou histochimique (isolé ou généralisé) au niveau des complexes de la chaîne respiratoire peut suggérer la présence de mutations ou de délétions à l'ADNmt et la nécessité d'effectuer un séquençage de certains gènes [Wong *et al.*, 2010].

Une étude récente regroupant 16 patients ayant des symptômes de maladie mitochondriale et pour lesquels les résultats d'analyse des mutations ponctuelles courantes de l'ADNmt se sont révélés négatifs avait pour objectif de comparer la MLPA avec trois autres méthodes de diagnostic moléculaire (*Southern blot*, PCR, *long-PCR*) [Tonska *et al.*, 2012]. Les résultats ont démontré que la MLPA n'était pas en mesure de confirmer toutes les délétions à l'ADNmt détectées par les méthodes PCR, en particulier lorsque le niveau d'hétéroplasmie est faible (inférieur à 40 %). Parmi les 22 échantillons analysés (14 de sang, 7 de muscle, 1 de foie), 12 résultats positifs ont été obtenus par PCR et « *long-PCR*⁹⁰ », 4 résultats positifs (concordants) par MLPA et 3 résultats positifs par buvardage de *Southern* (*Southern blot*). Les auteurs concluent que la MLPA devrait tout de même être utilisée étant donné son faible coût et sa simplicité d'exécution, mais ils recommandent qu'elle soit employée à titre de méthode de dépistage et soit suivie d'une confirmation des résultats par PCR. Pour le demandeur, un résultat de MLPA + est une confirmation du diagnostic. Dans les cas où le résultat est négatif, un séquençage s'ensuit (annexe A, algorithme 2).

5.4 Recommandations d'autres organismes

La Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) propose des lignes directrices pour le diagnostic moléculaire des maladies mitochondriales [CMGS, 2008]. On souligne l'importance du type de tissu utilisé pour établir le diagnostic et son effet sur la probabilité de détecter une mutation pour certaines catégories de présentations cliniques. À cet égard, on présente les tissus à privilégier pour ces catégories (tableau 5)

90. PCR sur longs fragments.

Tableau 5 Tissu à privilégier pour le diagnostic selon la présentation clinique

PRÉSENTATION CLINIQUE	SANG	MUSCLE
LHON	***	Non requis
Pearsons	***	Non requis
KSS /CPEO	*	****
Délétion	*	***
MELAS / MIDD	*	***
MERRF	***	***
Leighs / NARP	***	Non requis
Surdité (1555A>G)	***	Non requis

Traduit et adapté de Clinical Molecular Genetics Society (CMGS), 2008.

Les recommandations de la CMGS sont classées par groupes de présentation clinique et les techniques d'analyse moléculaire suggérées sont discutées en fonction des particularités cliniques. Le séquençage du génome mitochondrial est indiqué pour les patients chez qui la recherche du tissu affecté suggère une anomalie de la chaîne respiratoire mitochondriale sans preuve de réarrangements ou de mutations ponctuelles communes de l'ADNmt. L'analyse de gènes codés par l'ADNn est recommandée pour les cas de déficit isolé des complexes I, II et IV.

L'European Federation of Neurological Sciences (EFNS) recommande une procédure séquentielle pour le diagnostic génétique des maladies mitochondriales comprenant les méthodes analytiques suggérées [Finsterer *et al.*, 2009].

1. Antécédents familiaux et individuels, et examens cliniques par des spécialistes en neurologie, ophtalmologie, otologie, endocrinologie, cardiologie, gastroentérologie, néphrologie, hématologie ou dermatologie.
2. Le clinicien doit déterminer si le phénotype observé correspond à un syndrome mitochondrial (phénotype syndromique) et il doit aussi déterminer si ce phénotype se présente de façon sporadique, par transmission maternelle ou mendélienne.
3. Analyses génétiques (annexe C) :
 - Si phénotype syndromique dû à des mutations ponctuelles dans l'ADNmt (MELAS, MERRF, NARP, LHON) : l'hybridation sur micromatrice d'ADN (*DNA-microarray hybridisation*), PCR en temps réel ou séquençage de gènes uniques.
 - Si phénotype syndromique dû à une délétion dans l'ADNmt (mtPEO, KSS, syndrome de Pearson) : RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou Southern blot.
 - Délétion avec faible taux d'hétéroplasmie : PCR sur longs fragments (*long-range PCR*)
 - délétions simple ou multiple absentes : séquençage de l'ADNmt
 - délétions multiples : séquençage de gènes particuliers (*POLG, TYMP, etc.*)
 - Phénotype non syndromique : exploration biochimique des tissus les plus affectés (muscle, foie, cerveau, peau).

- anomalies biochimiques multiples transmises de façon autosomique : Southern *blot* ou séquençage
- transmission maternelle : séquençage
- si présence ou absence de déplétion, séquençage des gènes impliqués dans la synthèse protéique mitochondriale (voir le détail dans la figure en annexe C).

6. RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines : n'ont pas été évalués.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

La mesure de l'activité enzymatique et l'analyse de l'ADNmt sont présentement réalisées hors Québec à un coût supérieur à celui des valeurs pondérées calculées par le demandeur. Par conséquent, il y aurait un avantage économique à réaliser ces analyses au Québec.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été évalués.

7. EN BREF

7.1 Pertinence clinique

L'analyse des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ADNmt est utilisée pour confirmer le diagnostic clinique d'un syndrome particulier ou pour poser un diagnostic à la suite de la manifestation de symptômes touchant divers organes. Elle permet d'orienter la recherche de mutations et d'offrir un conseil génétique approprié ainsi qu'un diagnostic prénatal aux familles concernées. Aucune étude n'a évalué l'effet sur la mortalité, la qualité de vie, etc., ni sur le traitement des patients.

7.2 Validité clinique

L'analyse de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire n'est pas suffisamment sensible (bien que très spécifique) pour établir le diagnostic de certaines maladies mitochondriales. L'histochimie anormale du muscle semble être dans certains cas un meilleur indicateur de myopathie mitochondriale que l'activité enzymatique (sensibilité : 77 % versus 39 % respectivement; spécificité : 100 % versus 98 % respectivement).

Quelques études de cas montrent un lien génotype-phénotype. Bien que certaines mutations soient couramment associées à un syndrome dit classique, quelques études montrent que ces mutations se manifestent également sous une grande variété de phénotypes. La corrélation génotype-phénotype est faible en raison de la présence des génomes mitochondrial et nucléaire et du niveau d'hétéroplasmie, ce qui peut compromettre l'exactitude du diagnostic.

7.3 Validité analytique

La méthode de préparation des échantillons et les conditions analytiques sont les principales causes de variation des dosages spectrophotométriques de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire. Des variations *intra* et *interday* inférieures à 7 % ont été obtenues. On rapporte une concordance interlaboratoire de 91 %

pour l'analyse de l'activité enzymatique des complexes I à IV.

Une seule étude a été repérée concernant la validité analytique de l'analyse de l'ADNmt. Les résultats ont démontré que la MLPA n'était pas en mesure de confirmer toutes les délétions à l'ADNmt détectées par PCR. La MLPA a permis de détecter les délétions pour 18 % des échantillons comparativement à 55 % pour le PCR. La MLPA a un faible coût et elle est simple d'exécution; elle devrait toujours être suivie d'une confirmation des résultats positifs par PCR. Bien que chaque analyse (biochimique et moléculaire) ait ses limites, une approche intégrée permet d'assurer un diagnostic optimal des maladies mitochondriales.

7.4 Recommandations d'autres organismes

La CMGS souligne l'importance du type de tissu utilisé pour établir le diagnostic moléculaire des maladies mitochondriales et son effet sur la probabilité de détecter une mutation pour certaines catégories de présentations cliniques. Le séquençage du génome mitochondrial est recommandé pour les patients chez qui l'exploration du tissu affecté suggère une anomalie de la chaîne respiratoire mitochondriale sans preuve de réarrangements ou de mutations ponctuelles communes de l'ADNmt. L'analyse de gènes codés par l'ADNn est recommandée pour les cas de déficit isolé des complexes I, II et IV.

L'EFNS recommande une procédure séquentielle pour le diagnostic génétique des maladies mitochondriales. Les méthodes analytiques suggérées dépendent du type de phénotype observé (syndromique ou non syndromique) ainsi que de son mode de présentation (sporadique, transmission maternelle ou mendélienne).

8. AVIS EN BREF DE L'INESSS

Analyse de l'ADN mitochondrial et des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

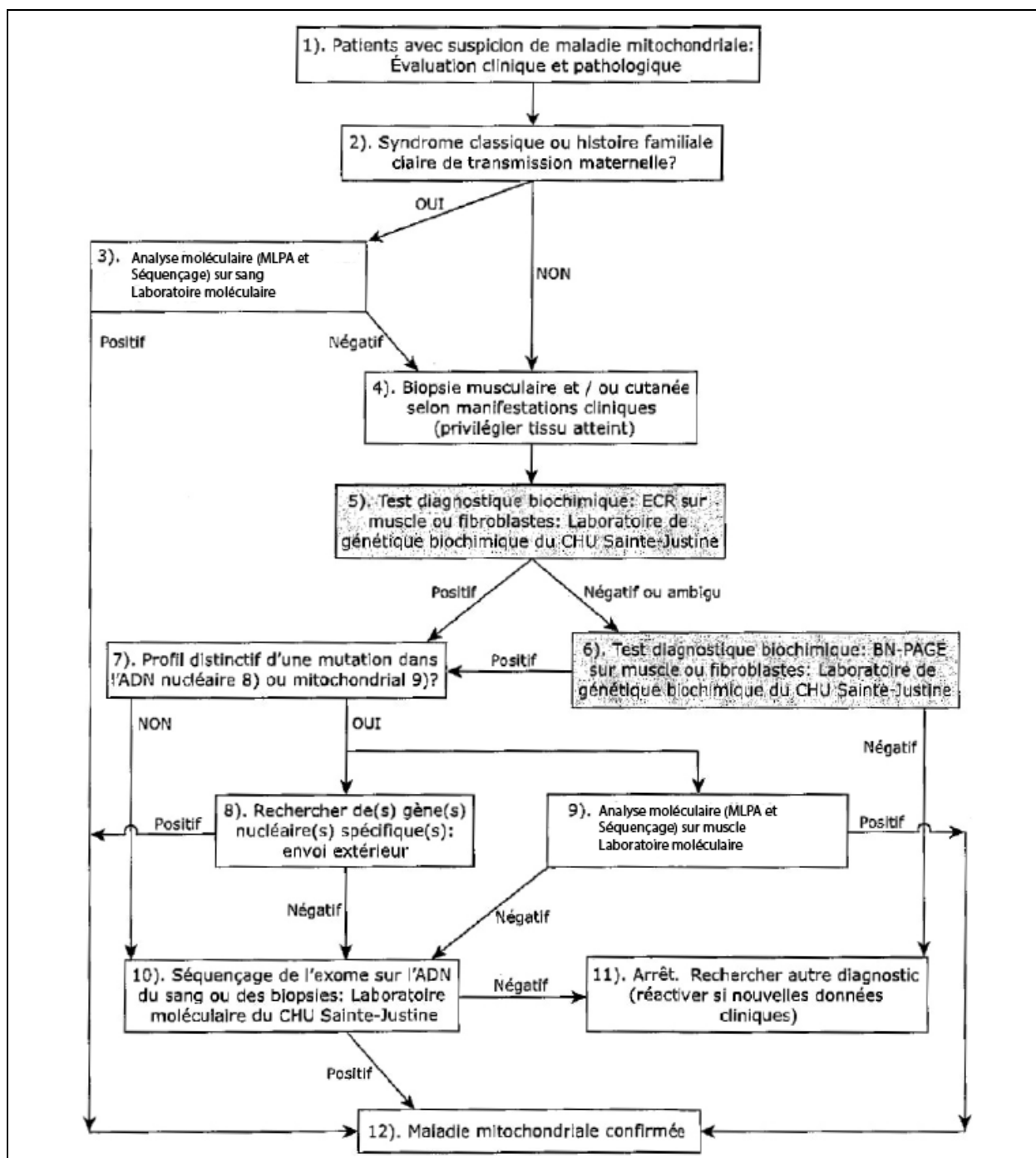
Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

ANNEXE A

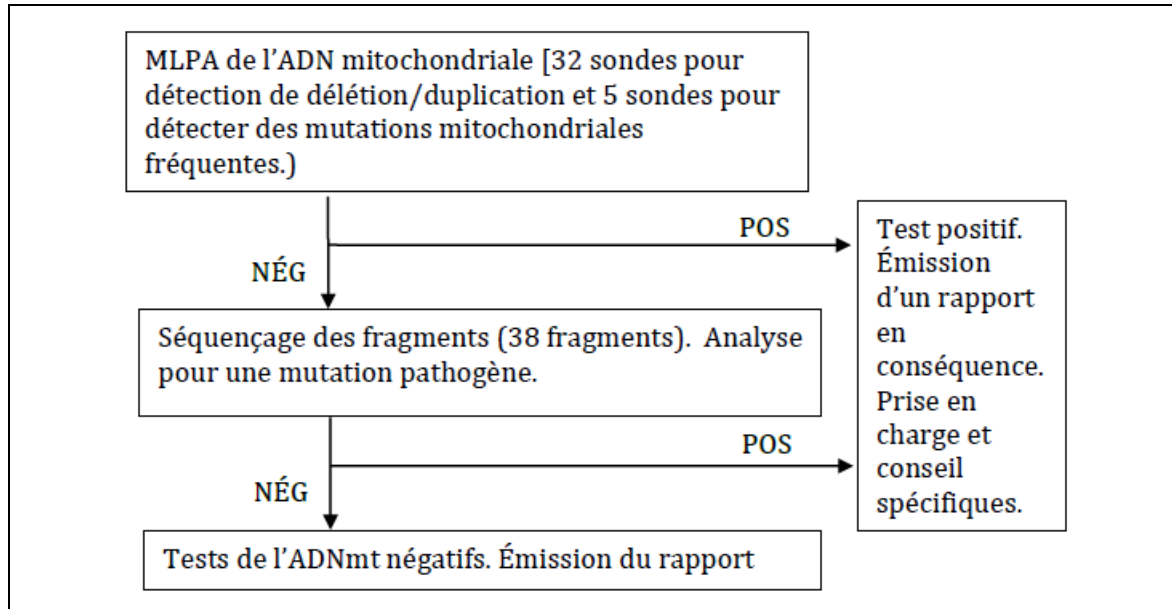
Algorithmes

Figure A1 Algorithmes de prise en charge diagnostique intégrée pour les échantillons provenant de patients chez qui on suspecte une maladie mitochondriale



Documentation fournie par le demandeur.

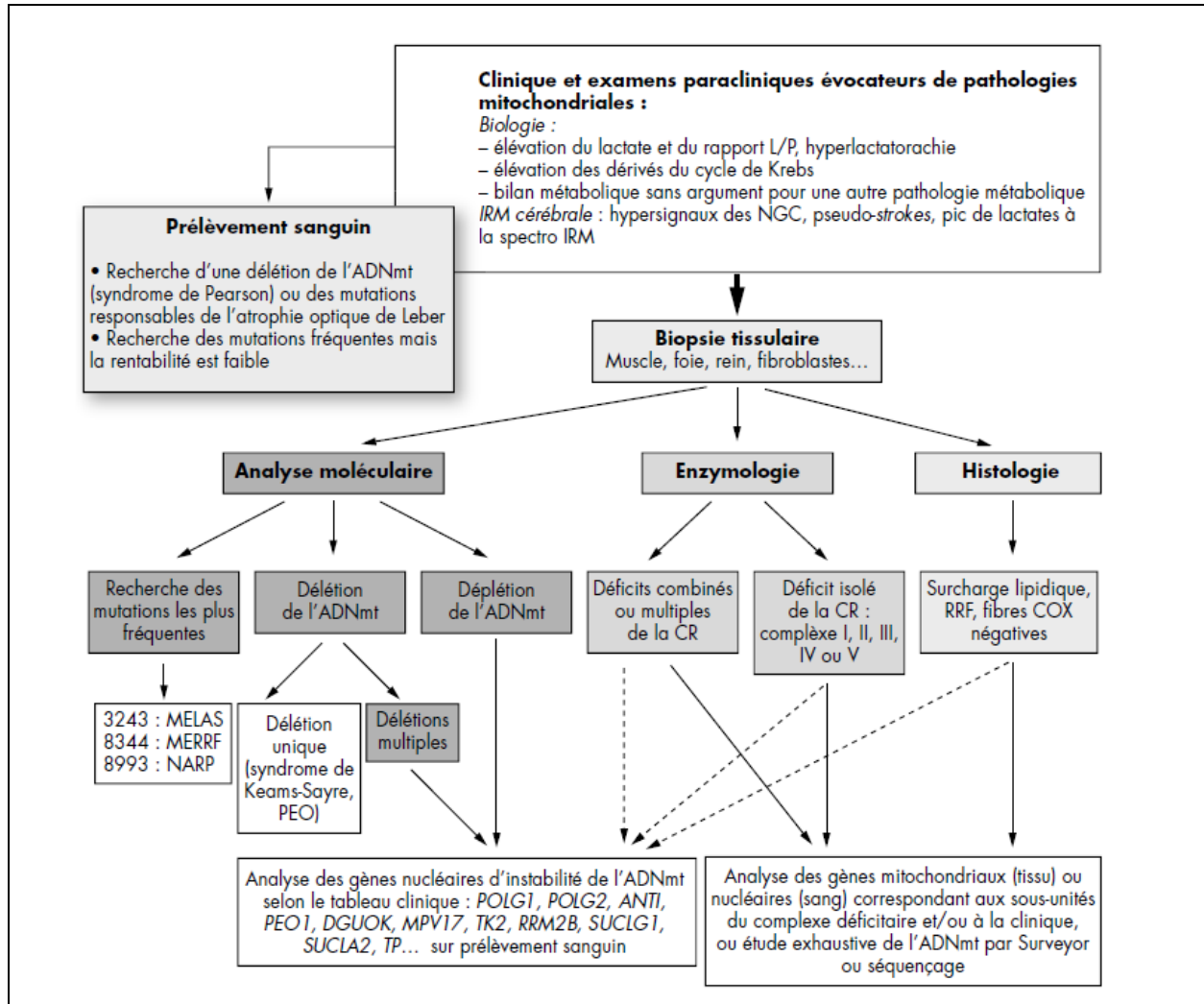
Figure A2 Algorithme de diagnostic moléculaire des maladies de l'ADN mitochondrial



Documentation fournie par le demandeur.

ANNEXE B

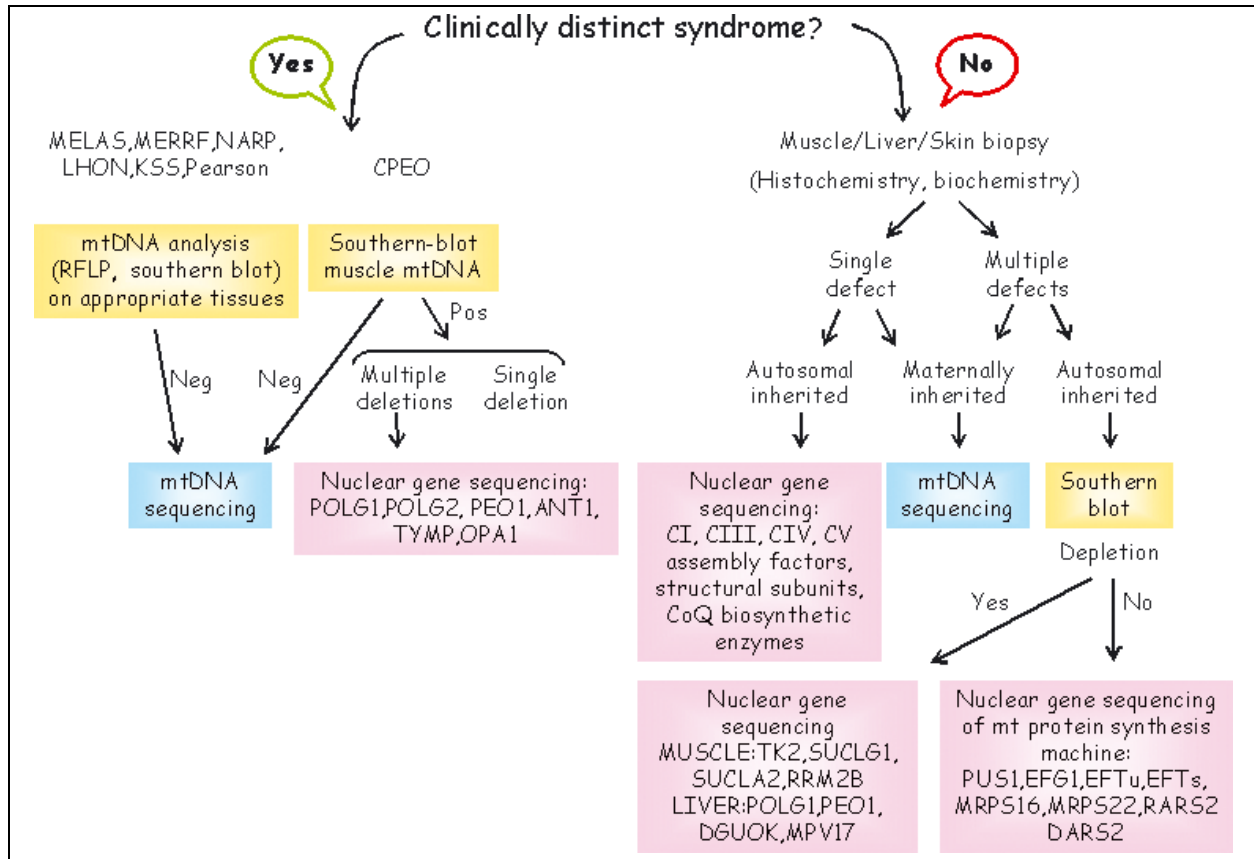
Stratégie diagnostique des maladies mitochondriales



Source : Chaussenot *et al.*, 2011.

ANNEXE C

Algorithme d'analyse génétique des maladies mitochondriales



Source : Finsterer *et al.*, 2009.

RÉFÉRENCES

- Assouline Z, Jambou M, Rio M, Bole-Feysot C, de Lonlay P, Barnerias C, et al. A constant and similar assembly defect of mitochondrial respiratory chain complex I allows rapid identification of NDUFS4 mutations in patients with Leigh syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(6):1062-9.
- Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ, Smeets RJ, Buskens CA, DeMeirleir L, et al. Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(1):63-8.
- Chaussonot A, Rötig A, Paquis-Flucklinger V. Progrès dans les pathologies mitochondriales. Dans : Chabrol B et de Lonlay P, réd. *Maladies métaboliques héréditaires*. Rueil-Malmaison, France : Doin; 2011 : chapitre 5, p. 69-89. Disponible à : https://extranet.chu-nice.fr/Mito-Sud-Mediterranee/uploads/Extranet/smartsection/45_Maladie_metab_PDF_IMP_ok_ch05%5B1%5D.pdf.
- Chretien D, Slama A, Brière JJ, Munnich A, Rötig A, Rustin P. Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. *Curr Med Chem* 2004;11(2):233-9.
- Clinical Molecular Genetics Society (CMGS). Practice guidelines for the molecular diagnosis of mitochondrial diseases. Birmingham, Royaume-Uni : CMGS; 2008. Disponible à : http://www.acgs.uk.com/media/774654/mito_2008.pdf.
- DiMauro S et Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005;37(3):222-32.
- DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol* 2013;9(8):429-44.
- Distelmaier F, Koopman WJ, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willems PH, Smeitink JA. Mitochondrial complex I deficiency: From organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* 2009;132(Pt 4):833-42.
- Duno M, Wibrand F, Baggesen K, Rosenberg T, Kjaer N, Frederiksen AL. A novel mitochondrial mutation m.8989G>C associated with neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa—The NARP syndrome. *Gene* 2013;515(2):372-5.
- Faivre L, Cormier-Daire V, Chretien D, Christoph von Kleist-Retzow J, Amiel J, Dommergues M, et al. Determination of enzyme activities for prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency. *Prenat Diagn* 2000;20(9):732-7.
- Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B, et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur J Neurol* 2009;16(12):1255-64.
- Genge A et Massie R. *Mitochondrial myopathies: Treatment*. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com>.
- Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Cohen BH. Mitochondrial disease: A practical approach for primary care physicians. *Pediatrics* 2007;120(6):1326-33.

- Hoefs SJ, Skjeldal OH, Rodenburg RJ, Nedregaard B, van Kaauwen EP, Spiekerkötter U, et al. Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol Genet Metab* 2010;100(3):251-6.
- Janer A, Antonicka H, Lalonde E, Nishimura T, Sasarman F, Brown GK, et al. An RMND1 mutation causes encephalopathy associated with multiple oxidative phosphorylation complex deficiencies and a mitochondrial translation defect. *Am J Hum Genet* 2012;91(4):737-43.
- Keren B et Sanlaville D. Nouveaux outils diagnostiques du retard mental. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 2008;11(4);230-41.
- Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 2007;80:93-119.
- Koene S, Rodenburg RJ, van der Knaap MS, Willemsen MA, Sperl W, Laugel V, et al. Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: What we learned from 130 cases. *J Inherit Metab Dis* 2012;35(5):737-47.
- Kramer KA, Oglesbee D, Hartman SJ, Huey J, Anderson B, Magera MJ, et al. Automated spectrophotometric analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities in cultured skin fibroblasts. *Clin Chem* 2005;51(11):2110-6.
- Kwon MJ, Ki CS, Kim JY, Lee ST, Kim JW, Kang SY. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of mitochondrial DNA deletion in chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO). *Ann Clin Lab Sci* 2011;41(4):385-9.
- Leary SC. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: A powerful diagnostic tool for the detection of assembly defects in the enzyme complexes of oxidative phosphorylation. *Methods Mol Biol* 2012;837:195-206.
- Leshinsky-Silver E, Lebre AS, Minai L, Saada A, Steffann J, Cohen S, et al. NDUFS4 mutations cause Leigh syndrome with predominant brainstem involvement. *Mol Genet Metab* 2009;97(3):185-9.
- Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: Shifts in the diagnostic paradigm. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(4):1360-7.
- Ma YY, Wu TF, Liu YP, Wang Q, Li XY, Ding Y, et al. A study of 133 Chinese children with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Clin Genet* 2014; [Epub ahead of print].
- Ma YY, Wu TF, Liu YP, Wang Q, Li XY, Zhang Y, et al. Mitochondrial respiratory chain enzyme assay and DNA analysis in peripheral blood leukocytes for the etiological study of Chinese children with Leigh syndrome due to complex I deficiency. *Mitochondrial DNA* 2013;24(1):67-73.
- Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, et al. Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA "MERRF" mutation. *Neurology* 2013;80(22):2049-54.
- Menezes MJ, Riley LG, Christodoulou J. Mitochondrial respiratory chain disorders in childhood: Insights into diagnosis and management in the new era of genomic medicine. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(4):1368-79.
- Nesbitt V, Pitceathly RD, Turnbull DM, Taylor RW, Sweeney MG, Mudanohwo EE, et al. The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: Clinical phenotypes associated with

- the m.3243A>G mutation--implications for diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84(8):936-8.
- Pfeffer G et Chinnery PF. Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies. *Ann Med* 2013;45(1):4-16.
- Pfeffer G, Gorman GS, Griffin H, Kurzawa-Akanbi M, Blakely EL, Wilson I, et al. Mutations in the SPG7 gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. *Brain* 2014;137(Pt 5):1323-36.
- Rodenburg RJ, Schoonderwoerd GC, Tiranti V, Taylor RW, Rotig A, Valente L, et al. A multi-center comparison of diagnostic methods for the biochemical evaluation of suspected mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2013;13(1):36-43.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
- Sarnat HB et Marin-Garcia J. Pathology of mitochondrial encephalomyopathies. *Can J Neurol Sci* 2005;32(2):152-66.
- Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 2008;63(1):35-9.
- Schägger H et von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991;199(2):223-31.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990;61(6):931-7.
- Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Ermani M, Salviati L, Angelini C. Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2011;11(6):893-904.
- Steffann J, Gigarel N, Samuels DC, Monnot S, Borghese R, Hesters L, et al. Data from artificial models of mitochondrial DNA disorders are not always applicable to humans. *Cell Rep* 2014;7(4):933-4.
- Swalwell H, Kirby DM, Blakely EL, Mitchell A, Salemi R, Sugiana C, et al. Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *Eur J Hum Genet* 2011;19(7):769-75.
- Tang S, Wang J, Zhang VW, Li FY, Landsverk M, Cui H, et al. Transition to next generation analysis of the whole mitochondrial genome: A summary of molecular defects. *Hum Mutat* 2013;34(6):882-93.
- Tonska K, Piekutowska-Abramczuk D, Kaliszewska M, Kowalski P, Tanska A, Bartnik E, et al. Molecular investigations of mitochondrial deletions: Evaluating the usefulness of different genetic tests. *Gene* 2012;506(1):161-5.
- Vafai SB et Mootha VK. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 2012;491(7424):374-83.

- Wibrand F, Jeppesen TD, Frederiksen AL, Olsen DB, Duno M, Schwartz M, Vissing J. Limited diagnostic value of enzyme analysis in patients with mitochondrial tRNA mutations. *Muscle Nerve* 2010;41(5):607-13.
- Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2013;13(4):379-87.
- Wong LJ, Scaglia F, Graham BH, Craigen WJ. Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Mol Genet Metab* 2010;100(2):111-7.

DOSAGE DU FACTEUR DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES 23 (FGF-23) (RÉFÉRENCE – 2014.02.11)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHUM – Hôpital Saint-Luc
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 30 mai 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 10 juillet 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

- 2.1 **Nom de la technologie** : ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- 2.2 **Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques**

Le facteur de croissance des fibroblastes 23 (*fibroblast growth factor 23* ou FGF-23) appartient à une grande famille de protéines de ce nom. Les tumeurs qui causent l'ostéomalacie oncogénique excrètent de façon excessive le FGF-23. Sa concentration élevée dans le sang cause une perte en phosphate urinaire chez les patients. Le dosage sanguin du FGF-23 permettrait d'avoir un outil diagnostique pour l'évaluation des patients atteints d'hypophosphatémie ou d'hyperphosphatémie [Immutopics, 2013a].

La trousse d'analyse Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit^{MC} (Immutopics) de deuxième génération utilise la technique d'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) pour le dosage du FGF-23. Deux anticorps polyclonaux de chèvre purifiés sont utilisés pour détecter les épitopes de la portion carboxyl terminal (c-terminal) du FGF-23. L'un des anticorps est biotinylé pour la capture alors que l'autre est conjugué à l'enzyme peroxidase de raifort (HRP) pour la détection. Ces anticorps se lient à la molécule intacte et aux fragments carboxyle terminaux du FGF-23.

Lorsqu'un échantillon est soumis à l'analyse, le FGF-23 (l'analyte) est immunologiquement lié à l'anticorps de capture (qui est lié à la streptavidine recouvrant le puits) et à l'anticorps de détection pour former un complexe « en sandwich ». À la fin de la période d'incubation, le puits est lavé afin de retirer les anticorps non liés et les autres composants. L'enzyme liée au puits est incubée avec une solution substrat dans une réaction chronométrée puis mesurée par spectrophotométrie. L'activité enzymatique du complexe anticorps lié au puits est directement proportionnelle à la quantité de FGF-23 contenue dans l'échantillon [Immutopics, 2013a].

2.3 Société ou développeur

La trousse Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit^{MC}, d'Immutopics (San Clemente, CA, États-Unis) est vendue uniquement pour la recherche et non pour le diagnostic clinique [Immutopics, 2013a]. Le demandeur l'indique sur les rapports d'analyse utilisés à cette fin.

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant

N° US7094551⁹¹ (déposé en septembre 2002 et publié en août 2006 aux États-Unis).

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

La trousse n'est pas homologuée par Santé Canada ni par la FDA⁹².

2.7 Valeur pondérée : 100,45

3. INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Patients présentant une hypophosphatémie avec phosphaturie ou chez qui le diagnostic d'ostéomalacie oncogénique est suspecté.

3.2 Description de la maladie visée

L'ostéomalacie est une décalcification osseuse induite par un défaut de minéralisation (manque d'ions calcium et phosphate) de la trame protéique du squelette [Garnier et Delamare, 2009]. Différentes causes (acquises ou héréditaires) peuvent être à l'origine de cette maladie. L'ostéomalacie oncogénique est une maladie acquise rare. Un nombre variable de cas recensés dans la littérature a été rapporté : environ 120 cas [Dupond *et al.*, 2005] à un peu plus de 160 cas [Van der Rest *et al.*, 2011; Radaideh *et al.*, 2009] ou même 300 cas [Hu *et al.*, 2011]. Les sources primaires de ces chiffres n'étant pas vérifiables, il n'est pas possible de préciser la période temporelle de référence ni le lieu géographique associé aux cas rapportés.

L'ostéomalacie oncogénique est un syndrome paranéoplasique⁹³ rare caractérisé par une hypophosphatémie induite par des facteurs phosphaturiques comme le FGF-23. Celui-ci est sécrété par certaines tumeurs mésenchymateuses⁹⁴. Cette maladie cause des douleurs osseuses diffuses, une faiblesse musculaire, des fractures spontanées et une invalidité fonctionnelle importante [Van der Rest *et al.*, 2011; Lewiecki *et al.*, 2008]. Le diagnostic de l'ostéomalacie oncogénique est difficile et il s'échelonne souvent sur une longue période⁹⁵

91. United States Patent. Immunoassays, assay methods, antibodies and method of creating antibodies for detecting FGF-23. Disponible à : <http://www.google.com/patents/US7094551>.

92. Information confirmée par le fabricant, communication électronique du 25 juillet 2014.

93. Un syndrome paranéoplasique est l'ensemble des manifestations morbides disparates survenant au cours de l'évolution d'un cancer. Elles ont la particularité de suivre intimement l'évolution d'un cancer, d'apparaître avec lui, de disparaître au moment de son éradication et de réapparaître à l'occasion des rechutes, sans être liées, d'aucune façon, à un envahissement métastatique [Garnier et Delamare, 2009; Kernbaum, 2008].

94. Relative au mésenchyme, tissu embryonnaire pouvant se différencier en tissu conjonctif cartilagineux, osseux, musculaire, etc. [Kernbaum, 2008].

95. La durée typique entre l'apparition des symptômes et la présomption du diagnostic d'ostéomalacie oncogénique est souvent de plus de 2,5 ans [Lewiecki *et al.*, 2008] à 7,2 ans [Ledford *et al.*, 2013] et la durée moyenne d'identification de la tumeur responsable est d'environ 5 ans [Lewiecki *et al.*, 2008].

puisque les symptômes cliniques ne sont pas spécifiques à cette maladie [Ledford *et al.*, 2013]. De plus, les tumeurs sont généralement petites, elles croissent lentement et elles peuvent être très difficiles à localiser par imagerie médicale [DiMeglio *et al.*, 2000]. Cette maladie est curable, d'où l'importance d'un diagnostic approprié. Le traitement curatif d'une ostéomalacie oncogénique est l'exérèse (ou excision chirurgicale) de la tumeur [Van der Rest *et al.*, 2011; Woznowski *et al.*, 2008]. Lorsque celle-ci ne peut être localisée, un traitement médical symptomatique⁹⁶ peut alors être administré [Van der Rest *et al.*, 2011; DiMeglio *et al.*, 2000].

Le FGF-23 est une protéine de régulation de l'homéostasie du phosphate et du métabolisme de la vitamine D. Il inhibe l'expression et l'activité de la 1- α -hydroxylase rénale et la production de calcitriol⁹⁷. Les niveaux excessifs de FGF-23 causent plusieurs types d'ostéomalacie/rachitisme hypophosphatémique, y inclus les formes héréditaires autosomiques dominantes (ADHR) ou récessives (ARHR), le rachitisme hypophosphatémique lié à X (XLH⁹⁸) et l'ostéomalacie oncogénique (TIO) [Fukumoto, 2008].

3.3 Nombre de patients visés

Le volume provincial annuel attendu est de 100 analyses⁹⁹.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Hémato-oncologie, endocrinologie.

3.5 Modalités d'administration du test

La molécule de FGF-23 semble être instable, ce qui se traduit par une diminution de l'immunoréactivité dans le temps. Les conditions de prélèvement et de conservation des échantillons devront être respectées rigoureusement. En raison de la labilité¹⁰⁰ de la molécule de FGF-23¹⁰¹, les échantillons sanguins devront être collectés dans un média pour plasma avec EDTA ou un média de culture cellulaire [Immutopics, 2013a].

D'après le demandeur, il n'y a pas d'algorithme d'utilisation pour l'analyse de la molécule de FGF-23. Cependant, un bilan biochimique¹⁰² doit précéder ses dosages.

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Analyse complémentaire à un bilan biochimique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le diagnostic actuel de l'ostéomalacie oncogénique est souvent posé après une longue

96. Le traitement peut être, par exemple, la supplémentation en phosphate et en calcitriol [DiMeglio *et al.*, 2000].

97. Le calcitriol est également appelé 1,25-dihydroxyvitamine D ou 1,25(OH)₂D.

98. XLH : *X-linked hypophosphatemic ricket*.

99. Information soumise par le demandeur.

100. Caractère de quelque chose qui est sujet à changer, à disparaître. Synonyme : instabilité (Trésor de la langue française informatisé [site Web], disponible à : <http://atilf.atilf.fr/tlf.htm>). En chimie, la labilité est la capacité d'un nucléofuge (ou groupe partant) à pouvoir se détacher plus ou moins facilement d'une molécule.

101. La demi-vie plasmatique du FGF-23 est d'environ 45 à 60 min [Khosravi *et al.*, 2007].

102. Communication électronique du 20 août 2014 avec le demandeur. Ce bilan biochimique devrait inclure, en plus de l'histoire clinique, des mesures des concentrations sériques de calcium, de magnésium, de phosphate, de phosphatase alcaline, de créatinine, de l'hormone parathyroïdienne (PTH), de la 25-hydroxyvitamine D, de la 1,25-dihydroxyvitamine D ainsi qu'une mesure de l'excrétion urinaire de 24 h du calcium et du phosphate.

investigation diagnostique chez le patient. L'analyse du FGF-23 permettrait d'abrèger cette errance diagnostique. La détection du FGF-23 peut être faite sur la molécule intacte (iFGF-23) ou sur la portion carboxyl-terminale (cFGF-23). Il existe actuellement quatre trousse¹⁰³ commerciales employant la technique ELISA [Smith *et al.*, 2013; Heijboer *et al.*, 2009] et une trousse en immunoessai par chimiluminescence (CMIA¹⁰⁴) [Shimizu *et al.*, 2012]. La trousse Immotopics C-terminal est la moins touchée par l'instabilité de l'échantillon comparativement aux trois autres trousse qui détectent l'iFGF-23. Parmi ces dernières, la trousse Kainos Intact présente la meilleure performance analytique [Smith *et al.*, 2013]. Selon les auteurs, les résultats des trousse ne peuvent pas être interchangeables.

La technique CMIA consiste à incuber dans les cuvettes les échantillons contenant le FGF-23 avec un anticorps monoclonal de N-terminal biotinylé, un anticorps monoclonal C-terminal étiqueté d'une phosphatase alcaline et des particules magnétiques de streptavidine comme phase solide. Après l'étape du lavage, un substrat luminescent est ajouté. L'activité enzymatique du substrat est alors mesurée par un compteur de photons [Shimizu *et al.*, 2012].

La trousse CMIA offre un plus grand intervalle d'analyse alors que la technique ELISA couvre seulement 3 à 800 pg/ml. Au-delà de cet intervalle, les échantillons doivent être dilués. De plus, le volume d'échantillon nécessaire pour l'analyse avec CMIA est de 10 µl comparativement à celui pour ELISA qui est 100 µl [Immutopics, 2013a; Shimizu *et al.*, 2012].

Au cours de l'année financière 2012-2013, 5 analyses ont été envoyées hors Québec au Mayo Medical Laboratories. Le coût unitaire varie de 123 \$ à 259 \$ et l'analyse est faite sur le cFGF-23 plasmatique par ELISA.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Immutopics est la seule entreprise connue jusqu'à présent qui propose une trousse d'analyse de cFGF-23. La détection du cFGF-23 inclut les molécules entières et les fragments de c-terminal présents dans l'échantillon.

L'analyse par ELISA peut être automatisée. D'ailleurs, le fabricant de la trousse Immotopics C-terminal recommande fortement l'utilisation d'un laveur automatique [Immutopics, 2013a]. Toutefois, le lavage automatisé des plaques peut compromettre la reproductibilité de l'analyse, notamment avec la trousse Kainos Intact, et il est recommandé de procéder au lavage manuel [Heijboer *et al.*, 2009]. Une validation faite par le laboratoire est recommandée avant l'usage de la trousse choisie.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

103. Les trousse sont : C-terminal human FGF-23 ELISA et Intact human FGF-23 ELISA (Immutopics, San Clemente, CA, É.-U.); Intact human FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories, Tokyo, Japon); Human intact FGF-23 ELISA kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, É.-U.).

104. *Chemiluminescence immunoassay* (CMIA) (Kyowa Medex, Tokyo, Japon).

5. DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : aucun.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Les résultats du test peuvent confirmer la maladie ou servir de complément d'information au diagnostic. Ils peuvent aussi aider à localiser les tumeurs. Des études de cas mentionnent que le dosage du FGF-23 a été utile pour faciliter le diagnostic précoce de cette maladie rare [Ledford *et al.*, 2013; Endo *et al.*, 2008; Dupond *et al.*, 2005]. Toutefois, la généralisation de ces résultats peut être remise en question. De plus, l'utilité clinique des ponctions veineuses multiples (pour la localisation des tumeurs) reste à démontrer [Fukumoto, 2014]. Aucune donnée publiée n'a été repérée relativement aux bénéfices courants pour les patients en termes de mortalité, de survie, de qualité de vie ou autre.

5.1.3 Valeur thérapeutique

L'exérèse de la tumeur est le seul traitement efficace qui guérit complètement les patients [Van der Rest *et al.*, 2011; Radaideh *et al.*, 2009] avec un retour à la normale du taux de phosphore en 3 ou 4 jours et une baisse du FGF-23 en quelques heures¹⁰⁵ [Hu *et al.*, 2011; Dupond *et al.*, 2005]. Un rapport de cas montre que, une fois le diagnostic établi et la tumeur localisée, l'exérèse de cette dernière permet une guérison complète des patients après quelques semaines, avec la disparition des symptômes (douleurs musculaires ou osseuses) et de l'état débilant ainsi que le retour à une vie normale [Woznowski *et al.*, 2008]. Lorsqu'une tumeur n'a pas pu être localisée, un traitement médical par supplémentation en phosphate et en calcitriol permet une amélioration biologique et clinique [Van der Rest *et al.*, 2011]. D'autres approches médicamenteuses (dipyridamole, octréotide, cinacalcet) sont actuellement au stade expérimental.

5.2 Validité clinique

Peu de données sur la validité clinique ont été trouvées en raison de la rareté de la maladie. Seuls Imel et ses collaborateurs [2006] ont étudié la sensibilité du FGF-23 à détecter les cas d'ostéomalacie oncogénique.

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)		X	
Valeur prédictive négative (VPN)		X	
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

105. La demi-vie plasmatique du FGF-23 est d'environ 45 à 60 minutes [Khosravi *et al.*, 2007].

Sensibilité diagnostique

Les résultats de sensibilité diagnostique sont présentés au tableau 1, selon trois trousse commerciales qui détectent soit le cFGF-23 soit l'IFGF-23. La trousse Immotopics C-terminal présente une sensibilité de 73 % dans des cas d'ostéomalacie oncogénique et de 92 % lorsque la tumeur est confirmée.

Tableau 1 Sensibilité diagnostique des trousse commerciales à détecter le FGF-23

ÉTUDE	TROSSE	SENSIBILITE (%)	
		OO clinique (n = 22)	Tumeur confirmée (n = 13)
Imel <i>et al.</i> , 2006 (n = 22)	Immotopics C-terminal* (RU/ml)	73	92
	Immotopics Intact* (pg/ml)	23	38
	Kainos Intact† (pg/ml)	86	100

Abréviations : n : nombre de patients; OO : ostéomalacie oncogénique; pg/ml : picogramme par millilitre; RU/ml : unité relative par millilitre.

* C-terminal human FGF-23 ELISA et Intact human FGF-23 ELISA (Immotopics, San Clemente, CA, É.-U.).

† Intact human FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories, Tokyo, Japon).

L'analyse du facteur FGF-23 seule ne permet pas le diagnostic de l'ostéomalacie oncogénique. Elle sert de complément d'information à d'autres analyses (p. ex. : radiographie, ostéodensitométrie, scintigraphie osseuse) effectuées pour objectiver le diagnostic [Van der Rest *et al.*, 2011]. Deux études ont évalué la possibilité de localiser les tumeurs en mesurant le FGF-23 à partir de ponctions pratiquées sur différentes veines, en partant de l'hypothèse que la concentration de FGF-23 pourrait être plus élevée dans le bassin veineux entourant la tumeur [Andreopoulou *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2010]. Ces études exploratoires ont montré que dans 2 cas sur 8 la tumeur n'a pas pu être localisée [Ito *et al.*, 2010], que dans 1 cas sur 14 l'analyse a généré un faux négatif et que dans 2 cas sur 14 ce sont des faux positifs qui ont été générés [Andreopoulou *et al.*, 2011]. L'étude d'Andreopoulou et ses collaborateurs [2011] a conclu que cette méthode est utile dans des circonstances particulières pour le diagnostic des patients atteints d'ostéomalacie, notamment pour localiser la tumeur sécrétrice de FGF-23 quand plusieurs sites sont repérés selon les études d'imagerie diagnostique. Elle n'est cependant pas utile en l'absence d'une indication de la localisation de la lésion.

Spécificité diagnostique

Une élévation du taux du FGF-23 n'est pas spécifique au diagnostic de l'ostéomalacie d'origine cancéreuse, bien qu'elle soit présente chez les personnes qui en souffrent [Xia *et al.*, 2010]. Elle peut être observée dans des cas d'ostéomalacie hypophosphatémique ayant une autre origine comme le rachitisme hypophosphatémique lié à X (XLH) ou sporadique [Xia *et al.*, 2010] ou chez des personnes atteintes d'une maladie rénale chronique [Smith *et al.*, 2012; Yamashita, 2005]. Cependant, un taux normal de FGF-23 n'exclut pas la présence d'une tumeur selon une étude portant sur un cas clinique [Tournier *et al.*, 2011].

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité	X		
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique		X	
Effet de matrice		X	
Concordance		X	
Corrélation entre test et comparateur	X		

Sensibilité analytique

La limite de détection ainsi que quelques autres caractéristiques des trousse sont présentées au tableau 2. La trousse Immotopics C-terminal est la seule à analyser le cFGF-23 par la méthode ELISA, mais elle demeure utilisable uniquement à des fins de recherche.

Répétabilité et reproductibilité

Les résultats de répétabilité et de reproductibilité des différentes trousse sont présentés au tableau 3. Dans l'étude de Heijboer et ses collaborateurs [2009], la trousse Immotopics C-terminal présente une variabilité intraessai et interessai respectivement de < 5 % et de ≤ 16 %. Elle est la seule qui mesure le cFGF-23. La trousse Immotopics Intact présentait une variation interessai très élevée avec des coefficients variant de 22 % à 61 %, variation causée principalement par les différents lots de trousse (*lot-to-lot variability*). Selon les auteurs de l'étude, cette trousse doit être écartée dans la perspective des analyses futures. Quant à la trousse Kainos Intact, lorsqu'elle était utilisée avec le laveur automatique, elle présentait une variation intraessai élevée avec des coefficients allant de 11 % à 43 %. Le coefficient de variation est < 10 % lorsque le lavage manuel est employé avec cette trousse.

Corrélation entre le test et le comparateur

Les résultats de la corrélation entre les différentes trousse sont présentés au tableau 4. La provenance des échantillons (les sujets) varie selon les études. Seuls Imel et ses collaborateurs [2006] ont testé les trousse sur des échantillons de patients avec un diagnostic confirmé ou une présomption d'ostéomalacie oncogénique. Sauf chez les adultes en santé chez qui la corrélation est faible, la trousse Immotopics C-terminal a une corrélation relativement élevée avec les trousse Kainos Intact et Millipore Intact et une corrélation de relativement faible à modérée avec la trousse Immotopics Intact chez différentes populations.

Recouvrement

Le recouvrement moyen pour la trousse d'ELISA d'Immotopics C-terminal est approximativement de 105 % (tableau 5).

Tableau 2 Caractéristiques des trousse

TROUSSE	MÉTHODE ET PRINCIPE	VOLUME ET ÉCHANTILLON	LLOQ	INTERVALLE D'ANALYSE	LINÉARITÉ	COMMENTAIRES
Immutopics C-terminal*	ELISA, C-terminal du FGF-23	100 µl ² Plasma-EDTA ou média de culture cellulaire	3 RU/ml ¹ 1,5 RU/ml ²		R ² = 0,975 (n = 5) ³	Temps d'incubation ² : 3 h 30 Trousse pour la recherche seulement ² Pas homologuée par Santé Canada Brevet n° US7094551 (août 2006)
Immutopics Intact†	ELISA, FGF-23 intact	Plasma-EDTA seulement ⁵	1 pg/ml ¹ 1,5 pg/ml ⁷	7 – 570 pg/ml ³	R ² = 0,932 (n = 5) ³	Instabilité significative 8 h après la ponction veineuse ³ Trousse pour la recherche seulement ⁷ Pas homologuée par Santé Canada
Kainos Intact‡	ELISA, FGF-23 intact	50 µl ⁵ Plasma-EDTA et sérum ⁵	3 pg/ml ^{1,4,5}	10 – 800 pg/ml ³ 3 – 800 pg/ml ⁵	R ² = 0,997 (n = 5) ³	Valeurs de référence ⁵ : 10 – 50 pg/ml Temps d'incubation ⁵ : 3 h 30 Trousse pour la recherche seulement ⁵ Pas homologuée par Santé Canada
Millipore Intact§	ELISA, FGF-23 intact	50 µl ⁶ Plasma, sérum, culture de tissu ⁶	LLOQ : 9,9 pg/ml ⁶ LOD : 3,5 pg/ml ⁶	10 – 2400 pg/ml ³ 9,9 – 2400 pg/ml ⁶	R ² = 0,958 (n = 5) ³	Temps d'incubation ⁶ : < 4 h Trousse pour la recherche seulement ⁶ Pas homologuée par Santé Canada
Kyowa CMIA¥	CMIA, C-terminal et N-terminal du FGF-23	10 µl ⁴ Plasma ou sérum	1 pg/ml ⁴	5 – 10 000 pg/ml ⁸	Linéaire ⁴ jusqu'à 15 000 pg/ml	Temps requis ⁴ : 20 min Valeur seuil ⁴ à 25 pg/ml (proposé) Pas homologuée par Santé Canada Brevet WO2012029837A1 (mars 2012)

Abréviations : ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*; LOD : limite de détection; LLOQ : limite inférieure de quantification; pg/ml : picogramme par millilitre; RU/ml : unité relative par millilitre.

* Human C-terminal FGF-23 ELISA kit (Immutopics, San Clemente, CA, États-Unis).

† Human Intact FGF-23 ELISA kit (Immutopics, San Clemente, CA, États-Unis).

‡ Human intact FGF-23 ELISA kit (Kainos Laboratories, Tokyo, Japon).

§ Human intact FGF-23 ELISA kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, États-Unis).

¥ Chemiluminescence immunoassay (CMIA) (Kyowa Medex, Tokyo, Japon).

1. Imel *et al.*, 2006.

2. Immutopics, 2013a (monographie du cFGF). Trousse de seconde génération.

3. Smith *et al.*, 2013. L'étude utilise la trousse de seconde génération.

4. Shimizu *et al.*, 2012.

5. Kainos, 2010 (monographie).

6. Millipore, 2012 (monographie).

7. Immutopics, 2013b (monographie de l'iFGF).

8. Kyowa Medex, 2012 (site Web).

Tableau 3 Répétabilité et reproductibilité observées pour différentes trouses

ÉTUDE	INTRAESSAI			INTERESSAI		
	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION (PG/ML)*	INTRAESSAI (% CV)	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION (PG/ML)*	INTERESSAI (% CV)
Immutopics C-terminal – Human C-terminal FGF-23 ELISA (Immutopics, San Clemente, CA, États-Unis)						
Heijboer <i>et al.</i> , 2009	49	58 RU/ml	4,4	16	30 RU/ml	10
	24	308 RU/ml	3,9	28	50 RU/ml	16
	24	1075 RU/ml	2,2	26	288 RU/ml	9
Imel <i>et al.</i> , 2006	-	-	5 [†]	-	-	-
Immutopics, 2013a (monographie)	20	33,7 RU/ml	2,4	10	33,6 RU/ml	4,7
	20	302 RU/ml	1,4	10	293 RU/ml	2,4
Immutopics Intact – Human intact FGF-23 ELISA (Immutopics, San Clemente, CA, États-Unis)						
Heijboer <i>et al.</i> , 2009	26	25	5	10	20	61
	23	42	5	10	23	30
	25	59	3	6	34	60
	26	137	5,7	8	53l	22
Imel <i>et al.</i> , 2006	-	-	2,6 – 4,4 [†]	-	-	-
Immutopics, 2013b (monographie)	20	43	4,1	20	46	9,1
	20	426	2	20	441	3,5
Kainos Intact – Human intact FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories, Tokyo, Japon)						
Heijboer <i>et al.</i> , 2009 (lavage automatique)	42	43	21	-	-	-
	44	142	43	-	-	-
	14	532	11	-	-	-
Heijboer <i>et al.</i> , 2009 (lavage manuel)	38	23	9,7	12	17	14
	43	40	5,7	14	53	10

ÉTUDE	INTRAESSAI			INTERESSAI		
	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION (PG/ML)*	INTRAESSAI (% CV)	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION (PG/ML)*	INTERESSAI (% CV)
	43	126	7,5	10	166	5,7
	18	550	5,3	12	672	7
	20	302	1,4	10	293	2,7
Imel <i>et al.</i> , 2006	-	-	< 5†	-	-	-
Millipore Intact – Human intact FGF-23 ELISA kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, États-Unis)						
Millipore, 2012(monographie)	8	52,6	9,3	6	64,4	5,08
	8	64,6	7,8	6	78,5	2,45
	8	75,7	11,2	6	80,2	5,03
	8	101,7	9,2	6	81,0	2,4
	-	-	-	6	95,9	11,31
Kyowa CMIA – Chemiluminescence immunoassay (CMIA) (Kyowa Medex, Tokyo, Japon)						
Shimizu <i>et al.</i> , 2012	10	43,2	2,7	8	5	15
	10	200,2	3,2	8	10	3,5
	10	2454	3,4	-	-	-

Abréviations : CV : coefficient de variation; pg/ml : picogramme par millilitre; RU/ml : unité relative par millilitre.

* Lorsque c'est possible, la conversion des unités a été faite pour des fins d'uniformité.

† Valeurs rapportées par les auteurs, comme indiquées par le fabricant. Étant donné que les chiffres ne concordent pas avec ceux de la monographie du fabricant pour la trousse de deuxième génération, il est probable que ces valeurs se réfèrent à la trousse de première génération.

Tableau 4 **Corrélation entre les trouses**

ÉTUDE	TROUSSES	CORRÉLATION	SUJETS
Imel <i>et al.</i> , 2006	Immutopics C-terminal* <u>vs</u> Immutopics Intact†	Pearson r = 0,65, p < 0,01	Patients avec un diagnostic confirmé ou une présomption d'ostéomalacie oncogénique (n = 22)
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Immutopics Intact	Pearson r = 0,839, p < 0,0001	Patients en hémodialyse (n = 36)
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Immutopics Intact	Pearson r = 0,161, p = 0,338	Adultes en santé (n = 31)
Smith <i>et al.</i> , 2011	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Immutopics Intact	régression de Deming R ² = 0,428, p < 0,001	Patients avec maladie rénale chronique (n = 200)
Smith <i>et al.</i> , 2011	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Immutopics Intact	régression de Deming R ² = 0,186, p = 0,006	Adultes en santé (n = 40)
Imel <i>et al.</i> , 2006	Kainos Intact‡ <u>vs</u> Immutopics C-terminal	Pearson r = 0,86, p < 0,01	Patients avec un diagnostic confirmé ou une présomption d'ostéomalacie oncogénique (n = 22)
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Kainos Intact	Pearson r = 0,826, p < 0,0001	Patients en hémodialyse (n = 36)
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Kainos Intact	Pearson r = 0,256, p = 0,165	Adultes en santé (n = 31)
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Millipore Intact§	Pearson r = 0,830, p < 0,0001	Patients en hémodialyse (n = 36)
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal <u>vs</u> Millipore Intact	Pearson r = 0,008, p = 0,667	Adultes en santé (n = 31)
Imel <i>et al.</i> , 2006	Kainos Intact <u>vs</u> Immutopics Intact	Pearson r = 0,59, p < 0,01	Patients avec un diagnostic confirmé ou une présomption d'ostéomalacie oncogénique (n = 22)
Shimizu <i>et al.</i> , 2012	Kyowa CMIA¥ <u>vs</u> Kainos Intact	R ² = 0,96	Patients avec hypophosphatémie chronique, causes variées (n = 210)
Shimizu <i>et al.</i> , 2012	Kyowa CMIA <u>vs</u> Kainos Intact	R ² = 0,92	Patients avec FGF-23 < 200 pg/ml (n = 123)

* Human C-terminal FGF-23 ELISA kit (Immutopics, San Clemente, CA, États-Unis). L'étude de Smith *et al.*, 2013 présentée se réfère à la trousse de deuxième génération.

† Human intact FGF-23 ELISA kit (Immutopics, San Clemente, CA, États-Unis).

‡ Human intact FGF-23 ELISA kit (Kainos Laboratories, Tokyo, Japon).

§ Human intact FGF-23 ELISA kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, États-Unis).

¥ Chemiluminescence immunoassay (CMIA) (Kyowa Medex, Tokyo, Japon).

Tableau 5 Recouvrement et interférences des trousses

ÉTUDE	TROUSSE	N ^{bre}	CONCENTRATION NOMINALE (PG/ML)	RECOUVREMENT MOYEN (%)	INTERFÉRENCES
Heijboer <i>et al.</i> , 2009	Immutopics C-terminal	-	-	≈ 100	
Immutopics, 2013a (monographie)	Immutopics C-terminal	3	375 RU/ml	104‡	
		3	750 RU/ml	109‡	
		3	1125 RU/ml	107‡	
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics C-terminal	5	20*	105	
		5	80*	105	
		5	260*	105	
Heijboer <i>et al.</i> , 2009	Immutopics Intact	-	-	> 100	
Immutopics, 2013b (monographie)	Immutopics Intact	3	189	89‡	La trousse est conçue pour détecter la molécule FGF-23 intacte. Les fragments C-terminal ou N-terminal ne sont pas mesurés.
		3	378	94‡	
		3	745	95‡	
Smith <i>et al.</i> , 2013	Immutopics Intact	5	260	40	
Heijboer <i>et al.</i> , 2009	Kainos Intact	-	-	≈ 100	
Smith <i>et al.</i> , 2013	Kainos Intact	5	20	96,3	
		5	80	105,2	
		5	260	-	
Millipore, 2012 (monographie)	Millipore Intact	5	28,8	98,2†	
		5	259,3	89,1†	
		5	777,8	85,5†	
Smith <i>et al.</i> , 2013	Millipore Intact	5	260	63	Réaction croisée ¹ de 0,01 % avec FGF-21 et de

ÉTUDE	TROUSSE	N ^{bre}	CONCENTRATION NOMINALE (PG/ML)	RECOUVREMENT MOYEN (%)	INTERFÉRENCES
					0,01 % avec FGF-19
Shimizu <i>et al.</i> , 2012	Kyowa CMIA	-	-	-	< 5 % de variabilité des concentrations de FGF-23 avec l'ajout de : ≤ 500 mg/dl d'hémoglobine, ≤ 50 mg/dl de bilirubine, ≤ 300 mg/dl d'acide ascorbique et ≤ 500 IU/ml de facteur rhumatoïde

Abréviations : pg/ml : picogramme par millilitre; RU/ml : unité relative par millilitre.

* Les mêmes échantillons ont été utilisés pour tester les trousse Immotopics C-terminal, Immotopics Intact, Kainos Intact et Millipore Intact.

† Moyenne calculée avec n = 5.

‡ Moyenne calculée avec n = 3.

Valeurs de référence

Une étude transversale a proposé des valeurs seuils diagnostiques pour l'ostéomalacie oncogénique ou le XLH : un taux de phosphate sérique < 2,5 mg/dl et un taux de FGF-23 > 30 pg/ml (essai avec iFGF-23) chez les adultes; un taux de phosphate sérique < 3,5 mg/dl chez les enfants et < 4,5 mg/dl chez les nourrissons. Aucun seuil de FGF-23 n'est proposé pour la population pédiatrique [Endo *et al.*, 2008]. Dans une étude portant sur la variabilité biologique de la concentration plasmatique de FGF-23, les valeurs de référence observées chez 170 adultes en santé sont de 21,6 à 91,0 RU/ml pour le cFGF-23 et de 11,7 à 48,6 pg/ml pour l'iFGF-23 [Smith *et al.*, 2012]. Aucune autre étude répertoriée n'a indiqué de valeur de référence pour l'analyse du cFGF-23 ou du facteur iFGF-23.

Par ailleurs, le Mayo Medical Laboratories¹⁰⁶ emploie l'essai immunoenzymatique¹⁰⁷ pour doser le cFGF-23. Les valeurs de référence utilisées sont : ≤ 230 RU/ml chez les 3 mois à 17 ans et ≤ 180 RU/ml chez les adultes de 18 ans ou plus. Ces valeurs de référence sont différentes de celles documentées dans la littérature et de celle du demandeur. Il y a une grande variabilité entre les valeurs de référence présentées dans les différentes études et celles utilisées par les laboratoires.

Des incertitudes persistent quant à savoir s'il vaut mieux utiliser des essais avec le cFGF-23 ou l'iFGF-23 [Smith *et al.*, 2012] puisque les résultats ne peuvent être interchangeables [Smith *et al.*, 2013]. Dans une étude comparant quatre trousse commerciales d'ELISA, les concentrations plasmatiques de cFGF-23 paraissent stables durant au moins 8 heures, contrairement à celles de l'iFGF-23 qui diminuent avec le temps. Toutefois, l'ampleur de cette réduction n'aurait pas de signification clinique [Smith *et al.*, 2013].

Données locales de validité analytique

Les valeurs de référence (provisaires) utilisées par le demandeur¹⁰⁸ sont : 19 à 114 RU/ml. Des valeurs supérieures à 114 RU/ml indiquent une concentration anormalement élevée de FGF-23 dans le sang, et donc une possibilité d'ostéomalacie oncogénique, lorsque ce résultat est jumelé avec ceux du bilan biochimique.

La validation technique¹⁰⁹ de l'analyse du FGF-23 avec la trousse Immotopics C-terminal faite par le demandeur montre des coefficients de variation (CV) intraessai (répétabilité) de deux contrôles de trousse de 15,5 % et de 8,1 % (11 essais). Les CV interessais (reproductibilité) de deux contrôles de trousse sont de 15,4 % et de 6,8 % (6 essais). Un contrôle de qualité interne est fait sur des échantillons de patients ainsi qu'à l'aide des moyens de contrôle fournis par la trousse.

5.4 Recommandations d'autres organismes : Aucune recommandation n'a été répertoriée.

106. Mayo Medical Laboratories. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23), Plasma [site Web]. Disponible à : <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/88662>.

107. En anglais, *immunometric enzyme assay*.

108. Communication électronique du 20 août 2014 avec le demandeur.

109. Communications électroniques du 20 et du 29 août 2014 avec le demandeur.

6. RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

La trousse commerciale par ELISA est d'utilisation facile et elle nécessite peu de ressources matérielles. L'analyse peut être automatisée.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

Étant donné la rareté de la maladie, son diagnostic est souvent retardé puisque les symptômes sont non spécifiques et que d'autres causes sont recherchées [Ledford *et al.*, 2013]. L'analyse peut permettre un diagnostic précoce de l'ostéomalacie oncogénique afin d'éviter l'errance diagnostique et d'instaurer plus rapidement un traitement curatif. Toutefois, le dosage du FGF-23 n'est pas spécifique au diagnostic de l'ostéomalacie d'origine cancéreuse. L'analyse est faite avec une trousse destinée à la recherche [Immutopics, 2013a].

7. EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Des études de cas mentionnent que le dosage du FGF-23 a été utile pour faciliter le diagnostic (confirmation ou complément d'information) ou pour aider à localiser des tumeurs. Aucune donnée publiée n'a été repérée relativement aux bénéfices courants pour les patients quant à la mortalité, à la survie, à la qualité de vie ou autre.

7.2 Validité clinique

Une seule étude a porté sur la sensibilité du FGF-23 à détecter les cas d'ostéomalacie oncogénique. La trousse Immutopics C-terminal présente une sensibilité de 73 % dans des cas d'ostéomalacie oncogénique clinique et de 92 % lorsque la tumeur est confirmée.

La ponction veineuse multiple serait utile pour le diagnostic des patients atteints d'ostéomalacie afin de localiser la tumeur sécrétrice de FGF-23 quand plusieurs sites sont repérés sur l'imagerie diagnostique. Elle n'est cependant pas utile en l'absence d'indication de la localisation de la lésion. Par ailleurs, une élévation du taux de FGF-23 n'est pas spécifique au diagnostic de l'ostéomalacie oncogénique, bien qu'elle soit présente chez les personnes qui souffrent de cette maladie.

7.3 Validité analytique

La sensibilité de la trousse Immutopics C-terminal est de 1,5 RU/ml. La variabilité intraessai et interessai est respectivement de < 5 % et de ≤ 16 %. Le taux de recouvrement moyen est d'approximativement 105 %. Les données locales de validation technique présentent des coefficients de variation intraessai et interessai ≤ 15,5 % et ≤ 8,1 % (deux contrôles inclus dans la trousse). Les valeurs de référence pour l'analyse du cFGF-23 sont peu documentées. Il y a une grande variabilité entre les valeurs de référence présentées.

Jusqu'à présent, il semble qu'Immutopics soit la seule entreprise qui offre une trousse analysant le C-terminal du FGF-23. Toutefois, cette trousse est destinée uniquement aux fins de la recherche et elle n'est pas homologuée. Aucune autre trousse vendue sur le marché n'a obtenu son homologation par des agences réglementaires.

7.4 Recommandations d'autres organismes : aucune recommandation n'a été répertoriée.

8. AVIS EN BREF DE L'INESSS

Dosage du facteur de croissance des fibroblastes 23 (FGF 23)

Statut de la technologie diagnostique

- Établie*
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation lorsqu'on aura obtenu plus d'information sur
 - le statut de la technologie pour le cFGF-23 versus l'iFGF-23
 - l'assurance du contrôle de la qualité externe

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

* La technologie ELISA est établie, mais pour le dosage du FGF-23; il reste encore un questionnement quant au statut de la technologie pour doser le cFGF-23 et l'iFGF-23.

Le besoin clinique est évident.

RÉFÉRENCES

- Andreopoulou P, Dumitrescu CE, Kelly MH, Brillante BA, Cutler Peck CM, Wodajo FM, et al. Selective venous catheterization for the localization of phosphaturic mesenchymal tumors. *J Bone Miner Res* 2011;26(6):1295-302.
- DiMeglio LA, White KE, Econs MJ. Disorders of phosphate metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29(3):591-609.
- Dupond JL, Magy N, Mahammedi M, Prie D, Gil H, Meaux-Ruault N, Kantelip B. L'ostéomalacie oncogène : rôle des phosphatonines. Intérêt du dosage du fibroblast growth factor 23 démontré chez un malade *Rev Med Interne* 2005;26(3):238-41.
- Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, et al. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients: Proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone* 2008;42(6):1235-9.
- Fukumoto S. Diagnostic modalities for FGF23-producing tumors in patients with tumor-induced osteomalacia. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2014;29(2):136-43.
- Fukumoto S. Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism—Pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Intern Med* 2008;47(5):337-43.
- Garnier M et Delamare J. Dictionnaire illustré des termes de médecine. 30^e éd. Paris, France : Maloine; 2009.
- Heijboer AC, Levitus M, Vervloet MG, Lips P, ter Wee PM, Dijstelbloem HM, Blankenstein MA. Determination of fibroblast growth factor 23. *Ann Clin Biochem* 2009;46(Pt 4):338-40.
- Hu FK, Yuan F, Jiang CY, Lv DW, Mao BB, Zhang Q, et al. Tumor-induced osteomalacia with elevated fibroblast growth factor 23: A case of phosphaturic mesenchymal tumor mixed with connective tissue variants and review of the literature. *Chin J Cancer* 2011;30(11):794-804.
- Imel EA, Peacock M, Pitukcheewanont P, Heller HJ, Ward LM, Shulman D, et al. Sensitivity of fibroblast growth factor 23 measurements in tumor-induced osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2055-61.
- Immutopics. Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit^{MC}. 2nd Generation Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the determination of human fibroblast growth factor 23 levels in plasma or cell culture media. San Clemente, CA : Immutopics Inc.; 2013a. Disponible à : http://www.immutopics.com/assay/human/c-terminal_fgf-23.php.
- Immutopics. Human FGF-23 (Intact) ELISA Kit^{MC}. 2nd Generation Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the quantitative determination of human fibroblast growth factor 23 levels in plasma or cell culture media. San Clemente, CA : Immutopics Inc.; 2013b. Disponible à : http://www.immutopics.com/assay/human/intact_fgf-23.php.
- Ito N, Shimizu Y, Suzuki H, Saito T, Okamoto T, Hori M, et al. Clinical utility of systemic venous sampling of FGF23 for identifying tumours responsible for tumour-induced osteomalacia. *J Intern Med* 2010;268(4):390-4.

- Kainos. Human Intact FGF-23 ELISA Kit. Tokyo, Japon : Kainos Laboratories Inc.; 2010. Disponible à : http://www.tecomedical.com/en/laboratory-reagents/bone-and-cartilage-parameters/calcium-metabolism?display_article=1312.
- Kernbaum S, réd. Dictionnaire de médecine Flammarion. 8^e éd. Paris, France : Médecine-Sciences Flammarion; 2008.
- Khosravi A, Cutler CM, Kelly MH, Chang R, Royal RE, Sherry RM, et al. Determination of the elimination half-life of fibroblast growth factor-23. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(6):2374-7.
- Kyowa Medex. [Article portant sur le FGF23 et le "Chemiluminescence immunoassay" (site Web en japonais)]. Tokyo, Japon : Kyowa Medex Co.; 2012. Disponible à : <http://www.kyowamx.co.jp/news/nw130219.html>.
- Ledford CK, Zelenski NA, Cardona DM, Brigman BE, Eward WC. The phosphaturic mesenchymal tumor: Why is definitive diagnosis and curative surgery often delayed? *Clin Orthop Relat Res* 2013;471(11):3618-25.
- Lewiecki EM, Urig EJ Jr, Williams RC Jr. Tumor-induced osteomalacia: Lessons learned. *Arthritis Rheum* 2008;58(3):773-7.
- Millipore. Human Fibroblast Growth Factor (FGF-23) ELISA Kit. St. Charles, MO : EMD Millipore; 2012. Disponible à : http://www.emdmillipore.com/CA/en/product/Human-FGF-23-ELISA-Kit,MM_NF-EZHFGF23-32K#documentation.
- Radaideh AR, Jaradat D, Abu-Kalaf MM, Nusier MK. Resolution of severe oncogenic hypophosphatemic osteomalacia after resection of a deeply located soft-tissue tumour. *Curr Oncol* 2009;16(5):87-90.
- Shimizu Y, Fukumoto S, Fujita T. Evaluation of a new automated chemiluminescence immunoassay for FGF23. *J Bone Miner Metab* 2012;30(2):217-21.
- Smith ER, McMahan LP, Holt SG. Method-specific differences in plasma fibroblast growth factor 23 measurement using four commercial ELISAs. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(10):1971-81.
- Smith ER, Cai MM, McMahan LP, Holt SG. Biological variability of plasma intact and C-terminal FGF23 measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(9):3357-65.
- Tournier A, Hanslik T, de la Faille R, Trad S, Baglin A, Prinseau J, Moulonguet-Doleris L. Ostéomalacie oncogénique : le FGF 23 ne fait pas tout. *Rev Med Interne* 2011;32(9):e99-e101.
- Van der Rest C, Cavalier E, Colson L, Kaux JF, Krzesinski JM, Reginster JY, et al. Hypophosphatémie et ostéomalacie oncogénique. *Rev Med Suisse* 2011;7(306):1630-3.
- Woznowski M, Quack I, Stegbauer J, Buchner N, Rump LC, Schieren G. Oncogenic osteomalacia, a rare paraneoplastic syndrome due to phosphate wasting—A case report and review of the literature. *Clin Nephrol* 2008;70(5):431-8.
- Xia WB, Jiang Y, Li M, Xing XP, Wang O, Hu YY, et al. Levels and dynamic changes of serum fibroblast growth factor 23 in hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *Chin Med J (Engl)* 2010;123(9):1158-62.
- Yamashita T. Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 2005;9(4):313-8.

SÉQUENÇAGE DE *MECP2* DANS LE SYNDROME DE RETT (RÉFÉRENCE – 2014.02.12)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 15 juillet 2013
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 10 juillet 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2. TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Séquençage de type Sanger avec résolution par électrophorèse capillaire et amplification dépendante de la ligation de sondes multiplexes (*multiplex ligation-dependent probe amplification* ou MLPA).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Les deux approches utilisées dans le cadre de cette analyse sont complémentaires. Le séquençage selon l'approche de Sanger permet de détecter la présence de mutations ponctuelles et de délétions ou d'insertions mineures dans les quatre exons et les sites d'épissage constituant le gène *MECP2*. La MLPA permet de déceler des délétions ou duplications majeures affectant un ou plusieurs exons de *MECP2* et qui sont imperceptibles par le séquençage. Conjointement, ces analyses permettront la confirmation du diagnostic du syndrome de RETT (RTT) et son étiologie génétique.

Dans le cadre du séquençage de type Sanger, les régions d'intérêt sont amplifiées par réaction de PCR à l'aide d'une trousse maison. À la suite de la purification du produit grâce à la trousse ExoSAP-IT, une réaction de séquence cyclique de type Sanger est effectuée (trousse Big Dye Terminator v3.1). Les produits de réaction purifiés à l'aide de la trousse BigDye X Terminator sont alors séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire et la séquence est déterminée.

Le demandeur utilise la trousse commerciale SALSA MLPA P015 *MECP2* probemix de la compagnie MRC-Holland pour effectuer la MLPA. Cette trousse permet l'analyse des diverses régions exoniques de *MECP2*, des gènes *ARX*, *NTNG1*, *FOXP1* et *CDKL5*, ces derniers ayant été associés à l'étiologie génétique de certains cas de RTT ou de déficience intellectuelle.

La MLPA est réalisée en quatre étapes principales (annexe A). Une série de sondes fragmentées en un minimum de deux oligonucléotides chacune et permettant d'explorer diverses régions chromosomiques d'intérêt sont hybridées à des matrices d'ADN dénaturées. La ligature des oligonucléotides adjacents permet la création de sondes spécifiques, uniques et de différentes longueurs. Après une amplification par PCR à l'aide d'une même paire d'amorces, l'ensemble des sondes (amplicons) subissent une électrophorèse capillaire permettant leur détection et leur quantification. La comparaison de l'électrophérogramme de l'échantillon test avec celui d'un échantillon de référence permet d'évaluer semi-quantitativement le nombre de copies de chacune des régions explorées, permettant ainsi la détection de délétions ou de duplications de celles-ci.

2.3 Société ou développeur

La réaction de PCR est effectuée à l'aide d'amorces maison et la réaction de séquençage est réalisée à l'aide de la trousse Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies).

Les trousse de purification du de PCR ExoSAP-IT sont produites par USB et distribuées par Affimetrix. La purification de la réaction de séquence est effectuée grâce à la trousse XTerminator produite par Applied Biosystems (Life Technologies).

La trousse commerciale SALSA MLPA P015 MECP2 probemix est produite par MRC Holland.

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les réactifs, les trousse et l'appareillage utilisés dans le cadre de cette analyse n'ont pas fait l'objet d'une homologation de la part de Santé Canada ou de la FDA.

2.7 Valeur pondérée : 481,81

3. INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Les patients pédiatriques ou adultes présentant des caractéristiques suggérant un syndrome de RTT typique ou une suspicion de RTT atypique et les individus susceptibles d'être porteurs.

3.2 Description de la maladie visée

Le RTT est un désordre neurodéveloppemental progressif dont le diagnostic est basé sur un ensemble de critères cliniques dérivés de consensus d'experts internationaux (MIM 312750) [Neul *et al.*, 2010] (annexe B). La progression de la maladie est caractérisée en quatre stades distincts : après une naissance et une période de développement psychomoteur relativement normales, les personnes atteintes de la forme classique du RTT cessent, entre 6 et 18 mois, de satisfaire aux jalons développementaux attendus selon leur âge. Il s'ensuit, typiquement entre 1 et 4 ans, une période de régression du langage, une perte de l'usage volontaire des mains, le développement d'anomalies sur le plan de la démarche (dyspraxique et ataxique) et de stéréotypies des mains (tordre/presser, frapper/taper, automatismes de mise à la bouche, lavage et frottement). Certains individus peuvent alors

présenter un phénomène de retrait social menant à une suspicion d'autisme. Une étape de stabilisation s'échelonnant jusqu'à la jeune vingtaine est ensuite observée. Au cours de cette période, l'état de certains patients va se stabiliser. Dans d'autres cas, une amélioration ou un regain de certaines habiletés est observé. Finalement, au dernier stade de la maladie, les habiletés motrices déclinent, ce qui mène généralement à la perte de la capacité à marcher chez les individus qui en étaient capables [Neul *et al.*, 2010; Hagberg *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2001].

Environ 25 % des patients atteints du RTT présentent une forme atypique de la maladie [Hagberg, 1995]. Ils satisfont à certains des critères diagnostiques, mais pas à tous (annexe B). Le spectre des phénotypes observé comprend des formes moins sévères caractérisées, par exemple, par une régression tardive ou un maintien du langage alors que les formes plus sévères présentent des anomalies à la naissance, une régression précoce et l'apparition précoce de convulsions ou d'épilepsie [Hagberg, 1995].

La majorité (90-97 %) des cas de syndrome de RETT classique et de 50 à 70 % des cas atypiques sont causés par des mutations *de novo* (99 % des cas) dans le gène *MECP2* (*methyl-CpG-binding protein 2*, MIM 300005) situé sur le chromosome Xq28 [Percy *et al.*, 2010; Neul *et al.*, 2008; Percy *et al.*, 2007; Charman *et al.*, 2005; Kammoun *et al.*, 2004; Amir *et al.*, 1999]. Dans de rares cas, la mutation est transmise par la mère. Dans ces familles, la mère est généralement asymptomatique ou avec une présentation clinique minimale résultant d'un biais relatif au patron d'inactivation des chromosomes X [Cheadle *et al.* 2000; Meloni *et al.*, 2000; Orrico *et al.*, 2000; Villard *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 1999; Amir *et al.*, 1999].

Le RTT affecte majoritairement les filles. Les cas de garçons avec mutation du gène *MECP2* et un caryotype 46, XY rapportés dans la littérature présentent généralement une encéphalopathie sévère à la naissance et ces enfants meurent avant l'âge de deux ans [Masuyama *et al.*, 2005; Geerdink *et al.*, 2002; Hoffbuhr *et al.*, 2002; Orrico *et al.*, 2000; Villard *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 1999]. Certains garçons présentant un RTT et une mutation dans *MECP2* ont également été décrits dans des cas dont le caryotype est 47, XXY ou possédant des mutations postzygotiques résultant en un mosaïcisme somatique [Pieras *et al.*, 2011; Lundvall *et al.*, 2006; Topçu *et al.*, 2002; Hoffbuhr *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2001; Schwartzman *et al.*, 2001; Clayton-Smith *et al.*, 2000].

Les études de longévité des patients atteints du RTT rapportent que certains d'entre eux atteignent la soixantaine. Toutefois, un taux annuel élevé de décès (entre 1 et 2 %) a été noté, et 25 % de ces décès sont soudains et inattendus [Freilinger *et al.*, 2010; Kirby *et al.*, 2010; Hagberg, 2005; Guideri *et al.*, 1999; Kerr et Julu, 1999].

3.3 Nombre de patients visés

Le RTT est présent dans l'ensemble des groupes ethniques. Sa prévalence varie entre 1/10 000 et 1/22 000 selon le pays [Kirby *et al.*, 2010; Hagberg et Hagberg, 1997; Kozinetz *et al.*, 1993]. Le demandeur prévoit d'effectuer 30 analyses annuellement.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Pédiatrie, génétique médicale et conseil génétique.

3.5 Modalités d'administration du test

L'analyse sera prescrite en cas de suspicion de RTT ou pour la recherche du statut de porteur.

4. CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le diagnostic clinique du RTT est basé sur les caractéristiques et symptômes observés au cours de la croissance et du développement de l'enfant et sur les évaluations continues de son état physique et neurologique [Neul *et al.*, 2010].

Les tests génétiques disponibles actuellement (dont le séquençage et la MLPA pour *MECP2*) sont complémentaires au diagnostic clinique. Leur but est de confirmer le diagnostic en cas de suspicion de RTT ou de déterminer l'étiologie génétique de la maladie.

Actuellement, une partie des analyses est effectuée hors Québec et une partie par le demandeur (24 depuis l'implantation de l'analyse). Le recensement de dix laboratoires offrant la recherche de mutation dans le gène *MECP2* a permis de déterminer que le séquençage de type Sanger ou NGS couplé à une approche par MLPA et/ou micropuce et/ou PCR quantitatif est utilisé à des fins cliniques (Baylor College of Medicine-Medical genetic Laboratory, Arup Laboratories, Children's Hospital of Philadelphia, All Children's Hospital-Johns Hopkins Medicine, Gene Dx, University of Chicago- Genetic Services Laboratory, Children's Hospital of Eastern Ontario, Molecular Genetics Diagnostic Laboratory Center for Human Genetics, Athena Diagnostics).

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Cette analyse est actuellement effectuée en partie hors Québec et par le demandeur. Pour l'année 2012-2013, 29 analyses (séquençage et MLPA confondus) ont été réalisées hors Québec pour un coût de 16 953 \$.

Les coûts associés à ces analyses auraient été de 13 972 \$ si elles avaient été réalisées au Québec, soit une économie de près de 3 000 \$.

4.4 Coûts de la technologie et des options : n'ont pas été évalués.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : cette analyse ne remplace aucun autre test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Le diagnostic du RTT est basé sur un profil développemental spécifique qui satisfait à des critères bien établis [Neul *et al.*, 2010] (annexe B). Toutefois, certains cas atypiques de RTT sont plus difficiles à diagnostiquer cliniquement et la recherche de mutations dans le gène *MECP2* peut permettre de confirmer ou d'exclure le RTT, limitant ainsi l'errance clinique.

Aucun traitement pour le RTT n'est disponible actuellement. Toutefois, plusieurs comorbidités affectent les patients atteints de RTT. Une littérature abondante rapporte des problèmes de croissance et de nutrition, d'épilepsie, de troubles respiratoires, d'anomalies cardiaques, de scoliose, de troubles du sommeil et de troubles moteurs. Un diagnostic définitif peut permettre de prodiguer des conseils sur l'évolution clinique attendue et de proposer un traitement symptomatique et multidisciplinaire adapté.

Le test permet également d’offrir un conseil génétique aux parents et de déterminer le statut de porteur.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Il n’existe actuellement aucun traitement efficace du RTT. Toutefois, certaines observations sur des modèles animaux suggèrent qu’une inversion du processus de la maladie est possible [Castro *et al.*, 2014; Tropea *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2008; Guy *et al.*, 2007; Roux *et al.*, 2007]. Plusieurs stratégies de traitement sont en émergence, et certains essais précliniques et cliniques montrent des résultats encourageants [Castro *et al.*, 2014; Khwaja *et al.*, 2014].

Divers essais observationnels et interventionnels de phase I et II sont en cours. Parmi les traitements en cours d’évaluation, l’efficacité de l’IGF-1 et de la desipramine sera mesurée dans une perspective d’amélioration des symptômes cognitifs et comportementaux (NCT01520363, 02153723, 01777542, 02061137¹¹⁰). La performance d’autres molécules est également étudiée dans le traitement de certains symptômes cliniques ou de comorbidités associées au RTT tels l’épilepsie et les troubles respiratoires (NCT02023424, NCT00990691¹¹¹).

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)		X	
Valeur prédictive négative (VPN)		X	
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

5.2.1 Association de *MECP2* au RTT

L’association de l’étiologie du RTT à des mutations dans le gène *MECP2* a initialement été rapportée par Amir et ses collaborateurs [1999] à l’aide d’une série de 21 cas sporadiques et d’une famille chez laquelle une transmission héréditaire de la maladie avait été observée. Chez cinq de ces patients, des mutations faux-sens ou non-sens ou entraînant un changement de cadre de lecture ont été rapportées. Le tableau 1 indique quelques-unes des premières études d’évaluation de la contribution de mutations dans le gène *MECP2* à l’étiologie génétique du RTT.

110. ClinicalTrials.gov [site Web]. Placebo controlled trial of dextromethorphan in Rett syndrome (PCTDMRTT), <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01520363> ; Pharmacological treatment of Rett syndrome with glatiramer acetate (Copaxone), <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02153723> ; Treatment of Rett syndrome with recombinant human IGF-1, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01777542> ; Study to assess safety and efficacy of fingolimod in children with Rett syndrome (FINGORETT), <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02061137> (consultés le 18 août 2014).

111. ClinicalTrials.gov [site Web]. An open-label, exploratory study to investigate the treatment effect of glatiramer acetate on girls with Rett syndrome, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02023424> ; Pilot study of the effects of the desipramine on the neurovegetative parameters of the child with Rett syndrome, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00990691> (consultés le 18 août 2014).

Tableau 1 Quelques études initiales de validation de la pertinence clinique des mutations du gène *MECP2* dans le syndrome de RETT (RTT)

ÉTUDE	CRITÈRES DE DIAGNOSTIC	APPROCHE TECHNIQUE	NOMBRE D'INDIVIDUS	CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA COHORTE	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATION	%	TYPE DE MUTATION	COMMENTAIRE
Amir <i>et al.</i> , 1999	n.s.	Séquençage ¹ CSGE ²	21	RTT	5	23,8	3 faux-sens 1 non-sens 1 changement de cadre de lecture (insertion)	
Wan <i>et al.</i> , 1999	n.s.	Séquençage ¹ Confirmation par RFLP ³ lorsque possible	18 familles	RTT familial	16	88,9	5 faux-sens 2 non-sens 3 changements de cadre de lecture (insertions ou délétions mineures)	
Lam <i>et al.</i> , 2000	Retts, 1988 ⁴	dHPLC ⁵ Séquençage ¹	13	RTT	6	46,1	1 faux-sens 2 non-sens 3 changements de cadre de lecture (insertions ou délétions mineures)	
			21	Autisme et déficience intellectuelle	1	4,8		
			100	Témoins	0	0		
Xiang <i>et al.</i> , 2000	n.s.	Séquençage ¹	69	RTT sporadique	27	39,1	6 faux-sens 3 non-sens 7 changements de cadre de lecture (insertions ou délétions entre 7 et 100 bases)	
			9 familles (19 filles)	RTT familial	0	0		
			n.s.	Témoins – parents et fratrie des cas porteurs de mutations dans <i>MECP2</i>	0	0		
			10	Témoins	0	0		
Cheadle <i>et al.</i> , 2000	Adapté de Hagberg, 1993 et Trevathan	Séquençage ¹	48	RTT classiques sporadiques	39	81,2	12 faux-sens 4 non-sens 5 changements de cadre de lecture	
			7 familles	RTT familial	5	71,4		

ÉTUDE	CRITÈRES DE DIAGNOSTIC	APPROCHE TECHNIQUE	NOMBRE D'INDIVIDUS	CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA COHORTE	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATION	%	TYPE DE MUTATION	COMMENTAIRE
	et Moser, 1988		5	RTT possible	1	20		
Huppke <i>et al.</i> , 2000	Hagberg <i>et al.</i> , 1985	Séquençage ¹	27	RTT classique	20	77,4	8 faux-sens 4 non-sens 1 affectant le site d'épissage 4 changements de cadre de lecture	
			4	RTT atypique	4	100		
			40	Témoins – parents de 20 cas avec mutation dans <i>MECP2</i>	0	0		
Bienvenu <i>et al.</i> , 2000	Rett, 1988 ⁴	Pour 10 échantillons : séquençage ¹ Pour 38 échantillons: DGGE ⁵ + confirmation par séquençage ¹	46	RTT classique (diagnostiqués, possibles et probables)	30	65	9 faux-sens 15 non-sens 6 changements de cadre de lecture	
			60	Témoins – parents des cas mutés	1	1,7		Mère asymptomatique présentant un biais du patron d'inactivation du chromosome X
			50	Témoins	0	0		
De Bona <i>et al.</i> , 2000	Trevathan et Moser, 1988	SSCP ⁶ Confirmation par séquençage ¹	25	RTT	20	80	2 faux-sens 5 non-sens 6 changements de cadre de lecture	
			3	RTT atypique	2	67		
			39	Témoins – parents des cas mutés	0	0		
			16	Témoins – fratrie des cas mutés	0	0		
Obata <i>et al.</i> , 2000	n.s.	DGGE ⁵ Confirmation par séquençage ¹	38	RTT classique	36	90	7 faux-sens 3 non-sens 5 changements de cadre de lecture (délétion)	
			2	RTT atypique				

ÉTUDE	CRITÈRES DE DIAGNOSTIC	APPROCHE TECHNIQUE	NOMBRE D'INDIVIDUS	CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA COHORTE	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATION	%	TYPE DE MUTATION	COMMENTAIRE
			80	Témoins – parents	0	0		
			105	Témoins – femmes non affectées	0	0		
Hampson <i>et al.</i> , 2000	n.s.	SSCP ⁶ Confirmation par séquençage ¹	30	RTT	14	44	4 faux-sens 4 non-sens	
			5 familles	10 cas RTT familial	1 dans 1 des filles	10		
Buyse <i>et al.</i> , 2000	n.s.	dHPLC ³ Séquençage ¹	19	RTT classique	16	84	8 faux-sens 9 non-sens 1 mutation d'un site d'épissage 14 changements de cadre de lecture	
			209	RTT possible	83	40		7 VUS
			11	Témoins RTT classique mutés ou membres de famille non affectés	n.s.			11/11 génotypes attendus

Note : Ces études ont été publiées avant l'identification de ce qui est actuellement considéré comme l'exon 1 de *MECP2* [Reichwald *et al.*, 2000]. Par conséquent, seuls les exons 2,3 et 4 ont été recherchés dans ces études.

Abréviations : n.s. : non spécifié; RTT : syndrome de Rett; VUS : variant de signification inconnue.

1. Séquençage cyclique de type Sanger.

2. Électrophorèse sur gel sensible à la conformation (*conformation-sensitive gel electrophoresis*).

3. Polymorphisme de taille des fragments (*restriction fragment length polymorphism*).

4. *Rett Syndrome Diagnostic Criteria Working Group*, 1988.

5. Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant.

6. Polymorphisme de conformation simple brin.

5.2.2 Prévalence de mutation de *MECP2* dans le RTT

La prévalence des mutations pathogéniques détectées dans les diverses études est hautement variable d'une série à l'autre, s'échelonnant de 19 % à 100 % [Auranen *et al.*, 2001; Amir *et al.*, 1999]. Ces variations sont vraisemblablement dues à l'hétérogénéité des critères utilisés pour définir les cohortes à l'étude et à la caractérisation du phénotype des patients. Les patients à l'étude sont fréquemment classifiés avec la mention « cas probable » ou patients avec des caractéristiques « RETT-like » [Erlandson *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Buyse *et al.*, 2000]. Depuis, la révision et l'uniformisation de critères de diagnostic cliniques, l'étude de cohortes plus importantes, l'ajout d'approches techniques permettant la détection de délétions majeures et la découverte d'un exon supplémentaire ont permis de déterminer qu'une mutation pathologique de *MECP2* est détectable chez plus de 90-95 % des patients atteints de RTT classique et chez environ 58-76 % des cas de RTT atypiques [Cuddapah *et al.*, 2014; Temudo *et al.*, 2011; Percy *et al.*, 2010; Neul *et al.*, 2010; Neul *et al.*, 2008; Percy *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2005; Kammoun *et al.*, 2004; Erlandson *et al.*, 2003; Reichwald *et al.*, 2000] (tableau 2).

Plus de 4817 variations ont été décrites dans *MECP2*. Parmi celles-ci, 534 ont été jugées pathogéniques et 62 ont un impact encore inconnu (VUS¹¹²). Les 8 mutations les plus fréquentes (mutations ponctuelles faux-sens et non-sens) sont observées dans environ 58 à 78 % des cas (tableau 3). Des délétions majeures sont reconnues chez 3 à 10 % des patients et des mutations multiples dans environ 1,5 % des cas. Environ 90 % des mutations rapportées affectent l'exon 4, et 7 % l'exon 3 [Cuppadah *et al.*, 2014; Cardoza *et al.*, 2011; Percy *et al.*, 2010; Percy *et al.*, 2007; Philippe *et al.*, 2006; Christodoulou *et al.*, 2003; Laccone *et al.*, 2001]. Les mutations de *MECP2* affectent ses fonctions sur le plan du contrôle de la transcription de gènes cibles tel *BDNF* et mènent à une expression aberrante de ces derniers [revue par Mbadiwe et Millis, 2013; Chahrour *et al.*, 2008].

112. RettBASE: RettSyndrome.org Variation Database [site Web], disponible à : <http://mecp2.chw.edu.au/> (consulté le 24 août 2014).

Tableau 2 Rendement diagnostique d'études de cohortes de plus de 100 cas de syndrome de Rett (RTT) depuis 2010

ÉTUDE	CRITÈRES DE DIAGNOSTIC	APPROCHE TECHNIQUE	NOMBRE D'INDIVIDUS	CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA COHORTE	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATION	%	COMMENTAIRE
Kirby <i>et al.</i> , 2010 ¹	n.s.	n.s.	870	RTT classique	800	92	Patients faisant partie de la North American Database ²
			162	RTT atypique	94	58	
			21	Ne satisfont pas aux critères de diagnostic mais portent une mutation dans <i>MECP2</i>	21		
Percy <i>et al.</i> , 2010 ¹	Hagberg <i>et al.</i> , 2002	n.s.	653	RTT classique	620	95	
			112	RTT atypique	82	73.2	
			31	Femme avec statut de porteur dans familles RTT	31		Ne satisfont pas aux critères de diagnostic
			23	Garçons porteurs de mutation dans <i>MECP2</i> ²	23		Ne satisfont pas aux critères de diagnostic
Fehr <i>et al.</i> , 2010	Hagberg <i>et al.</i> , 2002 ou mutation pathogénique de <i>MECP2</i>	n.s.	797	RTT classique et atypique	654	85	<i>Australia Rett Syndrome Database (ARSD) et InterRett</i>
Zhang <i>et al.</i> , 2012	n.s.	Sanger MLPA	305	RTT classique	274	89.3	
			58	RTT atypique	41	70.7	
			244	Témoins (mères des cas index)	1	0.4	Mère asymptomatique présentant un biais du patron d'inactivation du chromosome X
			139	Parents de cas index	0		
Cuddapah <i>et al.</i> , 2014	n.s.	n.s.	815	RTT classique	786	96	
			148	RTT atypique	112	76	

Abréviations : n.s. : non spécifié; RTT : syndrome de Rett.

1. Les banques de patients utilisées pour ces études sont constituées de patients ayant reçu un diagnostic de RTT et d'individus porteurs de mutations dans *MECP2* sans diagnostic de RTT.

2. Les patients inclus dans ces cohortes devaient être atteint du RTT ou être porteurs d'une mutation dans *MECP2*.

5.2.3 Corrélation génotype-phénotype

L'association de *MECP2* au RTT a mené à de nombreuses études de corrélation génotype-phénotype en fonction de la mutation spécifique au patient. Les recherches initiales, basées sur des cohortes limitées, ont présenté des résultats inconsistants [Kammoun *et al.*, 2004; Weaving *et al.*, 2003; Huppke *et al.*, 2002; Laccone *et al.*, 2001; Hoffbuhr *et al.*, 2001; Amir *et al.*, 2000]. Toutefois, les études plus récentes basées sur des cohortes plus nombreuses, la création de bases de données nationales et internationales (dont *RettsBASE*, *North American Database*, etc.¹¹³) et l'établissement de critères de diagnostic plus précis ont permis d'observer certaines tendances générales plus cohérentes (tableau 3). Il est à noter que plusieurs facteurs génétiques ont été observés, dont les biais d'inactivation du chromosome X (*skewing*), le *background* génétique de même que les facteurs cliniques : la présentation du RTT, les critères de sélection des patients, l'âge du patient et le mode d'évaluation de la sévérité de la maladie sont des éléments qui affectent l'association phénotype-génotype et conduisent à une variabilité complexifiant la corrélation [Charman *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2004; Schanen *et al.*, 2004; Weaving *et al.*, 2003].

Tableau 3 Corrélation phénotypique des mutations les plus communes de *MECP2* dans le RTT

MUTATION	% MUTATIONS TOTALES	GRAVITÉ	LOCALISATION PROTÉIQUE (ANNEXE C)	QUELQUES ÉTUDES
p.R106W	3-4	+++	MBD	Cuddapah <i>et al.</i> , 2014; Bebbington <i>et al.</i> , 2012; Temudo <i>et al.</i> , 2011; Neul <i>et al.</i> , 2010; Lima <i>et al.</i> , 2009; Bebbington <i>et al.</i> , 2008; Colvin <i>et al.</i> , 2004
p.R133C	6-8	+	MBD	
p.R168X	10-12	+++	MBD ou ID (isoforme 1 et 2 respectivement)	
p.T158M	10-13	++	MBD	
p.255X	7-12	+++	TRD	
p.270X	7-9	+++	TRD	
p. R294X	5-9	+	TRD	
p.R306C	6-7	+	TRD	
Troncation en 3'	7-9	+		
Délétion majeure	3-10	+++		

Abréviations : ID: *intervening domain*; MBD : *Methyl-CpG-binding domain*; TRD : *transcriptional repression domain*.

5.2.4 Autres associations génétiques

MECP2 a été associé, dans une faible proportion, à certaines autres maladies neurologiques telles que l'autisme (3 à 13 % des cas), le syndrome d'Angelman (6 %), la déficience intellectuelle, l'encéphalopathie congénitale avec spasticité progressive et la paralysie cérébrale [Schaefer, 2008; Abdul-Rahman et Hudgins, 2006; Moog *et al.*, 2006; Ylisaukko-Oja *et al.*, 2005; Hitchins *et al.*, 2004; Kleefstra *et al.*, 2004; Carney *et al.*, 2003; Yntema *et al.*, 2002; Couvert *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2001; Orrico *et al.*, 2000; Meloni *et al.*, 2000; Villard *et al.*, 2000; Clayton-Smith *et al.*, 2000].

113. *RettsBASE*: *RettsSyndrome.org Variation Database* [site Web], disponible à : <http://mecp2.chw.edu.au/>; Percy *et al.*, 2007; Christodoulou *et al.*, 2003.

Chez environ 5 à 10 % des cas de RTT classique et 24 à 42 % des cas de RTT atypique, aucune mutation dans le gène *MECP2* n'a été détectée. Chez une partie de ces individus, des mutations dans d'autres gènes comme *CDKL5* et *FOXG1* ont été observées comme étiologie génétique [Van der Aa *et al.*, 2011; Ariani *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2005; Scala *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2004; Weaving *et al.*, 2004].

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		X	
Reproductibilité		X	
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice		X	
Concordance	X		
Corrélation entre test et comparateur		X	

La majorité des patients atteints de la forme classique et une proportion significative de ceux atteints de la forme atypique du RTT sont porteurs de mutations dans le gène *MECP2*. Les mutations décrites dans la littérature jusqu'à présent sont constituées de mutations ponctuelles faux-sens ou non-sens affectant les sites d'épissage ainsi que de délétions ou insertions mineures résultant en un changement de cadre de lecture. Des délétions ou des duplications majeures ont également été rapportées [Cuddapah *et al.*, 2014; Bebbington, 2012 *et al.*; Percy *et al.*, 2010].

Le demandeur, conformément à la littérature scientifique sur le sujet, propose deux approches techniques pour détecter l'ensemble des types de mutations décrites : le séquençage cyclique selon l'approche de Sanger et la MLPA. Le séquençage permet la détection des mutations ponctuelles et insertions/délétions mineures alors que la MLPA permet de repérer la délétion ou la duplication de régions importantes. Certains auteurs ont estimé le taux de détection par le séquençage et la MLPA à respectivement 80 à 85 %, et à 8 % des mutations dans le cas du RTT typique [Archer *et al.*, 2006]. En pratique, puisque l'analyse n'est pas demandée uniquement pour les patients satisfaisant aux critères typiques, le taux de détection attendu est moindre.

5.3.1 Séquençage de type Sanger

Le séquençage selon l'approche de Sanger constitue la méthode de référence pour le repérage de mutations ponctuelles ou de délétions/insertions impliquant quelques nucléotides. Sa sensibilité lors du séquençage bidirectionnel d'une matrice d'ADN amplifiée par PCR atteint jusqu'à 99,4 % [Liu *et al.*, 1999]. Tsiatis et ses collaborateurs [2010] de même que Querings et ses collaborateurs [2011] suggèrent qu'une population cellulaire comportant une mutation doit être représentée dans une proportion de 10 à 30 % pour assurer sa détection. Cette limitation doit être prise en considération dans les cas où un mosaïsme est suspecté.

En plus du séquençage, la littérature rapporte l'utilisation de plusieurs autres méthodes de détection de mutations dans *MECP2* telles que le SSCP, le DGGE, le RFLP et le dHPLC

(tableau 1). Toutefois, seules deux études rapportant une validation minimale ont été repérées. Buysse et ses collaborateurs [2000] de même que Nicolao et ses collaborateurs [2001] ont effectué deux études comparatives de la performance de détection de mutations dans *MECP2* par dHPLC et par séquençage. Les concordances obtenues étaient de 98,5 et 57 % respectivement; les auteurs ont observé une discordance sur 1 échantillon sur 99 et 2 échantillons sur 35. Nicolao et ses collaborateurs mentionnent que l'optimisation des conditions du dHPLC a permis une détection subséquente de mutations dans les deux échantillons discordants. Globalement, une discordance de résultats a été observée dans le cas de 3 échantillons sur 134, soit 2,2 %.

Il est à noter que les autres approches utilisées l'étaient dans un contexte de recherche et que, de façon générale, les échantillons dans lesquels une mutation était suspectée à la suite de l'utilisation de la méthode de remplacement étaient analysés de nouveau par séquençage selon l'approche de Sanger pour confirmation et caractérisation de la variation détectée [Hoffbuhr *et al.*, 2001; De Bona *et al.*, 2000; Hampson *et al.*, 2000].

5.3.2 MLPA

Les réarrangements majeurs du gène *MECP2*, comprenant la délétion d'exons ou de gènes entiers, ne sont pas détectables par séquençage. Le PCR quantitatif (PCR temps réel) et la MLPA [Laccone *et al.*, 2004; Schollen *et al.*, 2003] sont les approches techniques les plus souvent utilisées actuellement pour les rechercher. Une approche par buvardage de type Southern a précédemment été décrite, mais son application pour le diagnostic clinique est restreinte en raison de plusieurs limitations techniques dont le temps requis pour effectuer l'analyse et la quantité de matériel biologique nécessaire [Schollen *et al.*, 2003; Yaron *et al.*, 2002; Bourdon *et al.*, 2001].

Peu d'études de validité analytique de la MLPA pour *MECP2* ont été repérées. Schollen et ses collaborateurs [2003] ont rapporté une concordance de la sensibilité de détection par comparaison avec une approche de Southern. Le tableau 5 mentionne une concordance de 92 à 100 % entre les résultats obtenus par MLPA et PCR quantitatif (temps réel).

Tableau 5 Concordance de la MLPA avec les autres approches majeures de détection de réarrangements

Étude	Cohorte	Critères d'inclusion	Nombre de mutations détectées (%)	Méthode de comparaison	Concordance
Schollen <i>et al.</i> , 2003	3	RTT classique sans mutations par séquençage	3	Buvardage de type Southern PCR à grande portée (<i>long range</i> PCR)	3/3
	6	RTT atypique sans mutations par séquençage	0		
Ravn <i>et al.</i> , 2005	19	RTT classique sans mutations par séquençage ²	7 (15,6)	PCR temps réel	7/7
Hardwick <i>et al.</i> , 2007	149	RTT sans mutations par séquençage ¹	13 (8,7)	PCR temps réel et PCR à grande portée (<i>long range</i> PCR)	12/13 La MLPA ayant détecté une délétion mais pas

Étude	Cohorte	Critères d'inclusion	Nombre de mutations détectées (%)	Méthode de comparaison	Concordance
					le Q-PCR
Scala <i>et al.</i> , 2007	33	RTT classique sans mutations par séquençage ¹	15 (45)	PCR temps réel	n.s
	31	RTT atypique sans mutations par séquençage ¹	1 (3)		
	13	RTT-like sans mutations par séquençage ¹	0		

La trousse de MLPA utilisée provient de MRC-Holland, Pays-Bas, à l'exception de celle utilisée dans l'étude de Schollen, 2003.

1. Critères diagnostiques du Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group [Hagberg *et al.*, 2002].

2. Critères diagnostiques d'un groupe d'experts internationaux [Kerr *et al.*, 2001].

Le laboratoire du demandeur offre actuellement cette analyse qui a été validée grâce à une collaboration avec l'Hôpital d'Ottawa duquel il a obtenu une série de 10 échantillons (comprenant 6 mutés). Le génotype de chacun des échantillons a été caractérisé par séquençage et MLPA et il s'est révélé concordant. Depuis, le demandeur a réalisé 24 analyses d'échantillons provenant de patients.

Le laboratoire du demandeur participe actuellement aux épreuves biennuelles d'assurance qualité externe pour les approches de séquençage général et de MLPA par l'intermédiaire de l'épreuve de MLPA pour le gène de *DMN* du College of American Pathologists (CAP), et il prévoit ajouter l'épreuve de *MECP2*.

5.4 Recommandations d'autres organismes

The American Academy of Pediatrics recommande la recherche de mutations dans le gène *MECP2* pour confirmer un RTT, particulièrement lorsque le diagnostic est incertain [Moeschler et Shevell, 2006].

The American Academy of Neurology et l'American College of Genetics and Genomics recommandent plutôt, respectivement, de considérer la recherche de mutations chez toutes les filles présentant un retard développemental de modéré à sévère ou chez l'ensemble des filles présentant un retard développemental sans spécification pour la gravité mais qui ont subi une investigation diagnostique initiale n'ayant pas permis d'établir l'étiologie génétique de la maladie [Schaefer et Mendelsohn, 2013; Michelson *et al.*, 2011].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : n'a pas été analysé.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

Une partie des analyses est actuellement envoyée hors Québec pour un coût supérieur à celui de la valeur pondérée calculée par le demandeur. Il y aurait donc un avantage économique à développer et à réaliser ces analyses au Québec.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été évalués.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La présence de mutations dans le gène *MECP2* est détectée dans environ 90 à 95 % des cas de RTT classique et dans 58 à 76 % des cas de RTT atypiques. La présence de mutations fournit une confirmation du diagnostic pour le RTT, particulièrement dans les cas atypiques chez qui la caractérisation clinique est parfois complexe [Neul *et al.*, 2010; Hagberg *et al.*, 2002].

7.2 Validité clinique

Malgré une forte association entre le RTT et la mutation du gène *MECP2*, une faible proportion d'individus ne satisfaisant pas aux critères diagnostiques de RTT sont porteurs de mutations. Ces observations ont mené au maintien du processus diagnostique basé sur l'observation de caractéristiques cliniques. Toutefois, la présence de mutations dans *MECP2* permet de confirmer le diagnostic, particulièrement chez les cas atypiques complexes.

7.3 Validité analytique

Les deux approches utilisées par le demandeur permettent de détecter l'ensemble des types de mutations décrites pour *MECP2* dans les cas de RTT classique et atypique. Le séquençage cyclique de type Sanger est considéré comme la méthode de référence pour la détection de mutations ponctuelles et de délétions/insertions mineures.

La MLPA permet de repérer les délétions et duplications majeures décrites jusqu'à présent dans le RTT. Sa sensibilité et sa spécificité s'apparentent à celles observées pour les approches de PCR quantitatif.

7.4 Recommandations d'autres organismes

La recherche de mutations dans *MECP2* a été recommandée par l'American Academy of Pediatrics, l'American Academy of Neurology et l'American College of Genetics and Genomics dans le but de confirmer un diagnostic de RTT ou pour déterminer l'étiologie génétique d'un retard développemental.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Séquençage de *MECP2* dans le syndrome de Rett

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction conditionnelle à la présentation d'un algorithme de sélection de patients (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

Analyse pertinente d'un point de vue clinique. Les enfants naissent sans signe clinique, mais ils éprouvent des problèmes de développement pendant l'enfance. Le diagnostic du syndrome de Rett permet le conseil génétique.

Possibilité de surutilisation si les critères de diagnostic et de prescription de l'analyse ne sont pas bien définis. Il sera important de s'assurer que le volume ne dépassera pas les prévisions annuelles du demandeur.

RÉFÉRENCES

- Abdul-Rahman OA et Hudgins L. The diagnostic utility of a genetics evaluation in children with pervasive developmental disorders. *Genet Med* 2006;8(1):50-4.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, et al. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 2000;47(5):670-9.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23(2):185-8.
- Archer HL, Whatley SD, Evans JC, Ravine D, Huppke P, Kerr A, et al. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J Med Genet* 2006;43(5):451-6.
- Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, et al. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83(1):89-93.
- Auranen M, Vanhala R, Vosman M, Levander M, Varilo T, Hietala M, et al. MECP2 gene analysis in classical Rett syndrome and in patients with Rett-like features. *Neurology* 2001;56(5):611-7.
- Bebbington A, Downs J, Percy A, Pineda M, Zeev BB, Bahi-Buisson N, Leonard H. The phenotype associated with a large deletion on MECP2. *Eur J Hum Genet* 2012;20(9):921-7.
- Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Fyfe S, Pineda M, de Klerk N, et al. Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. *Neurology* 2008;70(11):868-75.
- Bienvenu T, Carrie A, de Roux N, Vinet MC, Jonveaux P, Couvert P, et al. MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9(9):1377-84.
- Bourdon V, Philippe C, Grandemenge A, Reichwald K, Jonveaux P. Deletion screening by fluorescence in situ hybridization in Rett syndrome patients. *Ann Genet* 2001;44(4):191-4.
- Buyse IM, Fang P, Hoon KT, Amir RE, Zoghbi HY, Roa BB. Diagnostic testing for Rett syndrome by DHPLC and direct sequencing analysis of the MECP2 gene: Identification of several novel mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1428-36.
- Cardoza B, Clarke A, Wilcox J, Gibbon F, Smith PE, Archer H, et al. Epilepsy in Rett syndrome: Association between phenotype and genotype, and implications for practice. *Seizure* 2011;20(8):646-9.
- Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, et al. Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 2003;28(3):205-11.

- Castro J, Garcia RI, Kwok S, Banerjee A, Petravicz J, Woodson J, et al. Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(27):9941-6.
- Chae JH, Hwang H, Hwang YS, Cheong HJ, Kim KJ. Influence of MECP2 gene mutation and X-chromosome inactivation on the Rett syndrome phenotype. *J Child Neurol* 2004;19(7):503-8.
- Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 2008;320(5880):1224-9.
- Charman T, Neilson TC, Mash V, Archer H, Gardiner MT, Knudsen GP, et al. Dimensional phenotypic analysis and functional categorisation of mutations reveal novel genotype-phenotype associations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005;13(10):1121-30.
- Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, et al. Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: Correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* 2000;9(7):1119-29.
- Christodoulou J, Grimm A, Maher T, Bennetts B. RettBASE: The IRSA MECP2 variation database—A new mutation database in evolution. *Hum Mutat* 2003;21(5):466-72.
- Clayton-Smith J, Watson P, Ramsden S, Black GC. Somatic mutation in MECP2 as a non-fatal neurodevelopmental disorder in males. *Lancet* 2000;356(9232):830-2.
- Colvin L, Leonard H, de Klerk N, Davis M, Weaving L, Williamson S, Christodoulou J. Refining the phenotype of common mutations in Rett syndrome. *J Med Genet* 2004;41(1):25-30.
- Couvert P, Bienvu T, Aquaviva C, Poirier K, Moraine C, Gendrot C, et al. MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 2001;10(9):941-6.
- Cuddapah VA, Pillai RB, Shekar KV, Lane JB, Motil KJ, Skinner SA, et al. Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) mutation type is associated with disease severity in Rett syndrome. *J Med Genet* 2014;51(3):152-8.
- De Bona C, Zappella M, Hayek G, Meloni I, Vitelli F, Bruttini M, et al. Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 2000;8(5):325-30.
- Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlstrom J. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the MECP2 gene of Swedish Rett syndrome patients. *Genet Test* 2003;7(4):329-32.
- Erlandson A, Hallberg B, Hagberg B, Wahlstrom J, Martinsson T. MECP2 mutation screening in Swedish classical Rett syndrome females. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2001;10(2):117-21.
- Evans JC, Archer HL, Whatley SD, Kerr A, Clarke A, Butler R. Variation in exon 1 coding region and promoter of MECP2 in Rett syndrome and controls. *Eur J Hum Genet* 2005;13(1):124-6.
- Fehr S, Downs J, Bebbington A, Leonard H. Atypical presentations and specific genotypes are associated with a delay in diagnosis in females with Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 2010;152A(10):2535-42.

- Freilinger M, Bebbington A, Lanator I, De Klerk N, Dunkler D, Seidl R, et al. Survival with Rett syndrome: Comparing Rett's original sample with data from the Australian Rett Syndrome Database. *Dev Med Child Neurol* 2010;52(10):962-5.
- Gauthier J, de Amorim G, Mnatzakanian GN, Saunders C, Vincent JB, Toupin S, et al. Clinical stringency greatly improves mutation detection in Rett syndrome. *Can J Neurol Sci* 2005;32(3):321-6.
- Geerdink N, Rotteveel JJ, Lammens M, Sistermans EA, Heikens GT, Gabreels FJ, et al. MECP2 mutation in a boy with severe neonatal encephalopathy: Clinical, neuropathological and molecular findings. *Neuropediatrics* 2002;33(1):33-6.
- Guideri F, Acampa M, Hayek G, Zappella M, Di Perri T. Reduced heart rate variability in patients affected with Rett syndrome. A possible explanation for sudden death. *Neuropediatrics* 1999;30(3):146-8.
- Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 2007;315(5815):1143-7.
- Hagberg B. Rett syndrome: Long-term clinical follow-up experiences over four decades. *J Child Neurol* 2005;20(9):722-7.
- Hagberg B. Clinical delineation of Rett syndrome variants. *Neuropediatrics* 1995;26(2):62.
- Hagberg B. Clinical criteria, stages and natural history. Dans : Hagberg B, Anvret M, Wahlström J, réd. *Rett syndrome – Clinical and biological aspects Clinics in Developmental Medicine*, No. 127. Londres, Angleterre : Mac Keith Press; 1993 : 4-20.
- Hagberg B et Hagberg G. Rett syndrome: Epidemiology and geographical variability. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 1997;6(Suppl 1):5-7.
- Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* 2002;6(5):293-7.
- Hagberg B, Goutieres F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J. Rett syndrome: Criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 1985;7(3):372-3.
- Hampson K, Woods CG, Latif F, Webb T. Mutations in the MECP2 gene in a cohort of girls with Rett syndrome. *J Med Genet* 2000;37(8):610-2.
- Hardwick SA, Reuter K, Williamson SL, Vasudevan V, Donald J, Slater K, et al. Delineation of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients, including a familial case with a male proband. *Eur J Hum Genet* 2007;15(12):1218-29.
- Hitchins MP, Rickard S, Dhalla F, Fairbrother UL, de Vries BB, Winter R, et al. Investigation of UBE3A and MECP2 in Angelman syndrome (AS) and patients with features of AS. *Am J Med Genet A* 2004;125A(2):167-72.
- Hoffbuhr K, Devaney JM, LaFleur B, Sirianni N, Scacheri C, Giron J, et al. MeCP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. *Neurology* 2001;56(11):1486-95.
- Huppke P, Held M, Hanefeld F, Engel W, Laccone F. Influence of mutation type and location on phenotype in 123 patients with Rett syndrome. *Neuropediatrics* 2002;33(2):63-8.

- Huppke P, Laccone F, Kramer N, Engel W, Hanefeld F. Rett syndrome: Analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Hum Mol Genet* 2000;9(9):1369-75.
- Kammoun F, de Roux N, Boespflug-Tanguy O, Vallee L, Seng R, Tardieu M, Landrieu P. Screening of MECP2 coding sequence in patients with phenotypes of decreasing likelihood for Rett syndrome: A cohort of 171 cases. *J Med Genet* 2004;41(6):e85.
- Kerr AM et Julu PO. Recent insights into hyperventilation from the study of Rett syndrome. *Arch Dis Child* 1999;80(4):384-7.
- Kerr AM, Nomura Y, Armstrong D, Anvret M, Belichenko PV, Budden S, et al. Guidelines for reporting clinical features in cases with MECP2 mutations. *Brain Dev* 2001;23(4):208-11.
- Khwaja OS, Ho E, Barnes KV, O'Leary HM, Pereira LM, Finkelstein Y, et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary assessment of efficacy of mecasermin (recombinant human IGF-1) for the treatment of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(12):4596-601.
- Kirby RS, Lane JB, Childers J, Skinner SA, Annese F, Barrish JO, et al. Longevity in Rett syndrome: Analysis of the North American Database. *J Pediatr* 2010;156(1):135-8 e1.
- Kleefstra T, Yntema HG, Nillesen WM, Oudakker AR, Mullaart RA, Geerdink N, et al. MECP2 analysis in mentally retarded patients: Implications for routine DNA diagnostics. *Eur J Hum Genet* 2004;12(1):24-8.
- Kozinetz CA, Skender ML, MacNaughton N, Almes MJ, Schultz RJ, Percy AK, Glaze DG. Epidemiology of Rett syndrome: A population-based registry. *Pediatrics* 1993;91(2):445-50.
- Laccone F, Junemann I, Whatley S, Morgan R, Butler R, Huppke P, Ravine D. Large deletions of the MECP2 gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome. *Hum Mutat* 2004;23(3):234-44.
- Laccone F, Huppke P, Hanefeld F, Meins M. Mutation spectrum in patients with Rett syndrome in the German population: Evidence of hot spot regions. *Hum Mutat* 2001;17(3):183-90.
- Lam CW, Yeung WL, Ko CH, Poon PM, Tong SF, Chan KY, et al. Spectrum of mutations in the MECP2 gene in patients with infantile autism and Rett syndrome. *J Med Genet* 2000;37(12):E41.
- Leonard H, Silberstein J, Falk R, Houwink-Manville I, Ellaway C, Raffaele LS, et al. Occurrence of Rett syndrome in boys. *J Child Neurol* 2001;16(5):333-8.
- Lima FT, Brunoni D, Schwartzman JS, Pozzi MC, Kok F, Juliano Y, Pereira Lda V. Genotype-phenotype correlation in Brazilian Rett syndrome patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67(3A):577-84.
- Liu S, Shi Y, Ja WW, Mathies RA. Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels. *Anal Chem* 1999;71(3):566-73.
- Lundvall M, Samuelsson L, Kyllerman M. Male Rett phenotypes in T158M and R294X MeCP2-mutations. *Neuropediatrics* 2006;37(5):296-301.
- Masuyama T, Matsuo M, Jing JJ, Tabara Y, Kitsuki K, Yamagata H, et al. Classic Rett syndrome in a boy with R133C mutation of MECP2. *Brain Dev* 2005;27(6):439-42.
- Mbadiwe T et Millis RM. Epigenetics and autism. *Autism Res Treat* 2013;2013:826156.

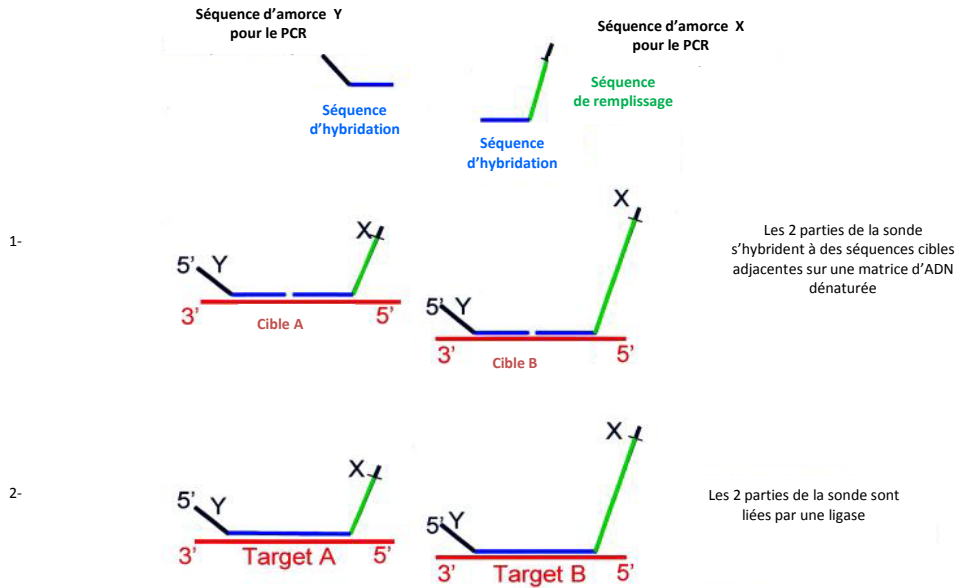
- Meloni I, Bruttini M, Longo I, Mari F, Rizzolio F, D'Adamo P, et al. A mutation in the Rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet* 2000;67(4):982-5.
- Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2011;77(17):1629-35.
- Moeschler JB et Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006;117(6):2304-16.
- Moog U, Van Roozendaal K, Smeets E, Tserpelis D, Devriendt K, Buggenhout GV, et al. MECP2 mutations are an infrequent cause of mental retardation associated with neurological problems in male patients. *Brain Dev* 2006;28(5):305-10.
- Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, et al. Rett syndrome: Revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol* 2010;68(6):944-50.
- Neul JL, Fang P, Barrish J, Lane J, Caeg EB, Smith EO, et al. Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology* 2008;70(16):1313-21.
- Nicolao P, Carella M, Giometto B, Tavolato B, Cattin R, Giovannucci-Uzielli ML, et al. DHPLC analysis of the MECP2 gene in Italian Rett patients. *Hum Mutat* 2001;18(2):132-40.
- Obata K, Matsuishi T, Yamashita Y, Fukuda T, Kuwajima K, Horiuchi I, et al. Mutation analysis of the methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) in patients with Rett syndrome. *J Med Genet* 2000;37(8):608-10.
- Orrico A, Lam C, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, et al. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 2000;481(3):285-8.
- Percy AK, Neul JL, Glaze DG, Motil KJ, Skinner SA, Khwaja O, et al. Rett syndrome diagnostic criteria: Lessons from the Natural History Study. *Ann Neurol* 2010;68(6):951-5.
- Percy AK, Lane JB, Childers J, Skinner S, Annese F, Barrish J, et al. Rett syndrome: North American database. *J Child Neurol* 2007;22(12):1338-41.
- Philippe C, Villard L, De Roux N, Raynaud M, Bonnefond JP, Pasquier L, et al. Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: A molecular update. *Eur J Med Genet* 2006;49(1):9-18.
- Pieras JI, Munoz-Cabello B, Borrego S, Marcos I, Sanchez J, Madruga M, Antinolo G. Somatic mosaicism for Y120X mutation in the MECP2 gene causes atypical Rett syndrome in a male. *Brain Dev* 2011;33(7):608-11.
- Querings S, Altmuller J, Ansen S, Zander T, Seidel D, Gabler F, et al. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One* 2011;6(5):e19601.
- Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mutat* 2005;25(3):324.
- Reichwald K, Thiesen J, Wiehe T, Weitzel J, Poustka WA, Rosenthal A, et al. Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 2000;11(3):182-90.

- Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group. Diagnostic criteria for Rett syndrome. *Ann Neurol* 1988;23(4):425-8.
- Roux JC, Dura E, Moncla A, Mancini J, Villard L. Treatment with desipramine improves breathing and survival in a mouse model for Rett syndrome. *Eur J Neurosci* 2007;25(7):1915-22.
- Scala E, Longo I, Ottimo F, Speciale C, Sampieri K, Katzaki E, et al. MECP2 deletions and genotype-phenotype correlation in Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;143A(23):2775-84.
- Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 2005;42(2):103-7.
- Schaefer GB. Genetics considerations in cerebral palsy. *Semin Pediatr Neurol* 2008;15(1):21-6.
- 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.
- Schanen C, Houwink EJ, Dorrani N, Lane J, Everett R, Feng A, et al. Phenotypic manifestations of MECP2 mutations in classical and atypical Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 2004;126A(2):129-40.
- Schollen E, Smeets E, Deflem E, Fryns JP, Matthijs G. Gross rearrangements in the MECP2 gene in three patients with Rett syndrome: Implications for routine diagnosis of Rett syndrome. *Hum Mutat* 2003;22(2):116-20.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.
- Schwartzman JS, Bernardino A, Nishimura A, Gomes RR, Zatz M. Rett syndrome in a boy with a 47,XXY karyotype confirmed by a rare mutation in the MECP2 gene. *Neuropediatrics* 2001;32(3):162-4.
- Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75(6):1149-54.
- Temudo T, Santos M, Ramos E, Dias K, Vieira JP, Moreira A, et al. Rett syndrome with and without detected MECP2 mutations: An attempt to redefine phenotypes. *Brain Dev* 2011;33(1):69-76.
- Topçu M, Akyerli C, Sayi A, Toruner GA, Kocoglu SR, Cimbis M, Ozcelik T. Somatic mosaicism for a MECP2 mutation associated with classic Rett syndrome in a boy. *Eur J Hum Genet* 2002;10(1):77-81.
- Trevathan E et Moser HW. Diagnostic criteria for Rett syndrome. *Ann Neurol* 1988;23(4):425-8.
- Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, et al. Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(6):2029-34.
- Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: Diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010;12(4):425-32.

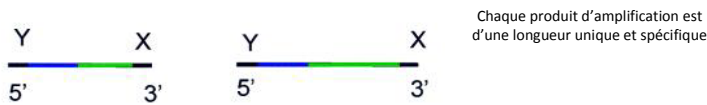
- Van der Aa N, Van den Bergh M, Ponomarenko N, Verstraete L, Ceulemans B, Storm K. Analysis of FOXP1 is highly recommended in male and female patients with Rett syndrome. *Mol Syndromol* 2011;1(6):290-3.
- Villard L, Kpebe A, Cardoso C, Chelly PJ, Tardieu PM, Fontes M. Two affected boys in a Rett syndrome family: Clinical and molecular findings. *Neurology* 2000;55(8):1188-93.
- Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, et al. Rett syndrome and beyond: Recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 1999;65(6):1520-9.
- Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* 2001;38(4):224-8.
- Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75(6):1079-93.
- Weaving LS, Williamson SL, Bennetts B, Davis M, Ellaway CJ, Leonard H, et al. Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype. *Am J Med Genet A* 2003;118A(2):103-14.
- Xiang F, Buervenich S, Nicolao P, Bailey ME, Zhang Z, Anvret M. Mutation screening in Rett syndrome patients. *J Med Genet* 2000;37(4):250-5.
- Yamada Y, Miura K, Kumagai T, Hayakawa C, Miyazaki S, Matsumoto A, et al. Molecular analysis of Japanese patients with Rett syndrome: Identification of five novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 2001;18(3):253.
- Yaron Y, Ben Zeev B, Shomrat R, Bercovich D, Naiman T, Orr-Urtreger A. MECP2 mutations in Israel: implications for molecular analysis, genetic counseling, and prenatal diagnosis in Rett syndrome. *Hum Mutat* 2002;20(4):323-4.
- Ylisaukko-Oja T, Rehnstrom K, Vanhala R, Kempas E, von Koskull H, Tengstrom C, et al. MECP2 mutation analysis in patients with mental retardation. *Am J Med Genet A* 2005;132A(2):121-4.
- Yntema HG, Kleefstra T, Oudakker AR, Romein T, de Vries BB, Nillesen W, et al. Low frequency of MECP2 mutations in mentally retarded males. *Eur J Hum Genet* 2002;10(8):487-90.
- Zachariah RM et Rastegar M. Linking epigenetics to human disease and Rett syndrome: The emerging novel and challenging concepts in MeCP2 research. *Neural Plast* 2012;2012:415825.
- Zanella S, Mebarek S, Lajard AM, Picard N, Dutschmann M, Hilaire G. Oral treatment with desipramine improves breathing and life span in Rett syndrome mouse model. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;160(1):116-21.
- Zhang X, Bao X, Zhang J, Zhao Y, Cao G, Pan H, et al. Molecular characteristics of Chinese patients with Rett syndrome. *Eur J Med Genet* 2012;55(12):677-81.

ANNEXE A

Résumé de la réaction de la MLPA

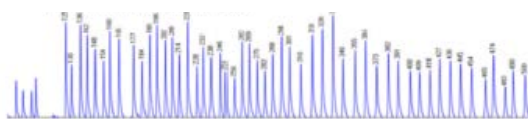


3- Les sondes formées à la suite de la ligation sont amplifiées par PCR avec une seule paire d'amorces.

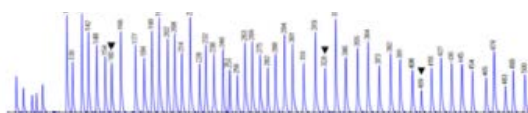


4- Les produits de PCR subissent une électrophorèse sur capillaires permettant leur séparation et leur quantification.

Électrophérogramme de l'échantillon à tester

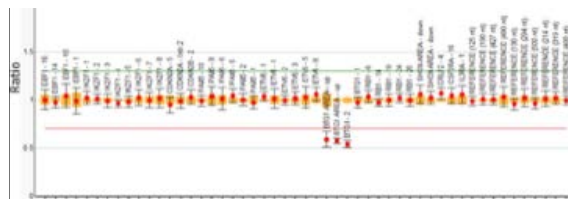


Électrophérogramme de l'échantillon de référence



L'échantillon testé est comparé à un échantillon de référence. Dans cet exemple, les flèches indiquent une diminution relative de 3 sondes.

Analyse des données par localisation génomique



Le calcul des ratios de l'échantillon testé permet d'observer un nombre de copies réduit pour trois sondes adjacentes.

Adapté de Schouten *et al.*, 2002 et MLPA, <http://www.mlpa.com>.

ANNEXE B

Critères diagnostiques pour le syndrome de RETT (révisés par le consortium international Rettsearch en 2010)

Requis pour un RTT classique (typique)

1. Une période de régression neurologique suivie d'une récupération ou d'une stabilisation*
2. Tous les critères principaux doivent être présents et les critères d'exclusion respectés
3. Les critères de soutien ne sont pas nécessaires mais souvent présents

Critères essentiels :

1. Perte partielle ou complète de l'usage volontaire des mains
2. Perte partielle ou complète du langage acquis
3. Anomalie de la démarche – faculté affaiblie (dyspraxie) ou absence de la capacité
4. Mouvements de mains stéréotypiques : tordre/presser, frapper/taper, automatismes de mise à la bouche, lavage et frottement

Critères d'exclusion :

1. Blessure au cerveau consécutive à un traumatisme (période péri ou postnatale), maladies métaboliques ou infection sévère entraînant des troubles neurologiques
2. Développement psychomoteur sévèrement affecté dans les 6 premiers mois de vie

Critères de soutien :

- 1- Troubles respiratoires pendant l'éveil
- 2- Bruxisme en période d'éveil
- 3- Troubles du sommeil
- 4- Tonus musculaire anormal
- 5- Troubles vasomoteurs périphériques
- 6- Scoliose / cyphose
- 7- Retard de croissance
- 8- Pieds et mains petits et froids
- 9- Rires et cris inappropriés
- 10- Réponse à la douleur diminuée
- 11- Intensité dans le regard « regard pointé »

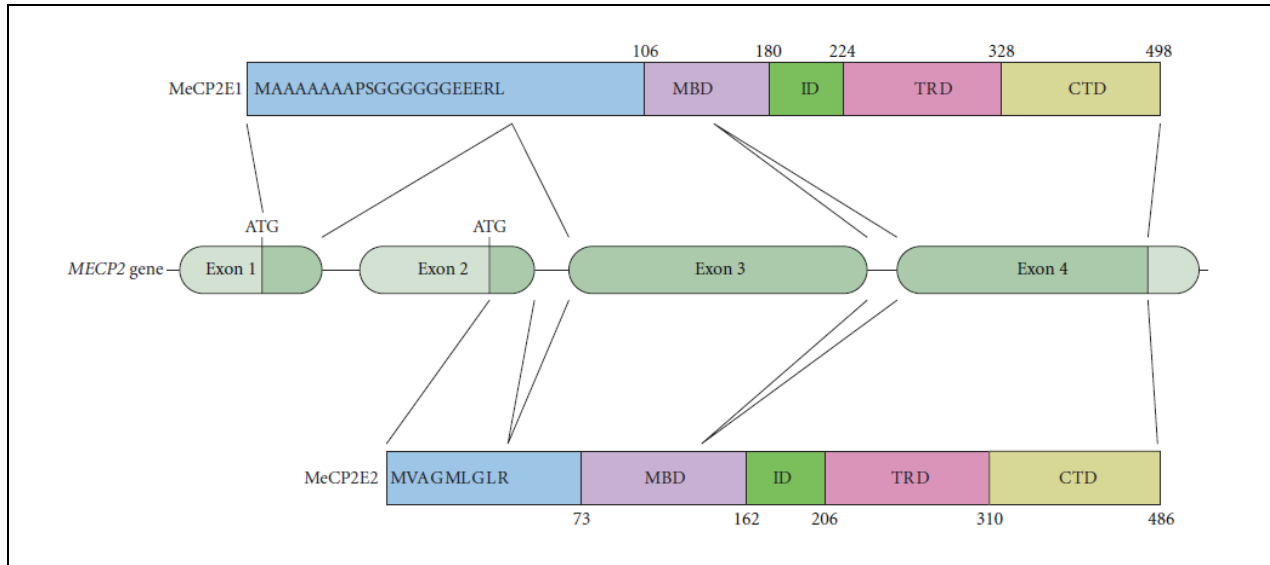
Requis pour un RTT atypique (variant)

1. Une période de régression neurologique suivie d'une récupération ou d'une stabilisation*
2. Un minimum de 2 critères principaux doit être présents.
3. Un minimum de 5 critères de soutien doit être présents.

* La recherche de mutations dans le gène *MECP2* permet un diagnostic de RTT potentiel. Ce diagnostic pourra concerner des patients de moins de 3 ans préalablement à la présentation de preuves claires de régression mais lorsqu'ils présentent certaines caractéristiques cliniques suggestives de RTT. Ces patients devraient être réévalués aux 6 à 12 mois pour rechercher des preuves de régression. Si cette dernière se manifeste, le diagnostic peut être modifié définitivement pour un RTT.

ANNEXE C

Structure du gène *MECP2* et de ses isoformes protéiques



Tiré de Zachariah et Rastegar, 2012.

Légende :

MBD : domaine de liaison aux sites CpG méthylés.

ID : domaine intermédiaire.

TRD : domaine de répression transcriptionnelle. Ce domaine permet l'interaction avec des corépresseurs et des effecteurs : Sin3 et les histones déacétylases HDAC1 and HDAC2.

CTD : *domain carboxyterminal*.

SÉQUENÇAGE DU GÈNE *SYNGAP1* DANS LA DÉFICIENCE INTELLECTUELLE NON SYNDROMIQUE (RÉFÉRENCE – 2014.02.13)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 22 août 2012
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 10 juillet 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 31 octobre 2014

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Séquençage de type Sanger avec résolution par électrophorèse sur capillaires.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le séquençage des 19 exons et des sites d'épissage du gène *SYNGAP1* permet de détecter la présence de mutations associées à l'étiologie de la déficience intellectuelle non syndromique (DINS).

Les régions d'intérêt sont amplifiées par réaction de PCR à l'aide d'une trousse maison. Après la purification du produit grâce à la trousse ExoSAP-IT, une réaction de séquence cyclique de type Sanger est effectuée (trousse Big Dye Terminator v3.1). Les produits de réaction purifiés à l'aide de la trousse BigDye X Terminator sont alors séparés selon leur taille par électrophorèse sur capillaires et la séquence est résolue et analysée.

2.3 Société ou développeur

La réaction de PCR est réalisée à l'aide d'amorces maison et la réaction de séquençage est faite avec la trousse Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies).

Les trousse de purification du produit de PCR ExoSAP-IT sont fabriquées par USB et distribuées par Affimetrix. La purification de la réaction de séquence est faite avec la trousse X Terminator produite par Applied Biosystems (Life Technologies).

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les réactifs, trousse et appareillage utilisés dans le cadre de cette analyse n'ont pas fait l'objet d'une homologation de la part de Santé Canada ou de la FDA.

2.7 Valeur pondérée : 726,0

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Les patients pédiatriques présentant une DINS pour laquelle l'étiologie n'a pu être reconnue représentent la clientèle principale. Toutefois, occasionnellement, l'analyse pourra être demandée pour des adultes et à l'occasion du diagnostic prénatal dans un contexte de risque de mosaïcisme gonadique.

Le modèle de transmission devra être compatible avec un mode autosomique dominant.

3.2 Description de la maladie visée

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit la déficience intellectuelle (DI) comme étant « la capacité sensiblement réduite de comprendre une information nouvelle ou complexe, et d'apprendre et d'appliquer de nouvelles compétences (trouble de l'intelligence). Il s'ensuit une aptitude diminuée à faire face à toute situation de manière indépendante (trouble du fonctionnement social), un phénomène qui commence avant l'âge adulte et exerce un effet durable sur le développement¹¹⁴. »

La prévalence de la DI est évaluée entre 1 et 3 % de la population [Héron et Jacquette, 2009; Shevell *et al.*, 2003; Leonard et Wen, 2002]. Son impact au sein de la société est significatif de par sa prévalence, l'importance des services de soutien nécessaires et les conséquences sociales et émotionnelles sur les individus, leur famille et la société.

La DI est généralement classifiée en fonction de sa gravité, laquelle est évaluée par le quotient intellectuel (QI) [Chiurazzi et Oostra, 2000; Battaglia *et al.*, 1999]. Elle est également classifiée en fonction de la présence (ou non) de caractéristiques morphologiques ou métaboliques associées à un syndrome. Elle sera alors qualifiée respectivement de déficience intellectuelle syndromique (DIS) ou non syndromique (DINS) [Berryer *et al.*, 2013].

L'étiologie de la DI peut être environnementale ou génétique. Dans les pays développés, il est estimé que la plupart des formes les plus graves de DI ont une origine monogénétique. La cause de la DI demeure toutefois inconnue dans 55 % à 60 % des cas [Mefford *et al.*, 2012; Topper *et al.*, 2011; Rauch *et al.*, 2006]. Deux éléments principaux sont à l'origine de cette problématique : d'une part, le nombre de gènes contribuant à l'étiologie a été évalué entre 450 et 1000 [Schuurs-Hoeijmakers *et al.*, 2013; Van Bokhoven, 2011] et, d'autre part, la DI est souvent sporadique et semble causée par des mutations *de novo* [De Ligt *et al.*, 2012]. De plus, certains gènes associés à la DINS ont été mis en cause dans la DIS, la

114. Organisation mondiale de la santé (OMS), Bureau régional de l'Europe. Définition : les déficiences intellectuelles [site Web]. Disponible à : <http://www.euro.who.int/fr/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/news/news/2010/15/childrens-right-to-family-life/definition-intellectual-disability>.

schizophrénie, l'épilepsie et l'autisme, ce qui rend les études de concordance génotype-phénotype difficiles et suggère l'intervention de gènes modificateurs (épistatiques) et une complexité génétique importante [Gilissen *et al.*, 2014; O'Roak *et al.*, 2012].

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur prévoit effectuer 25 analyses par année.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Diagnostic moléculaire, génétique médicale, neurologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Les patients présentant un retard intellectuel avec dysmorphies significatives, explicables ou non par un syndrome connu, ne seront pas testés. De même, un bilan de base (CGH – *comparative genomic hybridization*, et syndrome de l'X-fragile, si pertinent) devrait avoir été réalisé par le clinicien avant de demander le test.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Il s'agit d'une analyse unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le diagnostic et la recherche de l'étiologie de la DI comportent une investigation diagnostique phénotypique et génétique. Plusieurs organismes et groupes d'experts ont formulé des recommandations à ce sujet, dont l'American Academy of Pediatrics (AAP) et l'American Academy of Neurology (AAN) [Héron et Jacquette, 2009; Moeschler et Shevell, 2006; Shevell *et al.*, 2003]. La série de tests sélectionnée est souvent dépendante du phénotype particulier de l'individu. Les analyses biomédicales, l'imagerie cérébrale, l'électrophysiologie et des examens génétiques et métaboliques font partie des examens diagnostiques demandés.

Les analyses de cytogénétique et de CGH permettent de diagnostiquer environ 30 à 35 % des cas de DI [Flore et Milunsky, 2012; Cooper *et al.*, 2011; Manning et Hudgins, 2010; Miller *et al.*, 2010; Hochstenbach *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2006; Leonard et Wen, 2002]. Le rendement associé à la recherche de mutations dans des gènes ciblés est actuellement d'environ 5 à 10 % [Willemsen et Kleefstra, 2014; Topper *et al.*, 2011].

Le séquençage de gènes ciblés est effectué en présence ou en l'absence de caractéristiques particulières comme la micro ou la macrocéphalie, l'autisme, la dysmorphie faciale ou les convulsions. Toutefois, l'hétérogénéité génétique associée aux maladies rend rapidement cette approche lourde et coûteuse.

Le séquençage de *SYNGAP1* est actuellement offert par le demandeur et il est également disponible à l'extérieur du Québec en séquençage de gène isolé ou sous la forme de panel de gènes parmi lesquels figurent *SYNGAP1*.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Cette analyse s'ajoute au répertoire des gènes candidats qui pourront être analysés pour déterminer l'étiologie de la DINS chez les individus atteints.

Le demandeur rapporte une prévalence de mutations d'environ 3 % dans ce gène au sein de la population atteinte de DINS.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été évalué.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Cette analyse ne remplace aucun test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

De façon générale, la gestion de la DI nécessite un diagnostic et une intervention précoces couplés à un accès aux soins de santé nécessaires pour traiter ou assurer un suivi préventif ou de contrôle pour les comorbidités physiques et mentales associées [Einfeld *et al.*, 2011; Van Schrojenstein Lantman-de Valk et Walsh, 2008; Kwok et Cheung, 2007].

L'identification de l'étiologie de la DI permet de mettre fin à l'errance diagnostique dans son ensemble. Elle permet aussi d'offrir une explication et un conseil génétique appropriés pour l'individu affecté et sa famille [Willemsen et Kleefstra, 2014; Flore et Milunsky, 2012; De Ligt *et al.*, 2012; Romano, 2010; Stevenson et Carey, 2009; Moeschler et Shevell, 2006].

5.1.3 Valeur thérapeutique

L'association de mutations dans le gène de *SYNGAP1* avec la DINS est relativement récente et restreinte. Aucune thérapie ou aucun suivi particulier n'est offert aux individus atteints.

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité		X	
Spécificité		X	
Valeur prédictive positive (VPP)		X	
Valeur prédictive négative (VPN)		X	
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

Hamdan et ses collaborateurs [2009] ont initialement suggéré que des mutations dans le gène *SYNGAP1* seraient à l'origine de la DINS de modérée à sévère. Depuis, quelques études ont considéré un rôle de ce gène dans le cadre de certains troubles neurologiques comportant une composante de DI tels que l'épilepsie et l'autisme. Le tableau 1 présente toutes les études repérées qui rapportent des patients chez lesquels une mutation potentiellement causale dans *SYNGAP1* avait été détectée. Ces études, dans leur ensemble, ont relevé jusqu'à présent 21 variants *de novo* chez 21 patients différents (annexe A). La majorité de ces variants résultent en la production de protéines tronquées (19/21 variants). Un mécanisme d'haploinsuffisance a été mis en avant pour expliquer la pathogénèse [Berryer *et al.*, 2013].

Tableau 1 Études d'association génotype-phénotype entre SYNGAP1 et la DINS

ÉTUDE	APPROCHE TECHNIQUE	NOMBRE D'INDIVIDUS	CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA COHORTE	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATION	%	PHÉNOTYPE (NOMBRE)	TYPE DE MUTATION	MUTATIONS DÉCRITES
Hamdan <i>et al.</i> , 2009	Sanger	94	DINS sporadique Sans étiologie Sans dysmorphies	3	3	- DI modérée - Défaut du langage - Épilepsie (2/3) - Microcéphalie (1/3)	Non-sens - Tronquante	p.K138X (c.412A>T) R579X (c.1735C>T) p.L813RfsX23 (c.2438delT)
		142	Autisme	0				
		143	Schizophrénie	0				
		190	Contrôles normaux	0				Aucune mutation tronquante
Vissers <i>et al.</i> , 2010	Exome	10	DI sans étiologie Sans antécédents familiaux	1	10	- DI légère à modérée - Épilepsie	Tronquante	p.V348AfsX70 (c.1043_1044del)
Hamdan <i>et al.</i> , 2011	Sanger	30	DINS	2	7	- DI modérée à sévère - Défaut du langage - Épilepsie (2/3) - Troubles du comportement - Troubles de l'attention (2/3) - Microcéphalie (2/3)	Tronquante	p.Q893RfsX184 (c.2677delC) p.K108VfsX25 (c.321_324del)
		30	DI + Autisme	1	3		Mutation d'un site d'épissage	c.2294+1G > A
		380	Témoins normaux					Aucune mutation tronquante
Berryer <i>et al.</i> , 2013	Sanger et/ou Exome	32	Épilepsie (22) Autisme (3) Autisme + Épilepsie (1) DINS (6)	5 ^{1,2}	16	- DI - Dépression saisonnière (1/5) - Irritabilité, agressivité (2/5) - Troubles du sommeil	- Tronquante Faux-sens	p.H95PfsX5 (c.283dupC) p.S738X (c.2212_2213del) p.N729TfsX31 (c.2184delC) p.W362R (c.1084T>C) p.P562L (c.1685C>T)

ÉTUDE	APPROCHE TECHNIQUE	NOMBRE D'INDIVIDUS	CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA COHORTE	NOMBRE D'INDIVIDUS AVEC MUTATION	%	PHÉNOTYPE (NOMBRE)	TYPE DE MUTATION	MUTATIONS DÉCRITES
						(2/5) - Épilepsie (4/5) - Autisme (1/5) - Microcéphalie (2/5)		
		99	Contrôles normaux danois	0				
		570	Contrôles normaux	0				
Rauch <i>et al.</i> , 2012	Exome	45	DI sévère Sans malformations Sans étiologie	2 ⁴	2	ns	- Tronquante	Thr878AspfsX60 Lys418ArgfsX54
		60	Contrôles normaux (20 enfants + leurs parents)					Absence des variants observés chez les individus atteints
		1600	Exomes témoins					
De Ligt <i>et al.</i> , 2012; Willemsen et Kleefstra, 2014	Exome	253	DI Sporadiques Sans étiologie	1		- DI modérée à sévère - Épilepsie - Troubles du sommeil - Privés de l'usage de la parole	Mutation d'un site d'épissage	c.510-1G > A
Carvill <i>et al.</i> , 2013	Panel de 65 gènes par NGS	500	Encéphalopathies épileptiques	5 ³	1.0	- DI modérée à sévère - Épilepsie - Autisme (4/5)		pThr267X p.Arg143X p.Lys108ValfsX25 p.Gln702X c.389-2A > T
Yang <i>et al.</i> , 2013	Exome	200	Trouble neurologique	1	0.5	- DI - Autisme	Non-sens	ns

Abréviations : DI : déficience intellectuelle; DINS : déficience intellectuelle non syndromique; Ns : non spécifié; NGS : séquençage de nouvelle génération.

1. 4 des 5 cas venaient du CHU Sainte-Justine.

2. Une mutation avait été transmise par un « parent mosaïque ».

3. 2 mutations ont été jugées causales (pThr267X et p.Arg143X) alors que 3 ont été jugées probablement causales (p.Lys108ValfsX25, p.Gln702X et c.389-2A > T).

4. Les variants n'ont pas été retrouvés dans les données du projet 1000 Genomes (179 génomes).

Quelques études additionnelles rapportent des délétions importantes et des translocations impliquant la région chromosomique dans laquelle se trouve *SYNGAP1*. De façon générale, les patients affectés présentaient une DI associée à une forme d'épilepsie ou d'autisme et certaines anomalies congénitales. Il est toutefois difficile d'établir une corrélation phénotype-génotype, puisque la région immédiate de *SYNGAP1* contient d'autres gènes ayant un rôle présumé dans le système nerveux central [Writzl et Knecht, 2013; Klitten *et al.*, 2011; Zollino *et al.*, 2011; Krepischi *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2010].

Entre 30 et 70 % des individus souffrant d'une DI présentent d'autres désordres neurodéveloppementaux [Szymanski et King, 1999]. La DI, l'épilepsie et l'autisme sont des diagnostics différents qui coexistent fréquemment et dont certaines caractéristiques phénotypiques se recoupent. La DI est présente dans 67 % des cas d'autisme, et 28 % de la population atteinte de DI satisfait aux critères pour un diagnostic d'autisme (échelle ADI-R). De même, environ 25 % des cas d'épilepsie présentent une DI.

Il a été proposé que les maladies à traits génétiques complexes comme la DINS, l'autisme et la schizophrénie présenteraient des mutations communes dans certains gènes ou posséderaient des voies communes affectées, partageant ainsi une certaine étiologie [Fromer *et al.*, 2014; McCarthy *et al.*, 2014]. Il est donc parfois difficile de départager la contribution génétique aux différentes conditions.

Les patients qui ont fait partie des diverses études rapportées dans le tableau 1 présentaient généralement un phénotype complexe associant à la déficience intellectuelle l'épilepsie, l'autisme, la microcéphalie et l'ataxie. Un seul cas présentant uniquement une DI a été observé (tableau 2). De plus, les DI observées étaient de légères à graves selon l'individu. L'absence de cas familiaux, le faible nombre de cas dans la littérature de même que la présence d'une proportion significative de comorbidités rendent difficile la corrélation génotype-phénotype.

Tableau 2 Résumé de désordres neurodéveloppementaux coexistant chez les patients porteurs de mutations dans *SYNGAP1*

DIAGNOSTICS	PATIENTS AVEC MUTATIONS JUGÉES PATHOLOGIQUES	COMMENTAIRES
DI	3	Pour deux de ces patients, les comorbidités ne sont pas spécifiées.
DI + épilepsie	10	2 résultats d'évaluation d'autisme non rapportés
DI + autisme	3	
DI + épilepsie + autisme	5	
Nombre total de cas rapportés	21	

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		X	
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique		X	
Spécificité analytique		X	
Effet de matrice		X	
Concordance		X	
Corrélation entre test et comparateur		X	

Le séquençage selon la méthode de Sanger est considéré comme la méthode de référence (*gold standard*) de séquençage pour les applications cliniques [Rehm *et al.*, 2013]. L'analyse effectuée dans le laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine consiste en une amplification de l'ADN génomique du patient par réaction de PCR suivie du séquençage bidirectionnel des 19 exons codants du gène *SYNGAP1* et de leurs sites d'épissage. Le séquençage permettra de mettre en évidence d'éventuelles mutations dans la séquence du gène *SYNGAP1*, qui pourraient être responsables de la DINS.

La sensibilité de détection, évaluée entre 10 et 30 % [Querings *et al.*, 2011; Tsiatis *et al.*, 2010], est suffisante pour le reséquençage et la détection de variants ponctuels homozygotes ou hétérozygotes et la détection de petites délétions et insertions.

L'analyse actuellement offerte par le demandeur a subi une validation selon les recommandations des organisations professionnelles internationales (CCMG, ABMG, CMGS¹¹⁵).

La reproductibilité des résultats a été évaluée par des échanges de 11 échantillons, dont un trio et un muté, avec le laboratoire du Dr Michaud au centre de recherche du CHU Sainte-Justine. La signification et le rôle des variants associés à l'étiologie de la maladie sont évalués selon les recommandations de l'ACMG¹¹⁶. Cette étape de l'analyse fait l'objet d'un contrôle de qualité externe général biannuel offert par le CAP¹¹⁷ et auquel les demandeurs participent.

Un programme d'échange d'échantillons est également en voie d'être établi entre le laboratoire du Dr Michaud et le laboratoire clinique.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation sur l'exploration diagnostique du gène *SYNGAP1* n'a été repérée.

115. CCMG : Collège canadien de généticiens médicaux; ABMG : American Board of Medical Genetics; CMGS : Clinical Molecular Genetics Society.

116. ACMG : American College of Medical Genetics.

117. CAP : College of American Pathologists.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : n'a pas été analysé.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois

Cette analyse ne remplace aucune analyse. Elle représente donc un coût additionnel pour le système de santé concernant les analyses biomédicales.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

L'établissement de l'étiologie génétique de la DINS permet de mettre fin à une exploration diagnostique prolongée comportant de multiples examens. Les résultats obtenus à l'aide de cette analyse pourraient également jouer un rôle dans certaines décisions relatives à la reproduction.

7.2 Validité clinique

L'association entre le gène *SYNGAP1* et la DINS fait l'objet d'une littérature restreinte. Une vingtaine de cas ont été rapportés au total jusqu'à présent dans des études de cohortes de patients atteints de DI, d'autisme et d'épilepsie.

La corrélation génotype-phénotype est complexifiée par la présence de comorbidités et de caractéristiques communes entre la DI, l'autisme et l'épilepsie. L'étude de patients supplémentaires sera nécessaire pour raffiner la corrélation.

7.3 Validité analytique

Le séquençage de type Sanger constitue actuellement la méthode de référence pour les applications cliniques.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation sur le séquençage du gène *SYNGAP1* dans un contexte de DINS n'a été repérée.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Séquençage du gène *SYNGAP1* dans la déficience intellectuelle non syndromique

Statut de la technologie diagnostique

- Établie
- Innovatrice
- Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation lorsque des données plus complètes sur l'utilité et la validité cliniques seront disponibles

Recommandation additionnelle

- Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- Décision de production d'un guide d'usage optimal
- Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

NOTE

Il s'agit d'une découverte très récente qui explique la rareté des données cliniques.

L'intérêt clinique est clair, mais les preuves de l'association entre le gène et la déficience intellectuelle non syndromique sont encore insuffisantes.

On peut se demander pour quelle raison il est important d'offrir la recherche de mutations dans ce gène comme test unique comparativement à son inclusion dans un panel de gènes, par exemple.

Un algorithme décisionnel basé sur les preuves scientifiques permettrait de mieux appuyer l'utilité clinique.

RÉFÉRENCES

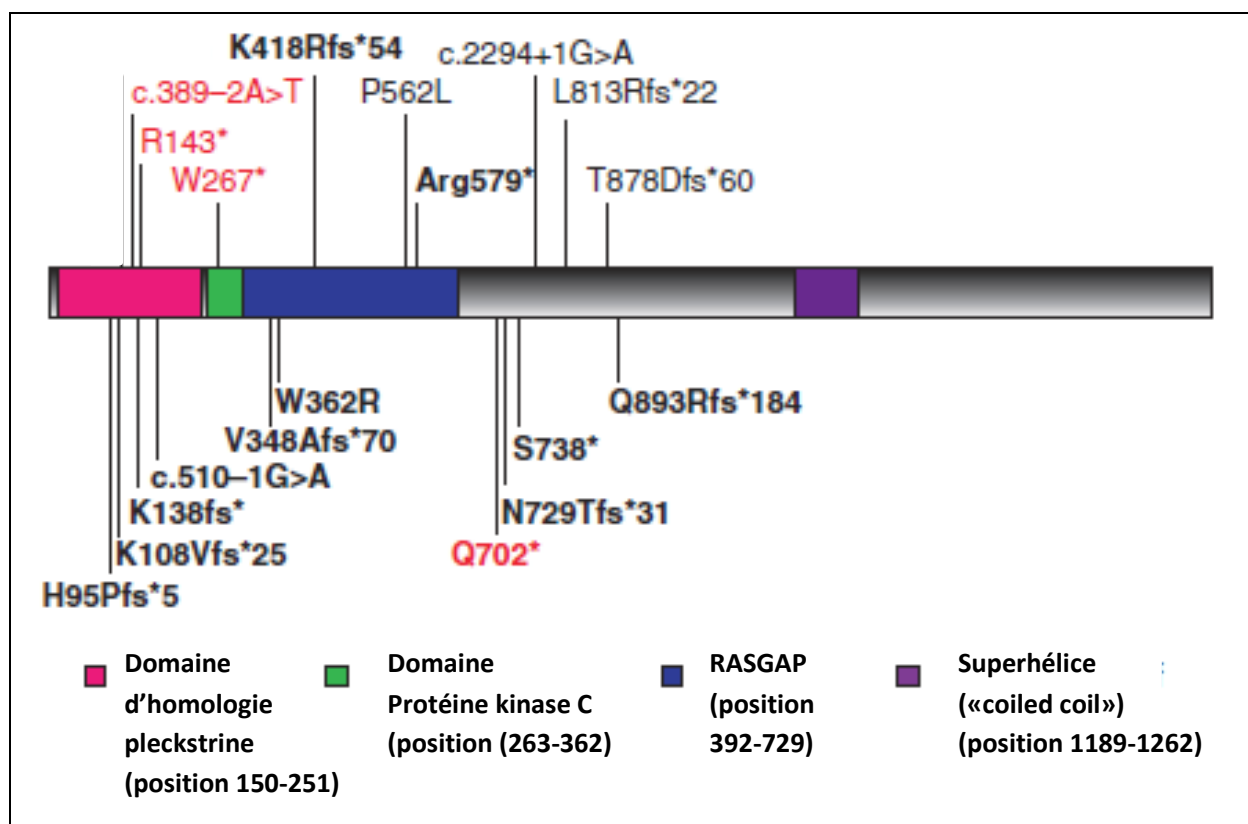
- Battaglia A, Bianchini E, Carey JC. Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet* 1999;82(1):60-6.
- Berryer MH, Hamdan FF, Klitten LL, Moller RS, Carmant L, Schwartzentruber J, et al. Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism, and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency. *Hum Mutat* 2013;34(2):385-94.
- Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, Cook J, et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet* 2013;45(7):825-30.
- Chiurazzi P et Oostra BA. Genetics of mental retardation. *Curr Opin Pediatr* 2000;12(6):529-35.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011;43(9):838-46.
- De Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012;367(20):1921-9.
- Einfeld SL, Ellis LA, Emerson E. Comorbidity of intellectual disability and mental disorder in children and adolescents: A systematic review. *J Intellect Dev Disabil* 2011;36(2):137-43.
- Flore LA et Milunsky JM. Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. *Semin Pediatr Neurol* 2012;19(4):173-80.
- Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, Gormley P, et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 2014;506(7487):179-84.
- Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014;511(7509):344-7.
- Hamdan FF, Daoud H, Piton A, Gauthier J, Dobrzyńska S, Krebs MO, et al. De novo SYNGAP1 mutations in nonsyndromic intellectual disability and autism. *Biol Psychiatry* 2011;69(9):898-901.
- Hamdan FF, Gauthier J, Spiegelman D, Noreau A, Yang Y, Pellerin S, et al. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N Engl J Med* 2009;360(6):599-605.
- Héron D et Jacquette A. Comment explorer une déficience intellectuelle chez l'adulte ? *Neurologie* 2009;1(8):219-22.
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* 2009;52(4):161-9.

- Klitten LL, Moller RS, Nikanorova M, Silaharoglu A, Hjalgrim H, Tommerup N. A balanced translocation disrupts SYNGAP1 in a patient with intellectual disability, speech impairment, and epilepsy with myoclonic absences (EMA). *Epilepsia* 2011;52(12):e190-3.
- Krepischi AC, Rosenberg C, Costa SS, Crolla JA, Huang S, Vianna-Morgante AM. A novel de novo microdeletion spanning the SYNGAP1 gene on the short arm of chromosome 6 associated with mental retardation. *Am J Med Genet A* 2010;152A(9):2376-8.
- Kwok H et Cheung PW. Co-morbidity of psychiatric disorder and medical illness in people with intellectual disabilities. *Curr Opin Psychiatry* 2007;20(5):443-9.
- Leonard H et Wen X. The epidemiology of mental retardation: Challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8(3):117-34.
- Manning M et Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010;12(11):742-5.
- McCarthy SE, Gillis J, Kramer M, Lihm J, Yoon S, Berstein Y, et al. De novo mutations in schizophrenia implicate chromatin remodeling and support a genetic overlap with autism and intellectual disability. *Mol Psychiatry* 2014;19(6):652-8.
- Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med* 2012;366(8):733-43.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010;86(5):749-64.
- Moeschler JB et Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006;117(6):2304-16.
- O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 2012;485(7397):246-50.
- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 2010;466(7304):368-72.
- Querings S, Altmuller J, Ansen S, Zander T, Seidel D, Gabler F, et al. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One* 2011;6(5):e19601.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: An exome sequencing study. *Lancet* 2012;380(9854):1674-82.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006;140(19):2063-74.
- Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 2013;15(9):733-47.

- Romano C. The clinical evaluation of patients with mental retardation/intellectual disability. Dans : Knight SJ, réd. Genetics of mental retardation. Monographs in Human Genetics, Vol. 18. Bâle, Suisse : Karger; 2010 : 57-66.
- Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de V, II, van Bon BW, de Ligt J, et al. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet* 2013;50(12):802-11.
- Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2003;60(3):367-80.
- Stevenson DA et Carey JC. Health-related quality of life measures in genetic disorders: An outcome variable for consideration in clinical trials. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2009;151C(3):255-60.
- Szymanski L et King BH. Summary of the Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescents, and adults with mental retardation and comorbid mental disorders. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999;38(12):1606-10.
- Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet* 2011;80(2):117-26.
- Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: Diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010;12(4):425-32.
- Van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet* 2011;45:81-104.
- Van Schrojenstein Lantman-de Valk HM et Walsh PN. Managing health problems in people with intellectual disabilities. *BMJ* 2008;337:a2507.
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 2010;42(12):1109-12.
- Willemsen MH et Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet* 2014;85(2):101-10.
- Writzl K et Knekt AC. 6p21.3 microdeletion involving the SYNGAP1 gene in a patient with intellectual disability, seizures, and severe speech impairment. *Am J Med Genet A* 2013;161A(7):1682-5.
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013;369(16):1502-11.
- Zollino M, Gurrieri F, Orteschi D, Marangi G, Leuzzi V, Neri G. Integrated analysis of clinical signs and literature data for the diagnosis and therapy of a previously undescribed 6p21.3 deletion syndrome. *Eur J Hum Genet* 2011;19(2):239-42.

ANNEXE A

Les variants présumés pathogéniques dans SYNGAP1



Adapté de Carvill *et al.*, 2013.

Description de l'ensemble des variants présumés pathogéniques à ce jour. Leur position par rapport aux domaines fonctionnels de la protéine est illustrée.