

Avis

Évaluation de 12 analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois* *et système de mesure des procédures* *de biologie médicale*

Transmission au ministre : 30 juin 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, M.D.

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

Faïza Boughrassa, M.D., M. Sc.

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

Phuong Hua, M. Sc.

Éric Potvin, Ph. D.

Éva Tsakonas, M. Sc.

Recherche d'information scientifique

Caroline Dion, MBSI, *bibl. prof.*

Mathieu Plamondon

Soutien documentaire

Micheline Paquin, *tech. doc.*

Édition

Responsable

Diane Guilbault

Coordination

Patricia Labelle

Révision linguistique

Catherine Lavoie

Mise en page

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 978-2-550-71342-5 (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 12 analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Québec, Qc : INESSS; 2014. 275. p.

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

Responsabilité

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

Déclaration d'intérêts

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

COMITÉ SCIENTIFIQUE – ANALYSES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Président

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, Ph. D.

- 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.

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

Membre citoyen

Suzanne K. Bédard

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

TABLE DES MATIÈRES

TABEAU SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS.....	i
PANEL DE GÈNES - CARDIOMYOPATHIES ET ARYTHMIES FAMILIALES (RÉFÉRENCE 2013.03.002).....	1
QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN – RECHERCHE DE MUTATIONS (RÉFÉRENCE 2013.03.011).....	55
PANEL DE MUTATIONS DES GÈNES <i>BRCA 1/BRCA 2</i> – POPULATION DE L’EUROPE DE L’EST (RÉFÉRENCE 2014.01.001).....	78
ANALYSE MUTATIONNELLE DE L’EXON 9 DU GÈNE <i>CALR</i> (RÉFÉRENCE 2014.01.002).....	93
DÉTECTION DES SOUS-UNITÉS A ET B DU FACTEUR XIII ET DÉTECTION D’UN ANTI-FACTEUR XIII, PAR la MÉTHODE ELISA (RÉFÉRENCE 2014.01.003).....	110
SÉQUENÇAGE DU FACTEUR VII (RÉFÉRENCE 2014.01.003B).....	125
PANEL DE GÈNES – SYNDROME DE NOONAN (RÉFÉRENCE – 2014.01.004).....	136
MESURE QUANTITATIVE DE L’ÉTHYLGLUCURONIDE (ET DE L’ÉTHYLSULFATE) PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE 2014.01.005).....	168
DOSAGE DE LA FLUCYTOSINE (5-FLUOROCYTOSINE) PAR HPLC-DAD (RÉFÉRENCE 2014.01.006).....	188
ÉOSINE-5’-MALÉIMIDE (EMA) – DÉTECTION DE LA SPHÉROCYTOSE HÉRÉDITAIRE (RÉFÉRENCE 2014.01.007).....	214
ANALYSE MUTATIONNELLE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR DE LA THYRÉOSTIMULINE (<i>TSHR</i>) PAR SÉQUENÇAGE ET MLPA (RÉFÉRENCE 2014.01.008).....	227
SÉQUENÇAGE DE L’EXOME dans L’EXPLORATION DE LA DÉFICIENCE INTELLECTUELLE ET DES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES (RÉFÉRENCE 2014.01.009).....	243

TABLEAU SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2013.03.002	Panel de 22 gènes par séquençage de nouvelle génération (NGS) - Cardiomyopathies hypertrophiques	Innovatrice	Introduction après vérification de la conformité du laboratoire aux principes directeurs du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) sur l'« Organisation des services publics de diagnostic moléculaire au Québec »	
	Panel de 67 gènes par NGS – Cardiomyopathies et arythmies familiales	Innovatrice	Réévaluation après : ▪ la démonstration clinique de l'effet sur la santé des patients; ▪ une démonstration plus solide de la validation des aspects techniques et bio-informatiques; ▪ la démonstration de la conformité du laboratoire aux principes directeurs du MSSS sur l'« Organisation des services publics de diagnostic moléculaire au Québec ».	Le Comité s'interroge sur la raison pour laquelle le panel inclut les gènes associés aux cardiomyopathies et aux arythmies, deux conditions cardiaques qui ne coexistent pas nécessairement.
2013.03.011	Quatre maladies du Saguenay–Lac-Saint-Jean – recherche de mutations	Établie , mais pas validée pour les mutations à l'étude	Réévaluation lorsque la validation avec la nouvelle technologie TaqMan sera complétée	▪ Il est nécessaire d'encadrer la pratique et de garantir que le contrôle de la qualité, dont la validation externe, se poursuive. ▪ Le fait de tester cinq mutations simultanément pourrait générer des analyses non pertinentes dans les populations dépistées; il faut s'assurer que la prescription de la recherche de ces mutations puisse se faire séparément.

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.01.001	Panel de gènes <i>BRCA 1/BCRA 2</i> – population de l’Europe de l’Est	Établie	Introduction conditionnelle à la mise en place d’un mécanisme de contrôle de la qualité externe	
2014.01.002	Analyse mutationnelle de l’exon 9 du gène <i>CALR</i>	Établie	Introduction conditionnelle à la complétion de la validation de la méthode	
2014.01.003	Détection de la sous-unité A et B du facteur XIII et détection d'un anti-facteur XIII non neutralisant, par la méthode ELISA	Innovatrice	Introduction conditionnelle à la mise en place d’un mécanisme de contrôle de la qualité externe pour la détection de l’anti-facteur XIII dans un contexte de volume insuffisant	▪ Le mécanisme de contrôle de la qualité externe est essentiel, étant donné le faible volume attendu. ▪ La trousse d’analyse n’est pas homologuée au Canada. ▪ L’expertise du laboratoire du demandeur justifie que l’analyse soit faite au Québec.
2014.01.003B	Séquençage du facteur VII	Établie mais non validée pour cette analyse	Introduction après validation par le laboratoire	En raison de la rareté de l’analyse qui rend le contrôle de la qualité difficile, le séquençage du facteur VII pourrait être fait à l’extérieur de la province. Toutefois, l’expertise du laboratoire du demandeur justifie qu’il soit réalisé au Québec.
2014.01.004	Panel de gènes – Syndrome de Noonan	Innovatrice	Réévaluation lorsque des données de validation locale seront disponibles	▪ Il s’agit d’une analyse pertinente. ▪ Il y a un intérêt et un besoin de la faire au Québec au lieu de l’envoyer à l’extérieur.

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.01.005	Mesure quantitative de l'éthylglucuronide (et de l'éthylsulfate) par LC-MS/MS	Établie	Introduction exclusivement pour les patients en attente d'une transplantation hépatique	▪ Possibilité d'une explosion de la prescription si cette analyse est utilisée en clinique de toxicologie. L'indication doit être restreinte aux patients en attente d'une transplantation hépatique. ▪ Un consentement éclairé est nécessaire afin que les patients soient bien informés des conséquences d'un résultat positif. ▪ Il faut absolument établir un mécanisme de confirmation des cas positifs avec un autre laboratoire.
2014.01.006	Dosage de la flucytosine (5-fluorocytosine) par HPLC-DA	Établie	Introduction conditionnelle à la production des données cliniques (suivi des résultats de l'analyse et lien avec les résultats cliniques)	
2014.01.007	Éosine-5'-maléimide (EMA) – détection de la sphérocytose héréditaire	Établie	Introduction conditionnelle à la mise en place d'un mécanisme de contrôle de la qualité externe, qui comprend éventuellement des échanges entre les laboratoires au Québec	
2014.01.008	Analyse mutationnelle du gène du récepteur de la thyroestimuline (<i>TSHR</i>) par séquençage et MLPA	Expérimentale (pour cette application)	Réévaluation lorsque des données supplémentaires de validité clinique et technique seront disponibles	

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES - RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.01.009	Séquençage de l'exome dans l'exploration de la déficience intellectuelle et des maladies neurodégénératives	Expérimentale	Réévaluation lorsque : ▪ la validation sera terminée, surtout en ce qui concerne la structure informatique; ▪ le mécanisme de contrôle de la qualité externe sera actualisé; ▪ la conformité du laboratoire aux principes directeurs du MSSS sur l'« Organisation des services publics de diagnostic moléculaire au Québec » sera assurée.	Il s'agit d'une analyse qui a beaucoup de potentiel sur le plan clinique, mais demeure encore expérimentale.

PANEL DE GÈNES - CARDIOMYOPATHIES ET ARYTHMIES FAMILIALES (RÉFÉRENCE 2013.03.002)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeurs

- CHU Sainte-Justine (panel de 67 gènes associés aux cardiomyopathies et arythmies)
- CHUS-Hôpital Fleurimont (panel de 22 gènes associés aux cardiomyopathies hypertrophiques)

1.2 Dates de transmission des demandes d'examen au MSSS

- CHU Sainte-Justine : 30 septembre 2013
- CHUS-Hôpital Fleurimont : 30 août 2012

1.3 Date de réception des demandes à l'INESSS : 1^{er} novembre 2013

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juin 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 LICENCES

2.1 Nom de la technologie

Séquençage à ultra-haut débit ou de nouvelle génération (NGS)¹.

2.2 Description brève des technologies et précisions techniques et cliniques

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet d'obtenir rapidement et à coûts moindres la séquence de plusieurs gènes simultanément, d'exomes ou de génomes entiers. Plusieurs plateformes qui utilisent des technologies et des chimies différentes existent actuellement sur le marché. Mais quelle que soit la technique, le NGS est effectué en trois étapes : la préparation de l'échantillon (et production de la banque de gènes²), le séquençage et l'analyse des résultats.

Lors de la préparation des échantillons, l'ADN génomique est fragmenté et une banque de gènes fixée sur un support solide est générée. Les demandeurs utilisent une approche (panel de gènes) qui nécessitent un enrichissement des régions d'intérêt avant de procéder au séquençage.

¹ Le terme « séquençage de nouvelle génération » (*next generation sequencing*) fait référence aux différentes plateformes de séquençage récemment élaborées qui partagent toutes un rendement de lecture très élevé comparativement aux méthodes de séquençage traditionnelles (Sanger).

² Dans le présent document le terme « banque de gènes » a été utilisé pour traduire le terme anglais « *gene library* ».

Le séquençage est effectué selon un principe de base similaire à l'approche de Sanger : les nucléotides des fragments d'ADN sont repérés au cours de la synthèse d'un brin complémentaire à la matrice. Le nucléotide ajouté à chaque cycle est décelé par sa fluorescence (type et intensité). Toutefois, contrairement au séquençage classique, le NGS effectue et déchiffre des millions de réactions simultanément.

Finalement, les séquences obtenues peuvent être assemblées et alignées avec une séquence de référence. Les variations sont ensuite confirmées par séquençage selon la méthode de Sanger, tel que le recommande l'*American College of Medical Genetics and Genomics*, et annotées.

CHU Sainte-Justine

Les 67 gènes inclus dans le panel sont ceux pour lesquels l'association avec les cardiomyopathies ou les arythmies familiales est reconnue [Loporcaro *et al.*, 2014; Teekakirikul *et al.*, 2013; Wilde et Behr, 2013; Herman *et al.*, 2012; Kloos *et al.*, 2012; Fowler *et al.*, 2010]. Les exons et points de jonction de : *ABCC9*, *ACTC1*, *ACTN2*, *AKAP9*, *ANK2*, *ANKRD1*, *CACNA1C*, *CACNB2*, *CASQ2*, *CAV3*, *CRYAB*, *CSRP3*, *CTF1*, *DES*, *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *DTNA*, *EMD*, *FHL2*, *GLA*, *GPD1L*, *JUP*, *KCNAB3*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNE3*, *KCNH2*, *KCNIP2*, *KCNJ2*, *KCNQ1*, *LAMA4*, *LAMP2*, *LDB3*, *LMNA*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *MYLK2*, *MYOZ2*, *NEXN*, *PKP2*, *PLN*, *PRKAG2*, *RBM20*, *RYR2*, *SCN1B*, *SCN3B*, *SCN4B*, *SCN5A*, *SGCD*, *SNTA1*, *TAZ*, *TCAP*, *TGFB3*, *TMEM43*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TTN*, *TTR*, *VCL* seront investigués. La préparation des échantillons et des banques de gènes sera effectuée à l'aide de la trousse HaloPlex Target Enrichment d'Agilent (<http://www.genomics.agilent.com/>). Cette technologie s'appuie sur le principe de sondes d'inversion moléculaire ou de circularisation sélective. Les oligonucléotides ont été synthétisés selon les spécifications du demandeur (*custom*) et le séquençage est réalisé sur l'appareil HiSeq 2500 (Illumina).

CHUS-Hôpital Fleurimont

La procédure repose sur la capture ciblée des exons et des points de jonctions de 22 gènes³ associés aux cardiomyopathies hypertrophiques : *ACTC1*, *ACTN2*, *CSRP3*, *GAA*, *GLA*, *GBE1*, *JPH2*, *LAMP2*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *MYOZ2*, *NEXN*, *PLN*, *PRKAG2*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TTR*, *VCL*, suivie d'un séquençage à haut débit sur un appareil MiSeq. La technologie SeqCap Ez de Niblegen sert à réaliser l'enrichissement. Niblegen possède une banque d'oligonucléotides pour faire la capture de l'exome et, avec leur collaboration, les demandeurs ont sélectionné les oligonucléotides nécessaires à la capture des gènes d'intérêt à partir de cette banque. La confirmation des mutations trouvées par NGS se fait par séquençage traditionnel au moyen de la trousse commerciale ABI, sur un séquenceur capillaire Genetic Analyzer 3500. Le demandeur mentionne que le choix des gènes repose sur une revue de la littérature⁴. La qualité minimale acceptée lors du séquençage sera de Q30. Il est à noter que les exons 2 et 4 de *JPH2* et l'exon 5 de *PRKAG2* seront séquencés à l'aide de la méthode de Sanger en raison d'une plus faible couverture de séquence.

³ Depuis la soumission de la demande, 2 gènes ont été rajoutés – soit *JPH2* et *VCL* – portant le total à 22 et non plus 20 (communications électroniques personnelles avec M. Serge Gravel, Ph.D., du Service de génétique médicale du CHUS, 6 décembre 2013 et 10 janvier 2014).

⁴ Les gènes catégorisés 1 et 2 par le demandeur selon 3 niveaux de preuve ont été retenus. Niveau 1 : plusieurs études indépendantes montrant une association entre le gène (variations détaillées) et la CMH ET ségrégation familiale de plusieurs variations avec la CMH établie. Niveau 2 : une étude ou quelques études indépendantes montrant une association entre le gène (variations détaillées) et la CMH ET ségrégation familiale d'au moins deux variations établie. Niveau 3 : une étude ou quelques études indépendantes montrant une association entre le gène (variations détaillées) et la CMH, mais SANS données de ségrégation familiale.

De plus, puisque l'exon 27 de *MYH7* est quasi identique à l'exon 26 de *MYH6*, les logiciels d'alignement sont incapables d'assigner avec précision la position génomique des bases séquencées par NGS pour cet exon. De ce fait, l'exon 27 de *MYH7* est également systématiquement séquencé au moyen de la technique de Sanger bidirectionnelle⁵.

2.3 Société ou développeur : Illumina (séquenceur)

2.4 Licences : sans objet

2.5 Brevet : sans objet

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

La FDA a approuvé la plateforme de séquençage MiSeqDx (Illumina) aux fins du diagnostic clinique.

2.7 Valeur pondérée

- CHU Sainte-Justine : 619,58
- CHUS-Hôpital Fleurimont : 820,33 (coût de séquençage par la méthode de Sanger y compris)

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

3.1 Patients ciblés

- Patients aux prises avec une cardiomyopathie hypertrophique (CHUS)
- Patients présentant un phénotype dans une des deux grandes classes de maladies cardiovasculaires : cardiomyopathies ou arythmies (CHU SJ)
- Patients nécessitant une confirmation ou une précision diagnostique
- Patients qui ont des antécédents familiaux de cardiomyopathie ou d'arythmie
- Patientes nécessitant un dépistage prénatal ou préimplantatoire

3.2 Description des maladies visées

Dans les pays occidentaux, la mort cardiaque subite (MCS) représente environ 50 % des décès cardiovasculaires, soit environ 300 000 décès par année aux États-Unis [George, 2013; Lombardi, 2013]. Chez les personnes jeunes, la MCS est fortement reliée aux maladies cardiaques héréditaires qui regroupent deux grandes classes : les cardiomyopathies et les canalopathies [Watkins *et al.*, 2011; Wilde et Bezzina, 2005]. Les cardiomyopathies forment un groupe hétérogène de maladies caractérisées par une anomalie de la structure ou de la fonction du myocarde, et ce, en l'absence de coronaropathies, d'hypertension et de valvulopathies.

Les cardiomyopathies sont généralement subdivisées en quatre groupes :

- Cardiomyopathie hypertrophique (CMH)
- Cardiomyopathie dilatée (CMD)
- Cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (CVDA)
- Non-compaction du ventricule gauche (NCVG)

⁵ Communications électroniques et téléphoniques personnelles avec M. Serge Gravel, Ph.D., responsable de l'analyse au niveau technique (27 et 28 novembre 2013)

Les canalopathies héréditaires sont essentiellement des défauts électriques primaires. Elles sont le résultat de mutations génétiques qui touchent les gènes des canaux ioniques ou d'autres protéines régulatrices et chaperonnes. Les canaux ioniques forment des pores transmembranaires et génèrent l'excitabilité du myocarde. L'instabilité électrique prédispose à l'arythmie ventriculaire ou auriculaire et peut conduire à la MCS.

Les canalopathies se scindent en trois grands groupes :

- Syndrome du QT long (SQTL)
- Syndrome de Brugada (SdB)
- Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC)

3.3 Nombre de patients visés

- 1) CHU Sainte-Justine : plus de 1 000 cas par année (les deux grandes classes cardiovasculaires confondues).
- 2) CHUS-Hôpital Fleurimont : 90/an (Québec et Sherbrooke).

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

Conseillers en génétique, cardiologie, pathologie et pédiatrie.

3.5 Modalités d'administration du test

L'analyse s'effectue à partir de l'ADN génomique extrait d'un échantillon de sang. L'extraction d'ADN peut aussi se faire à partir d'un tissu ou d'un frottis buccal. CHU Sainte-Justine : le clinicien qui prescrit le test est responsable d'obtenir le consentement du patient et d'offrir le conseil génétique approprié. L'ADN des échantillons sanguins sera isolé au laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine, alors que le séquençage sera réalisé au centre de génomique clinique pédiatrique intégré du CHU Sainte-Justine, en partenariat avec Génome Québec.

CHUS-Hôpital Fleurimont : l'échantillon envoyé sera accompagné d'un formulaire de consentement préalable au test signé par le patient et le médecin généticien ou une personne conseillère en génétique. Toutes les étapes sont effectuées dans le laboratoire clinique de génétique moléculaire du CHUS, accrédité par Santé Canada.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique, selon les demandeurs

- 1) CHU Sainte-Justine : remplace les 28 analyses suivantes présentes dans le *Répertoire* : 50015, 50016, 50017, 50018, 50019, 50024, 50025, 50026, 50028, 50029, 50056, 50057, 50058, 50059, 50060, 50061, 50062, 50063, 50064, 50065, 50066, 50297, 50298, 50299, 50300, 50302, 50303, 50304.
- 2) CHUS-Hôpital Fleurimont : remplace les cinq analyses suivantes présentes dans le *Répertoire* : 50062, 50063, 50064, 50065, 50066.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le NGS est une option prometteuse au séquençage de Sanger, mais son utilité clinique dans le cas de l'analyse d'un panel de gènes ou d'exomes repose sur la capacité d'enrichir ou d'amplifier les régions d'intérêt avec précision [Wooderchak-Donahue *et al.*, 2012]. L'étape de l'enrichissement doit permettre l'atteinte d'une profondeur de lecture⁶ élevée tout en réduisant le nombre d'erreurs introduites par l'amplification ou d'autres manipulations de l'échantillon, de façon à assurer une spécificité et une sensibilité optimales. Actuellement, il existe plusieurs stratégies d'enrichissement, dont les avantages varient en fonction des caractéristiques intrinsèques des séquences cibles. Brièvement, trois types d'enrichissement existent, soit par technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (dans de petits compartiments comme RainDance, Fluidigm, AmpliSeq), par hybridation et extension (HaloPlex, TruSeq) et par hybridation seulement (SureSelect, SureCap EZ). Des études visant à comparer diverses techniques d'enrichissement ont démontré d'importantes différences, notamment en ce qui concerne la profondeur de lecture générée et le nombre de variants repérés [Hedges *et al.*, 2011; Kiialainen *et al.*, 2011; Teer *et al.*, 2010].

La technique de séquençage utilisée par les plateformes d'Illumina consiste à effectuer la synthèse d'un brin complémentaire à chacun des millions de brins de matrices fixées sur un support solide à partir d'amorces et grâce à des nucléotides terminateurs (réversibles) couplés à des fluorochromes propres au type de nucléotide. La réaction de séquençage est constituée d'une série de cycles permettant l'ajout successif de nucléotides dont la présence est détectée à chaque cycle. Les séquences obtenues sont assemblées et comparées à la séquence de référence. Les variations décelées sont ensuite analysées une à une afin de déterminer leur pertinence clinique à la suite ou non d'une étape de filtrage automatisé effectué grâce à des outils bio-informatiques.

À court terme, le séquençage de Sanger continuera à être utilisé en complémentarité avec le NGS, notamment pour les régions difficiles à cibler (guanine-cytosine (GC) riches ou séquences répétitives) et pour confirmer les variations soulignées par NGS [Rehm, 2013; Ware et Jefferies, 2012].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Comparativement au séquençage de Sanger, le NGS en laboratoire clinique permet de cibler plus rapidement un ensemble de régions génomiques associées à une maladie héréditaire connue, en raison d'une plus large couverture de séquences et d'un coût moindre.

Ware et ses collaborateurs [2012] ont dressé une liste des avantages et des défis que comporte l'utilisation du NGS en cardiologie et dans d'autres disciplines.

Avantages

- 1) Haut débit
 - Analyses plus complètes à moindre coût

⁶ La profondeur de lecture est le rapport entre la longueur de tous les fragments de séquences lus mis bout-à-bout et la longueur de la séquence cible. Par exemple, en séquençant 25 millions de bases (Mb) pour un génome de 5 Mb, une profondeur équivalant à 5 fois le génome est obtenue. Plus la profondeur est importante, plus nombreuses seront les lectures chevauchantes qui pourront être assemblées, et plus grande sera la fraction du génome couverte. Cela permet d'obtenir une séquence finale la plus complète possible, avec un minimum de « trous », de régions non séquencées (Furlaud G et Esnault Y. Le séquençage des génomes – compléments [site Web]. Disponible à : http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/genomes/plus/fragm_stats.htm).

- 2) Diagnostic
 - Maladie mendélienne (monogénique) comme la CMH et le SQT
 - Cas sporadiques de maladies génétiques
 - Autopsie moléculaire fine suivant un cas de MCS
 - Prénatal
- 3) Médecine personnalisée
 - Traitement ciblé selon le défaut moléculaire
 - Stratification du traitement selon le génotype
 - Prédiction de réponse au traitement

Défis

- 1) Haut débit
 - Complexité de l'analyse et du stockage de grandes quantités de données informatiques
- 2) Diagnostic
 - Discrimination entre les mutations pathogéniques et les polymorphismes rares non pathogéniques
- 3) Considérations éthiques
 - Protection des données
 - Diagnostic prénatal
 - Découvertes fortuites (anomalie non reliée, non-paternité)
- 4) Formation médicale adaptée aux approches génomiques

4.4 Coût de la technologie et des options

TECHNOLOGIE	NGS (ILLUMINA)	SANGER
Séquences couvertes par analyse	8,5 - 600 Gb	0,006 Gb
Coût du séquençage par analyse	41 \$ - 502 \$/Gb	5 000 \$/Gb
Temps d'analyse	39 heures - 11 jours	1 jour

Tableau adapté de Makrythanasis et Antonarakis, 2012.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

Les tests qui font l'objet des demandes actuelles offrent la possibilité de préciser le diagnostic, de stratifier les risques associés et de moduler l'approche médicale pour tenter de limiter ou d'éliminer les événements aigus. Si une mutation pathogénique est décelée chez le proposant (*proband*), d'autres membres de la famille peuvent se voir offrir un dépistage ciblé de la même mutation. Ceux qui portent la mutation peuvent ensuite faire l'objet d'une surveillance accrue ou d'un traitement approprié, tandis que des tests coûteux et stressants seront épargnés à ceux qui ne portent pas la mutation [Burton *et al.*, 2010]. Le génotype d'un patient n'influencera pas automatiquement sa prise en charge, mais pourrait éventuellement contribuer à la stratification pronostique. Par exemple, certains gènes de cardiomyopathie dilatée sont associés à des anomalies du système de conduction et à un plus grand risque de mort subite [Ackerman *et al.*, 2011].

Les cardiomyopathies et les arythmies héréditaires proviennent majoritairement de défauts monogéniques de transmission classique mendélienne et dont la pénétrance et l'expressivité clinique sont très variables. Plusieurs loci et gènes ont été repérés à la suite d'études génétiques réalisées au sein de familles atteintes [Maron *et al.*, 2012; Charron *et al.*, 2010]. Parmi les gènes décrits dans le présent document, ceux qui sont associés à une forme primaire de cardiomyopathie ou d'arythmie sont regroupés selon le phénotype associé. De même, certains syndromes rares dont l'atteinte touche plusieurs organes sont associés à des manifestations cliniques cardiaques qui miment la cardiomyopathie ou le trouble arythmique primaire : il s'agit des phénocopies.

Cardiomyopathie hypertrophique (CMH)

La cardiomyopathie hypertrophique (CMH) est la maladie cardiaque héréditaire la plus fréquente : elle touche 1 personne sur 500 dans la population générale [Gersh *et al.*, 2011]. Elle est caractérisée par une hypertrophie du ventricule gauche (HVG), une désorganisation des cardiomyocytes et la présence de fibrose. Le diagnostic final repose sur les données obtenues par l'électrocardiogramme (HVG ou ondes Q fines et profondes ou troubles de la repolarisation) et l'échocardiographie (hypertrophie pariétale ≥ 13 mm). Les patients atteints peuvent être asymptomatiques ou éprouver des symptômes qui ne sont pas propres à la maladie comme de la dyspnée, des palpitations, de la tachycardie ou des douleurs thoraciques atypiques [Richard *et al.*, 2010]. Avec le temps, les cas les plus graves évoluent vers l'insuffisance cardiaque congestive ou la syncope [Hickey et Rezzadeh, 2013]. Il s'agirait d'une cause importante de décès par MCS chez les 35 ans et moins et les athlètes de compétition [Maron, 2003]. Toutefois, des études récentes suggèrent que le risque global de MCS chez les personnes atteintes d'une CMH se situe autour de 1 % [Christiaans *et al.*, 2010]. Les divers traitements possibles comprennent la restriction de l'exercice physique violent, la pharmacothérapie (β -bloquants, inhibiteurs calciques, antiarythmiques) et la myotomie du septum interventriculaire basal, chez les cas aux prises avec une obstruction [Richard *et al.*, 2010]. La principale considération relativement au suivi et au traitement des cas de CMH touche l'évaluation du risque de MCS et le besoin d'implanter un défibrillateur cardiovertteur (DCI) [Marian, 2010].

Dans plus de la moitié des cas, une mutation pathogénique est décelée si le patient a des antécédents familiaux, alors que cette proportion diminue à moins de 30 % chez les cas sporadiques [Konno *et al.*, 2010; Frisso *et al.*, 2009]. La CMH est une maladie génétique très hétérogène, car des centaines de mutations dans au moins 27 gènes probablement prédisposant à la cardiomyopathie familiale ont été repérés [Landstrom et Ackerman, 2011]. De plus, les chercheurs sont maintenant d'avis que la variation phénotypique associée à une mutation précise serait expliquée par des variations dans d'autres gènes, ce que l'on appelle des gènes modificateurs [Poliac *et al.*, 2006]. Collectivement, les études génétiques ont démontré que la CMH est majoritairement une maladie du sarcomère, l'unité contractile du muscle. De fait, les mutations des gènes *MYH7* et *MYBPC3*, composantes des myofilaments épais, expliquent 50 % des CMH familiales. Les mutations des gènes *TNNI2* et *TNNI3*, composantes des myofilaments fins, représentent environ 10 % des cas. D'autres gènes associés aux sarcomères, au transport du calcium ou autres ont été décelés, mais sont rarement mis en cause (tableau 1) [Coats et Elliott, 2013; Maron *et al.*, 2012].

Tableau 1 Gènes reliés à la cardiomyopathie hypertrophique

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
				%*	HGMD†
<i>MYH7</i>	160760	Myosine, chaîne lourde β	Christiaans <i>et al.</i> , 2011; Perrot <i>et al.</i> , 2005	30-50	352
<i>MYBPC3</i>	600958	Protéine C liant la myosine	Kaski <i>et al.</i> , 2009	30-40	445
<i>TNNT2</i>	191045	Troponine T	Pasquale <i>et al.</i> , 2012	< 5	59
<i>TNNI3</i>	191044	Troponine I	Kaski <i>et al.</i> , 2009	< 5	47
<i>TPM1</i>	191010	α -tropomyosine		s. o.	19
<i>MYL2</i>	160781	Myosine, chaîne régulatrice	Richard <i>et al.</i> , 2003	< 5	16
<i>MYL3</i>	160790	Myosine, chaîne essentielle	Kaski <i>et al.</i> , 2009	< 5	15
<i>TNNC1</i>	191040	Troponine C		s. o.	7
<i>ACTC1</i>	102540	Actine α -cardiaque	Kaski <i>et al.</i> , 2009	< 5	13
<i>MYH6</i>	160710	Myosine, chaîne lourde α	Carniel <i>et al.</i> , 2005	s. o.	4
<i>ACTN2</i>	102573	α -actinine	Chiu <i>et al.</i> , 2010	s. o.	4
<i>CSRP3</i>	600824	Protéine LIM		s. o.	11
<i>MYOZ2</i>	605602	Myozénine	Ruggiero <i>et al.</i> , 2013	s. o.	2
<i>PLN</i>	172405	Phospholambane	Landstrom <i>et al.</i> , 2011a	s. o.	7
<i>TCAP</i>	604488	Téléthonine	Hayashi <i>et al.</i> , 2004	s. o.	
<i>TTN</i>	188840	Titine	Herman <i>et al.</i> , 2012	1	3
<i>MYLK2</i>	606566	Myosine kinase, chaîne légère	Davis <i>et al.</i> , 2001	s. o.	3
<i>JPH2</i>	605267	Junctophiline	Landstrom <i>et al.</i> , 2011b	s. o.	5
<i>VCL</i>	193065	Vinculine	Vasile <i>et al.</i> , 2006	s. o.	2
<i>NEXN</i>	613121	Nexiline	Wang <i>et al.</i> , 2010	s. o.	2
<i>CAV3</i>	601253	Cavéoline 3		s. o.	1

Abréviations : HGMD : *Human Gene Mutation Database*; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*; s. o.: sans objet ou non évaluée.

* Fréquence dans le phénotype telle que présentée par Wilde et Behr [2013].

† Nombre de mutations rapporté dans la *Human Gene Mutation Database*.

Tableau 2 Phénocopies de cardiomyopathies hypertrophiques

GÈNE (OMIM)	MALADIE : INCIDENCE /PRÉVALENCE	PHÉNOTYPES CARDIAQUES	CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES ET AUTRES PHÉNOTYPES	RÉFÉRENCES
<i>PRKAG2</i> (602743)	GSD cardiaque < 1 % des cas CMH	HVG grave (70 %), WPW (60 %), troubles de la conduction	Âge médian : 20 ans (entre 9 et 55), faiblesse musculaire et myalgie post-effort. Asymptomatique (31 %)	Murphy <i>et al.</i> , 2005
<i>LAMP2</i> (309060)	Danon (GSD 2b) Prévalence : < 1/1 000 000*	HVG grave, ICC, troubles de la conduction	Âge moyen de début des symptômes : hommes : 11,7 ± 6,4; femmes : 26,8 ± 14,2. Myopathie squelettique, atteintes neurologiques, respiratoires et gastro- intestinales	Boucek <i>et al.</i> , 2011
<i>GLA</i> (300644)	Fabry Incidence : 1/50 000†	HVG grave, ICC, FA, troubles de la conduction	Acroparesthésie, angiokératomes	Sachdev <i>et al.</i> , 2002
<i>TTR</i> (176300)	CMP amyloïde familiale < 1/100 000 Prévalence inconnue	CMH, troubles de la conduction/FA. Variable selon l'âge, la mutation et la région	Neuropathie progressive, opacité du vitreux et amylose du SNC. Atteinte neurologique seulement (25 %), atteinte cardiaque seulement (17 %) et atteinte mixte (58 %).	Banypersad <i>et al.</i> , 2012
<i>GAA</i> (606800)	Pompe (GSD 2) 1/100 000	Cardiomégalie (90 %), arythmies (90 %), troubles de préexcitation et de la conduction	Infantile (< 6 mo) : progression rapide et létale, avec myopathie squelettique, hypotonie et détresse respiratoire. Forme tardive : progression plus lente, avec déglutition et mastication.	Haley <i>et al.</i> , 2003
<i>FXN</i> (606829)	Ataxie de Friedreich 1/30 000	CMH (65 %), arythmies (20 %)	Âge moyen de début des symptômes : autour de 15 ans : ataxie (100 %), dysarthrie (> 90 %), absence de réflexes dans les membres inférieurs (74 à 99 %), scoliose (60 à 79 %), pieds creux (<i>pes cavus</i>) (55 à 75 %), trouble de déglutition (27 %) et autres atteintes neurologiques	Delatycki et Corben, 2012

Abréviations : CMH : cardiomyopathie hypertrophique; FA : fibrillation auriculaire; GSD : glycogénose (*glycogen storage disease*); HVG : hypertrophie ventriculaire gauche; ICC : insuffisance cardiaque congestive; mo : mois; SNC : système nerveux central; WPW : syndrome de Wolff-Parkinson-White; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*.

* Froissard R et Maire I. Glycogénose par déficit en LAMP-2 [site Web]. Orphanet; 2007. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=34587.

† Mehta A et Hughes DA. Fabry disease. Dans : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., réd. GeneReviews® [Internet]. Seattle, WA : University of Washington; 2013. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>.

Cardiomyopathie dilatée (CMD)

La CMD se caractérise par un affaiblissement du muscle du ventricule gauche (VG) et une dilatation de la cavité cardiaque. La réduction de la force de contraction du cœur entraîne une diminution de la fraction d'éjection du VG (FEVG). La coronaropathie associée à l'artériosclérose en est la cause principale, mais les CMD visées par le présent avis sont d'origine primaire et idiopathique. Il est reconnu que 20 % à 35 % des cas de CMD ont des antécédents familiaux de la maladie. La prévalence de la CMD primaire est d'environ 1 personne sur 2 500 et représente la troisième cause en importance de transplantation cardiaque [Hershberger et Siegfried, 2011; Maron *et al.*, 2006].

La dilatation du VG peut être présente de façon asymptomatique en raison des mécanismes de compensation. Lorsque ceux-ci sont dépassés, la condition évolue progressivement vers l'insuffisance cardiaque. Plus de 30 gènes ont été repérés pour lesquels la majorité des mutations sont transmises de façon autosomique dominante et quelques cas sont de transmission récessive ou liée au chromosome X. Toutes ces mutations sont rares et souvent reliées à une seule famille. En excluant le criblage du plus grand gène du génome humain, la titine (*TTN*), la CMD est une condition génétique pour laquelle la recherche d'une cause moléculaire offre un rendement $\leq 20\%$ [Van Spaendonck-Zwarts *et al.*, 2013]. En effet, Herman et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence que des mutations tronquantes du gène *TTN* sont retrouvées dans 25 % des cas familiaux et dans 18 % des cas sporadiques [Herman *et al.*, 2012].

Tableau 3 Gènes associés à la cardiomyopathie dilatée

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
<i>TTN</i>	188840	Titine	Typique (95 % chez les > 40 ans). Les effets indésirables (transplantation, LVAD et décès) sont moins fréquents et plus tardifs chez les femmes.	Herman <i>et al.</i> , 2012	18-27	19
<i>LMNA</i>	150330	Lamines A/C	Neuromusculaire (37 %), arythmies/troubles de la conduction (65 %), MCS (26 % $\leq$ 45 ans)	Van Spaendonck-Zwarts <i>et al.</i> , 2013	5-6	109
<i>MYH7</i>	160760	Myosine, chaîne lourde β	Typique (âge du début : $44,8 \pm 16,7$ ans), stimulateur cardiaque ou DCI (43 %), HTx (4 %)	Waldmuller <i>et al.</i> , 2011	4-10	83
<i>TNNT2</i>	191045	Troponine T	Typique (70 % $\geq$ 40 ans), HTx, ICC ou décès (60 %)	Hershberger <i>et al.</i> , 2009	2-3	27
<i>RBM20</i>	613171	Protéine à motif de liaison à l'ARN	Typique (25-50 ans), troubles de la conduction (60 %), mauvais pronostic (ICC, HTx), 13 % des cas de MCS	Li <i>et al.</i> , 2010	s. o.	17

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD‡
<i>TPM1</i>	191010	α -tropomyosine	Typique; pénétrance et gravité variables	Olson <i>et al.</i> , 2001	1-2	14
<i>DSP</i>	125647	Desmoplakine	Peut présenter des caractéristiques d'ARVC/D	Garcia-Pavia <i>et al.</i> , 2011	s. o.	9
<i>SCN5A</i>	600163	Canal Na ⁺ (Na _v 1.5)	AV (87 %), SSS (33 %), FA (60 %), VT (33 %), troubles de la conduction (60 %)	McNair <i>et al.</i> , 2011	2-3	13
<i>ACTC1</i>	102540	Actine α -cardiaque	Typique; pénétrance et gravité variables	Olson <i>et al.</i> , 1998	s. o.	5
<i>MYBPC3</i>	600958	Protéine C liant la myosine	Typique (âge du début : 50,3 $\pm$ 14,6 ans), stimulateur cardiaque ou DCI (36 %), HTx (0 %)	Waldmuller <i>et al.</i> , 2011	4	53
<i>LDB3</i>	605906	Liaison à LIM 3	Apparition précoce. CMD isolée ou avec NCVG. Myopathie myofibrillaire	Vatta <i>et al.</i> , 2003	1	2
<i>TNNI3</i>	191044	Troponine I	Typique; pénétrance et gravité variables	Carballo <i>et al.</i> , 2009	< 1	10
<i>TNNC1</i>	191040	Troponine C	Typique; pénétrance et gravité élevées, HTx, ICC ou décès (70 %)	Mogensen <i>et al.</i> , 2004	1	7
<i>PLN</i>	172405	Phospholambane	Apparition précoce : MCS (39 % < 45 ans) ou tardive, CVDA (13 %), troubles de la conduction (25 %)	Van Spaendonck-Zwarts <i>et al.</i> , 2013	s. o.	5
<i>DES</i>	125660	Desmine	CMD isolée (22 %), troubles de la conduction (60 %), myopathie (70 %), CK anormale (66 %)	Clemen <i>et al.</i> , 2013; Van Spaendonck-Zwarts <i>et al.</i> , 2011	s. o.	9
<i>MYH6</i>	160710	Myosine, chaîne lourde α	CMD typique d'apparition tardive (50 $\pm$ 6 ans), symptômes légers et dysfonction légère à modérée du VG	Carniel <i>et al.</i> , 2005	3†	9
<i>LAMA4</i>	600133	Laminine α 4	CMD typique, peu de cas, FEVG $\leq$ 30 %	Knoll <i>et al.</i> , 2007	s. o.†	2
<i>VCL</i>	193065	Vinculine	CMD typique, pas de troubles du rythme ou de conduction	Olson <i>et al.</i> , 2002	s. o.†	6

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD‡
<i>TCAP</i>	604488	Téléthonine	Généralement associé à la DMLG	Moreira <i>et al.</i> , 2000; Hayashi <i>et al.</i> , 2004	< 1†	4
<i>ACTN2</i>	102573	α-actinine	CMD typique, peu de cas	Mohapatra <i>et al.</i> , 2003	s. o.†	5
<i>CRYAB</i>	123590	Cristalline αB	Cataracte, myopathie myofibrillaire	Inagaki <i>et al.</i> , 2006	s. o.†	2
<i>SGCD</i>	601411	δ-sarcoglycane	Généralement associé à la DMLG. Si non : CMD précoce, risque élevé de MCS avant 30 ans.	Bauer <i>et al.</i> , 2009; Tsubata <i>et al.</i> , 2000	s. o.†	2
<i>CSRP3</i>	600824	Protéine LIM	CMD typique, interaction avec téléthonine	Knoll <i>et al.</i> , 2002	< 1†	4
<i>NEXN</i>	613121	Nexiline	CMD typique, apparition entre 50 et 60 ans, FEVG ≥ 30 %	Hassel <i>et al.</i> , 2009	s. o.†	3
<i>ANKRD1</i>	609599	Protéine à domaines répétés (ankyrine)	≈ 40 ans : CMD isolée (85 %); + troubles de la conduction (11 %); myopathie (3 %); élévation de la CPK (2 %)	Duboscq-Bidot <i>et al.</i> , 2009	2†	7
<i>FHL2</i>	602633	Protéine musculaire LIM	Peu caractérisé, interaction avec la titine	Arimura <i>et al.</i> , 2007	s. o.†	1
<i>CTF1</i>	600435	Cardiotrophine 1	Peu caractérisé, forme sporadique	Erdmann <i>et al.</i> , 2000; Zimmerman <i>et al.</i> , 2010	Min†δ	1

Abréviations : ARN : acide ribonucléique; ARVC/D : cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène/dysplasie; AV : arythmie supraventriculaire; CMD : cardiomyopathie dilatée; CK : créatine-kinase; CPK : créatine phosphokinase; CVDA : cardiomyopathie arythmogénique ventriculaire droite; DCI : défibrillateur cardiovertteur implantable; DMLG : dystrophie musculaire Limb-Girdle; F : femme; FA : fibrillation auriculaire; FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche; HGMD : *Human Gene Mutation Database*; HTx : transplantation cardiaque; ICC : insuffisance cardiaque congestive; MCS : mort cardiaque subite; MMF : myopathie myofibrillaire; s. o. : sans objet ou non évaluée; NCVG : non-compaction du ventricule gauche; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*; VT : tachycardie ventriculaire; SSS : maladie du sinus (*sick sinus syndrome*).

* Fréquence dans le phénotype telle que présentée par Wilde et Behr [2013].

†Mineur : gène associé aux CMD dont le niveau de preuve est jugé faible par les auteurs.

‡ Nombre de mutations rapporté dans la *Human Gene Mutation Database*.

δ Gène non répertorié par Wilde et Behr [2013].

Tableau 4 Phénocopies de cardiomyopathie dilatée

GÈNE (OMIM)	MALADIE	PHÉNOTYPES CARDIAQUES	AUTRES CARACTÉRISTIQUES ET PHÉNOTYPES	RÉFÉRENCES
<i>MYH7</i> (160760)	Myopathie distale de Laing, rare	≈ 20 % avec CMD, troubles de relaxation du VG et de conduction	Enfance : faiblesse des chevilles et des gros orteils (100 %), faiblesse des extenseurs des doigts et des fléchisseurs du cou (78 %)	Muelas <i>et al.</i> , 2010
<i>TAZ</i> (300394)	Syndrome de Barth Incidence : 1,5/1 000 000	CMD/ICC ≈ 90 % NCVG : 50 % AV : 20 % à 40 % QT long : 25 %	Naissance : myopathie, retard de croissance (≈ 100 %, gravité très variable), acidose et acidurie (50 %), neutropénie (75 %)	Clarke <i>et al.</i> , 2013; Rigaud <i>et al.</i> , 2013; Spencer <i>et al.</i> , 2006
<i>LMNA</i> (150330) <i>EMD</i> (300384)	DMED ou DMLG 1/300 000	Arythmies (92 % > 30 ans) ICC (64 % > 50 ans) MCS (50 %)	Contractures articulaires, faiblesse musculaire précoce	Pasotti <i>et al.</i> , 2008; Van Berlo <i>et al.</i> , 2005; Fowler <i>et al.</i> , 2009; Norwood <i>et al.</i> , 2009
<i>ABCC9</i> (601439)	Syndrome de Cantu < 1/1 000 000	HVG, anomalies structurales, TV (≈ 80 %)	Hypertrichose congénitale, caractéristiques faciales distinctes et ostéochondrodysplasie	Van Bon <i>et al.</i> , 2012; Bienengraeber <i>et al.</i> , 2004
<i>DSP</i> (125647)	Syndrome de Carvajal < 1/1 000 000	CMD surtout du VG (apparition à l'adolescence), CVDA	Kératodermie, peau fragile et cheveux laineux	Elliott <i>et al.</i> , 2010
<i>GBE1</i> (607839)	Maladie d'Andersen (GSD 4), très rare	CMD chez quelques cas	Insuffisance hépatique progressive, atteinte neuromusculaire et (ou) cardiaque. Âge et gravité des symptômes très variables.	Magoulas <i>et al.</i> , 2012

Abréviations : AV : arythmie ventriculaire; CMD : cardiomyopathie dilatée; CVDA : cardiomyopathie arythmogénique ventriculaire droite; DMED : dystrophie musculaire Emery-Dreifuss; DMLG : myopathie des ceintures (*limb-girdle muscular dystrophy*); GSD 4 : glycogénose musculaire de type IV (*glycogen storage disease*); HVG : hypertrophie ventriculaire gauche; ICC : insuffisance cardiaque congestive; NCVG : non-compaction du ventricule gauche; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*; TV : tachycardie ventriculaire; VG : ventricule gauche.

Cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (CVDA)

La cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (CVDA) est une cardiomyopathie héréditaire associée à l'élargissement du ventricule droit (VD) ainsi qu'à des palpitations, syncopes et de l'insuffisance cardiaque lors du stade avancé. Il s'agit de la principale cause de MCS chez les moins de 35 ans, ce qui correspond à 5 % des cas [Sen-Chowdhry *et al.*, 2010]. La prévalence de la CVDA dans la population générale est de 1 cas sur 2 000 à 5 000 personnes et explique 2 % des MCS chez les adultes [Basso *et al.*, 2012; Corrado et Thiene, 2006]. La MCS est difficile à prédire chez les personnes atteintes de CVDA. De ce fait, le défibrillateur cardiovertteur implantable (DCI) devient une option de traitement incontournable.

En effet, le risque annuel d'avoir recours au DCI varie entre 5 % et 22 %, selon les études [Schuler *et al.*, 2012; Zipes *et al.*, 2006]. Les bêta-bloquants, l'amiodarone et le sotalol sont efficaces dans le traitement de la tachycardie ou de la fibrillation ventriculaire; ils peuvent donc aider les patients atteints de CVDA. Toutefois, la pharmacothérapie n'est pas associée à une amélioration du pronostic, contrairement au DCI [Saguner *et al.*, 2014; Wichter *et al.*, 1992].

Le dysfonctionnement cardiaque est attribuable au remplacement du myocarde du VD par du tissu fibrograisseux [Ellinor *et al.*, 2010]. Une mutation autosomale dominante est en cause dans la majorité des cas et met principalement en cause les gènes du desmosome, complexe protéique responsable de l'adhésion cellulaire : plakoglobine (*JUP*), desmoplakine (*DSP*), plakophiline 2 (*PKP2*), desmoglénine 2 (*DSG2*) et desmocolline 2 (*DSC2*). En 2011, Quarta et ses collaborateurs ont réalisé le génotypage de 100 familles atteintes de CVDA en incluant 210 et 45 parents du 1^{er} et du 2^e degré, respectivement. L'étude a mis en évidence une mutation causale chez les proposants toujours vivants (n = 49), dans 73 % des cas (et chez 58 % de toutes les familles) [Quarta *et al.*, 2011].

Tableau 5 Gènes liés à la cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
<i>PKP2</i>	602861	Plakophiline 2	CVDA classique, TV (94 %), HVG (38 %), syncopes, arrêt cardiaque, MCS (44 %), antécédents familiaux (28 %)	Dalal <i>et al.</i> , 2006; Gerull <i>et al.</i> , 2004	11-43	147
<i>DSG2</i>	125671	Desmoglénine	CVDA typique	Awad <i>et al.</i> , 2006; Pilichou <i>et al.</i> , 2006	12-40	68
<i>DSP</i>	125647	Desmoplakine	Forme récessive : syndrome de Carvajal, kératodermie, peau fragile, cheveux laineux et HVG	Rampazzo <i>et al.</i> , 2002	6-16	68
<i>DSC2</i>	125645	Desmocolline	Pénétrance incomplète, présentation clinique variable, participation du VG, kératodermie et cheveux laineux rares	Syrris <i>et al.</i> , 2006	s. o.	43
<i>JUP</i>	173325	Plakoglobine	Présente surtout sous la forme récessive : maladie de Naxos (kératodermie, peau fragile et cheveux laineux)	Asimaki <i>et al.</i> , 2007; Swope <i>et al.</i> , 2013	s. o.	9
<i>TMEM43</i>	612048	Protéine transmembranaire 43	Apparition chez l'H : 32 ans et chez la F : 44 ans.	Merner <i>et al.</i> , 2008	s. o.	9

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
			Pénétrance : 100 % à 60-70 ans. Ectopie (44 %), HVG (27 %), TV (9 %), MCS (2 %), ICC (2 %)			
<i>TGFB3</i>	190230	Facteur de croissance transformant β3	Troubles de la repolarisation (67 %) et de la conduction (89 %), forme légère à modérée, MCS	Beffagna <i>et al.</i> , 2005	s. o.	2
<i>LMNA</i>	150330	Lamines A/C	Dilatation du VD modérée à grave, inversion de l'onde T, pénétrance familiale variable	Quarta <i>et al.</i> , 2012	?	2
<i>RYR2</i>	180902	Récepteur 2 de la ryanodine	CVDA typique, TV induite par l'effort, MCS juvénile	Koop <i>et al.</i> , 2008; Tiso <i>et al.</i> , 2001	50	8

Abréviations : CVDA : cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène; F : femme; H : homme; HGMD : *Human Gene Mutation Database* (nombre de mutations); HVG : hypertrophie ventriculaire gauche; ICC : insuffisance cardiaque congestive; MCS : mort cardiaque subite; s. o. : sans objet ou non évaluée; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*; TV : tachycardie ventriculaire; VD : ventricule droit; VG : ventricule gauche.

* Fréquence dans le phénotype telle que présentée par Wilde et Behr [2013].

† Nombre de mutations rapporté dans la *Human Gene Mutation Database*.

Non-compaction du ventricule gauche (NCVG)

La non-compaction du ventricule gauche (NCVG) est une cardiomyopathie rare qui touche surtout le ventricule gauche (VG) et qui se caractérise par la présence de trabéculations proéminentes et de niches intratrabéculaires profondes [Orphanet, 2014]. À l'échocardiogramme, la NCVG comporte deux couches myocardiques typiques dont l'une, à l'extérieur, est mince et compactée et l'autre, à l'intérieur, est plus épaisse et hypertraberculée. Il a été suggéré que la NCVG découle d'un arrêt du processus de compaction normale du VG durant l'embryogénèse [Klaassen *et al.*, 2008; Sedmera *et al.*, 2000]. La NCVG peut être isolée ou associée à d'autres types de cardiomyopathies (CMH ou CMD), à certaines malformations cardiaques congénitales ou à certains syndromes, comme celui de Barth [Zaragoza *et al.*, 2007]. Le tableau clinique de la NCVG inclut fréquemment de l'insuffisance cardiaque, de l'arythmie auriculaire (de 5 % à 30 %) et ventriculaire (de 20 % à 50 %) ainsi qu'un risque élevé d'événements thromboemboliques (de 20 % à 25 %) [Kato *et al.*, 2010; Oechslin *et al.*, 2000].

Une bonne proportion des cas de NCVG ont une cause génétique reconnue. Les premiers gènes responsables sont la taffazine (*TAZ*), la protéine ZASP (*LDB3*) et l'alpha-dystrobrevine (*DTNA*) [Vatta *et al.*, 2003; Bleyl *et al.*, 1997]. Des mutations causales ont également été trouvées dans les gènes *MYH7*, *ACTC1* et *TNNT2*. Les mutations dans *MYH7* et *ACTC1* sont surtout associées à des formes familiales, mais des cas sporadiques où il y avait présence du *MYH7* ont également été décrits, tout comme pour *TNNT2* [Klaassen *et al.*, 2008].

Les mutations mettant en cause les gènes du sarcomère sont associées à une grande variabilité dans l'expression phénotypique, et ce, même chez des sujets porteurs de la même mutation. Ces variations dans l'expressivité des mutations sarcomériques témoignent de l'extrême hétérogénéité entre les différentes cardiomyopathies et des liens génétiques étroits qui les unissent [Dellefave et McNally, 2010]. Au moyen d'une analyse moléculaire de 17 gènes et d'examens cardiaques réalisés auprès de 58 cas consécutifs de NCVG isolée, Hoedemaekers et ses collaborateurs ont montré que 67 % des cas de NCVG comportaient une origine génétique [Hoedemaekers *et al.*, 2010]. Au total, une cardiomyopathie a été diagnostiquée chez 35 % des sujets évalués, ce qui correspond à une NCVG dans la plupart des cas et à quelques cas de CMH et de CMD. Les traitements actuels visent essentiellement à maîtriser l'évolution vers l'ICC. De fait, il est estimé que 12 % des cas d'ICC nécessitent une transplantation cardiaque [Fan *et al.*, 2009]. L'implantation d'un DCI est recommandée chez les patients qui ont une FEVG < 35 % ou chez ceux aux prises avec un trouble arythmique létal [Rosa *et al.*, 2011].

Syndrome du QT long (SQTL)

Le syndrome du QT long (SQTL) est une anomalie génétique de la repolarisation ventriculaire caractérisée par l'allongement de l'intervalle QT⁷ et un risque élevé de syncope et de MCS [Schwartz *et al.*, 2012]. Le score de Schwartz-Moss est utilisé pour le diagnostic clinique [Schwartz *et al.*, 1993]. Toutefois, l'expression clinique est très variable et la pénétrance des phénotypes est incomplète [Priori *et al.*, 1999]. En effet, à travers les différents sous-types de SQTL, une pénétrance intrafamiliale moyenne de 40 % a été établie [Berge *et al.*, 2008]. Le syndrome Romano-Ward est la forme autosomique dominante très commune, alors que le syndrome Jervell-Lange-Nielsen est rare et de transmission récessive. La prévalence du SQTL congénital est de 1 sur 2 000 [Lombardi, 2013; Schwartz *et al.*, 2009]. Le SQTL compte pour 20 % des morts subites de jeunes personnes dont l'autopsie est négative. De plus, la MCS représente le premier événement clinique chez 5 % des cas asymptomatiques, et 21 % des personnes atteintes décèdent dans l'année suivant la première syncope. Lorsque le traitement est adéquat, le risque de mortalité associé au SQTL diminue à environ 1 % à 2 % par année [Schwartz *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2009; Tester et Ackerman, 2007]. Les β -bloquants ou les antiarythmiques font partie des traitements de base [Moss *et al.*, 2000]. L'implantation prophylactique d'un DCI constitue une approche thérapeutique fréquemment utilisée. À ce jour, 13 gènes distincts ont été mis en cause (tableau 6) et la fréquence d'identification d'une mutation pathogénique parmi ceux-ci est estimée à 70 % [Priori *et al.*, 2013]. Toutefois, la quasi-totalité des cas de SQTL mettent en cause les gènes *KCNQ1* (50 %), *KCNH2* (40 %) et *SCN5A* (3 % à 4 %). Le SQTL peut également être hérité par le biais de mutations composites ou qui touchent plusieurs gènes (5 %) [Hedley *et al.*, 2009].

⁷ L'intervalle QT est la représentation électrocardiographique de la dépolarisation ventriculaire et de la repolarisation qui suit. Étant donné que la durée de repolarisation dépend de la fréquence cardiaque, l'intervalle QT doit être corrigé en fonction de la fréquence cardiaque (QT corrigé = QTc). La valeur normale du QTc chez les femmes est < 450 msec, et chez les hommes, < 440 msec (Centre belge d'information thérapeutique. Allongement de l'intervalle QT et torsades de pointes d'origine médicamenteuse [site Web]. Disponible à : <http://www.cbip.be/Folia/2012/F39F11B.cfm>).

Tableau 6 Gènes liés au syndrome du QT long

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
<i>KCNQ1</i>	607542	Canal K ⁺ (K _v 7.1)	Romano-Ward : adolescence/âge adulte; arythmie déclenchée par les émotions et l'exercice. JLNS : forme grave et surdité. Pénétrance : 70 % à 90 %.	Splawski <i>et al.</i> , 2000 Lupoglazoff <i>et al.</i> , 2004	40-55	432
<i>KCNH2</i>	152427	Canal K ⁺ (K _v 11.1)	LQT2 : adolescence/âge adulte; arythmie déclenchée par les bruits, syncopes se produisant la nuit (29 %) ou à l'exercice (13 %). BAV chez les nouveau-nés. Pénétrance : autour de 50 %.	Splawski <i>et al.</i> , 2000; Schwartz, 2001; Lupoglazoff <i>et al.</i> , 2004	35-45	675
<i>SCN5A</i>	600163	Canal Na ⁺ (Na _v 1.5)	LQT3 : âge adulte; arythmies durant la nuit (39 %). DCI fréquent. Phénotypes très variables (SdeB, troubles de la conduction). Pénétrance : 20 % à 80 %.	Splawski <i>et al.</i> , 2000; Schwartz, 2001	2-8	209
<i>ANK2</i>	106410	Ankyrine 2	LQT4 : surcharge intracellulaire de Ca ²⁺ . Syncope non liée à l'exercice, bradycardie, FA paroxysmale, TVPC. Pénétrance variable.	Mohler <i>et al.</i> , 2003	< 1	12
<i>KCNE1</i>	176261	Canal K ⁺ (minK)	LQT5 : D85N (1 % à 5 % de la population générale) et associé à une gravité accrue. HMZ ou HTZ composite : JLNS (arythmie grave et surdité).	Schulze-Bahr <i>et al.</i> , 1997; Nishio <i>et al.</i> , 2009	< 1	35
<i>KCNE2</i>	603796	Canal K ⁺ (MirP1)	LQT6 : caractéristiques similaires à LQT2	Gordon <i>et al.</i> , 2008	< 1	15
<i>KCNJ2</i>	600681	Canal K ⁺ (K _{ir} 2.1)	Andersen-Tawil : 10-20 ans; TV polymorphe et ectopie ventriculaire, paralysie périodique et anomalies morphologiques. Pénétrance : 60 % à 80 %.	Plaster <i>et al.</i> , 2001; Haruna <i>et al.</i> , 2007	< 1	60
<i>CACNA1C</i>	114205	Canal Ca ²⁺ (Ca _v 1.2)	Timothy : grave, syndactylie, alopécie néonatale et petites dents (100 %). Malformations cardiaques (rares), troubles cognitifs ou autisme. Décès à 2-3 ans (60 %).	Splawski <i>et al.</i> , 2005; Splawski <i>et al.</i> , 2004 Gillis <i>et al.</i> , 2012	NR	9

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
CAV3	601253	Cavéoline 3	LQT9 : caractéristiques similaires à LQT3	Vatta <i>et al.</i> , 2006; Cronk <i>et al.</i> , 2007	< 1	5
SCN4B	608256	Canal Na ⁺ (Na _v β4)	LQT10 : caractéristiques similaires à LQT3. Quelques cas répertoriés.	Mullally <i>et al.</i> , 2013; Medeiros-Domingo <i>et al.</i> , 2007	< 0,1	2
AKAP9	604001	Yotiago	LQT11 : apparition à 26 ans [1-65], QT ≥ 480 ms (100 %), syncope (46 %), arrêt cardiaque (14 %)	Mullally <i>et al.</i> , 2013; Chen <i>et al.</i> , 2007	< 0,1	2
SNTA1	601017	Syntrophine α1	LQT12 : apparition précoce, syncope déclenchée par activité physique, expliquerait 3 % des cas de mort subite du nourrisson.	Wu <i>et al.</i> , 2008; Cheng <i>et al.</i> , 2009	< 0,1	3
KCNJ5	600734	Canal K ⁺ (K _{ir} 3.4)	LQT13 : 9 cas repérés. Syncopes récurrentes déclenchées par les émotions ou l'effort physique (83 %), FA permanente (25 %)	Yang <i>et al.</i> , 2010	s. o.	1

Abréviations : BAV : bloc atrioventriculaire; DCI : défibrillateur cardiovertéur implantable; FA : fibrillation auriculaire; HGMD : *Human Gene Mutation Database* (nombre de mutations); HMZ : homozygote; HTZ : hétérozygote; JLNS : syndrome de Jervell et Lange-Nielson; MCS : mort cardiaque subite; s. o. : sans objet ou non évalué; NR : non répertorié pour cette maladie; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*; TV : tachycardie ventriculaire; TVPC : tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique; SdB : syndrome de Brugada.

* Fréquence dans le phénotype telle que présentée par Wilde et Behr [2013].

† Nombre de mutations rapporté dans la *Human Gene Mutation Database*.

Syndrome de Brugada (SdB)

Le syndrome de Brugada (SdB) est une maladie héréditaire du rythme ventriculaire sans anomalies structurales ou contractiles du cœur. Son diagnostic repose sur la mise en évidence à l'ECG d'un bloc de branche droit et d'une élévation du segment ST. Le SdB se manifeste par de la tachycardie ventriculaire polymorphe (TVP), de la fibrillation ventriculaire (FV) et de la syncope, et est associé à un risque élevé de MCS [Benito *et al.*, 2009]. Bien que le cœur soit en apparence normal, des anomalies du ventricule droit ressemblant à une CVDA peuvent compliquer le diagnostic différentiel entre ces deux entités bien distinctes [Hoogendijk, 2012]. Quoique variable d'une population à l'autre, la prévalence du SdB est établie à environ 1 cas sur 2 000 sujets et expliquerait environ 10 % des MCS. Les cas de SdB demeurent en majorité asymptomatiques. Par contre, entre 20 % et 40 % des cas vont présenter au cours de leur vie des épisodes de syncopes ou d'arrêts cardiaques récupérés associés à de la TVP.

Une bonne proportion des cas sont sporadiques, mais les cas familiaux de la maladie se transmettent selon un mode autosomale dominant avec pénétrance incomplète [Schulze-Bahr *et al.*, 2003]. À ce jour, et en fonction des auteurs, entre 11 et 14 gènes distincts ont

été mis en cause (tableau 7). La plupart des mutations se retrouvent dans *SCN5A* et comptent pour 20 % à 30 % des cas [Mizusawa et Wilde, 2012; Bastiaenen et Behr, 2011]. Les autres gènes n'expliquent qu'un 10 % de cas supplémentaires, laissant une proportion équivalente à 70 % sans cause moléculaire [Hoogendijk, 2012]. Quelques variants du gène *SCN5A* présentent des phénotypes différents d'un cas à l'autre, pouvant parfois s'apparenter à un trouble de la conduction ou au SQT [Makita *et al.*, 2008]. De plus, une évidente discordance existe au sein de certaines familles où tous les cas de SdB repérés n'ont pas nécessairement la même mutation « causale » [Probst *et al.*, 2009]. Une association positive indépendante entre le *SCN5A* muté et le risque de MCS n'a pas été établie, mais une étude suggère plutôt une apparition plus précoce et une fréquence des épisodes de FV plus élevée que les cas *SCN5A* de type sauvage [Nishii *et al.*, 2010]. Quelques séries de cas ont montré que le DCI ou l'ablation endocavitaire par radiofréquence des zones défectueuses sont des traitements efficaces pour contrer la récurrence des épisodes de FV/TV [Sunsaneewitayakul *et al.*, 2012].

Tableau 7 Gènes liés au syndrome de Brugada

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
<i>SCN5A</i>	600163	Canal Na ⁺ (Na _v 1.5)	SdB1 : 39 ± 15 ans, chevauchement phénotypique avec LQT3, pénétrance complète chez l'adulte; rendement du test (11 % à 28 %)	Kapplinger <i>et al.</i> , 2009; Schulze-Bahr <i>et al.</i> , 2003	21	358
<i>GPD1L</i>	611778	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase 1 (like)	SdB2 : syncope : 33 %, pénétrance : 37 %. Expliquerait 1 % des cas de MSN.	London <i>et al.</i> , 2007; Van Norstrand <i>et al.</i> , 2007	< 1	1
<i>CACNA1C</i>	114205	Canal Ca ²⁺ (Ca _v 1.2)	SdB3 : pénétrance et expression clinique variables, QT court (25 %), repolarisation précoce (4 %). Sporadique (60 %).	Burashnikov <i>et al.</i> , 2010; Antzelevitch <i>et al.</i> , 2007; Fukuyama <i>et al.</i> , 2013	6	10
<i>CACNB2</i>	600003	Canal Ca ²⁺ (Ca _v β _{2b})	SdB4 : pénétrance élevée, QT court (25 %), FV idiopathique (5 %), repolarisation précoce (8 %)	Burashnikov <i>et al.</i> , 2010; Antzelevitch <i>et al.</i> , 2007	5	8
<i>SCN1B</i>	600235	Canal Na ⁺ (Na _v β1)	SdB5 : troubles de la conduction non spécifiques. Pénétrance et expression clinique variables.	Watanabe <i>et al.</i> , 2008	< 1	3

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
<i>KCNE3</i>	604433	Canal K ⁺ (MirP2)	SdB6 : quelques cas dont 1 avec arrêt cardiaque au repos, 18-55 ans, QT normal.	Delpon <i>et al.</i> , 2008; Nakajima <i>et al.</i> , 2012	< 1	2
<i>SCN3B</i>	608214	Canal Na ⁺ (Na _v β3)	SdB7 : 19-64 ans, asymptomatique : 50 %, antécédents familiaux d'arythmie et de MCS : (75 %)	Hu <i>et al.</i> , 2009; Ishikawa <i>et al.</i> , 2013	< 1	2
<i>CACNA2D1</i>	114204	Canal Ca ²⁺ (α ₂ /δ ₁)	SdB9: peu étudié, très peu de cas, arythmie du nœud sino-auriculaire au repos, repolarisation précoce (4 %)	Burashnikov <i>et al.</i> , 2010; Baig <i>et al.</i> , 2011	2	3
<i>KCND3</i>	605411	Canal K ⁺ (K _v 4.3)	SdB10 : 2 cas (22 et 45 ans), palpitations au repos (100 %), pré-syncope (50 %), antécédents familiaux de MCS (50 %)	Giudicessi <i>et al.</i> , 2011	< 1	2

Abréviations : Ca : calcium; FV : fibrillation ventriculaire; HGMD : *Human Gene Mutation Database*; K : potassium; MCS : mort cardiaque subite; MSN : mort subite du nourrisson; Na : sodium; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*; SdB : syndrome de Brugada.

* Fréquence dans le phénotype telle que présentée par Wilde et Behr [2013].

† Nombre de mutations rapporté dans la *Human Gene Mutation Database*.

Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC)

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC) est une maladie génétique arythmogène grave caractérisée par de la tachycardie ventriculaire provoquée par une stimulation adrénergique (émotion ou exercice) et se manifestant par des épisodes de syncope ou par une MCS (dans 10 % à 20 % des cas). La prévalence de la TVPC est de 1 cas sur 10 000 personnes. L'ECG au repos est généralement normal, la tachycardie est induite par l'exercice dans 75 % à 100 % des cas [Pflaumer et Davis, 2012]. L'âge caractéristique d'apparition de la maladie se situe entre 7 et 9 ans, sans qu'il y ait de différence entre les deux sexes [Bloise et Napolitano, 2011]. À 40 ans, 80 % des personnes atteintes ont eu un événement cardiaque; le taux de mortalité associé se situe entre 30 % et 50 % [Liu *et al.*, 2008]. La plupart des cas (entre 50 % et 60 %) sont associés à une mutation du gène *RYR2* (transmission autosomique dominante) et plus rarement, de la calséquestrine (*CASQ2*). Bien que plusieurs mutations aient été repérées à ce jour, le mode d'action par lequel l'arythmie est causée par le biais de *RYR2* demeure inconnu. Les β-bloquants sans activité sympathomimétique intrinsèque réduisent la survenue des syncopes et le recours au DCI est occasionnellement nécessaire [Bhuiyan *et al.*, 2007].

Tableau 8 Gènes liés à la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC)

GÈNE	OMIM	PROTÉINE	PHÉNOTYPES ASSOCIÉS (FRÉQUENCE)	RÉFÉRENCES	RÉPARTITION	
					%*	HGMD†
<i>RYR2</i>	180902	Récepteur 2 de la ryanodine	TVPC1 : apparition précoce et taux de mortalité d'environ 30 % avant 30 ans	Laitinen <i>et al.</i> , 2001; Priori <i>et al.</i> , 2002	50	122
<i>CASQ2</i>	114251	Calséquestrine	TVPC2 : apparition précoce, peu de variabilité phénotypique, pénétrance de 100 % avant 10 ans	Postma <i>et al.</i> , 2002; Lahat <i>et al.</i> , 2001	s. o.	21
<i>KCNJ2</i>	600681	Canal K ⁺ (K _{ir} 2.1)	TVPC3 : peu caractérisée, confusion avec la LQT7	Tester <i>et al.</i> , 2006	NR	0
<i>ANK2</i>	106410	Ankyrine 2	TVPC4 : peu caractérisée, confusion avec la LQT4	Mohler <i>et al.</i> , 2004	NR	0

Abréviations : HGMD : *Human Gene Mutation Database*; K : potassium; s. o. : sans objet ou non évaluée; NR : non répertoriée pour cette maladie; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*.

* Fréquence dans le phénotype telle que présentée par Wilde et Behr [2013].

† Nombre de mutations rapporté dans la *Human Gene Mutation Database*.

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Le test décrit ici ne figure pas dans le *Répertoire*. Les demandes sont envoyées hors Québec. Selon les données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS), 51 analyses ont été réalisées à l'extérieur de la province, ce qui totalise plus de 170 000 \$ au cours de la période comprise entre avril 2012 et mars 2013.

Les analyses peuvent être effectuées dans plusieurs centres qui offrent le séquençage sous forme de panel ou de gènes individuels. En fonction du gène, le service offert comprend un séquençage et une analyse de délétions/de duplication ou un séquençage seul. Le tableau 9 présente un résumé des services offerts par deux centres accrédités.

Tableau 9 Services offerts dans des centres au Québec et hors Québec

GÈNES	PARTNERS HEALTHCARE					AMBRY GENETICS						CHUS	STE-JUSTINE
	CMH (18)	CMD (27)	CVDA TVPC (8)	NCVG (10)	CMP (51)	CMP (56)	CMD (37)	CMH (31)	Aryth (29)	SdB (9)	SQTL (12)	CMH (22)	CMP/Aryth (67)
<i>ABCC9</i>		X			X	X	X						X
<i>ACTC1</i>	X	X		X	X	X	X	X				X	X
<i>ACTN2</i>	X	X			X	X	X	X				X	X
<i>AKAP9</i>									X		X		X
<i>ANK2</i>									X		X		X
<i>ANKRD1</i>					X	X	X	X					X
<i>BAG3</i>		X			X	X	X						
<i>CACNA1C</i>									X	X	X		X
<i>CACNA2D1</i>									X	X			
<i>CACNB2</i>									X	X			X
<i>CALR3</i>						X		X					
<i>CASQ2</i>			X	X	X				X				X
<i>CAV3</i>					X	X		X	X		X		X
<i>CRYAB</i>					X	X	X						X
<i>CSRP3</i>	X	X			X	X	X	X				X	X
<i>CTF1</i>		X			X								X
<i>DES</i>		X			X	X	X	X	X				X
<i>DMD</i>						X	X						
<i>DSC2</i>			X		X	X			X				X
<i>DSG2</i>			X		X	X			X				X
<i>DSP</i>			X		X	X			X				X
<i>DTNA</i>				X	X								X

GÈNES	PARTNERS HEALTHCARE					AMBRY GENETICS						CHUS	STE-JUSTINE
	CMH (18)	CMD (27)	CVDA TVPC (8)	NCVG (10)	CMP (51)	CMP (56)	CMD (37)	CMH (31)	Aryth (29)	SdB (9)	SQTL (12)	CMH (22)	CMP/Aryth (67)
EMD		X			X	X	X						X
EYA4						X	X						
FHL2					X								X
FXN						X		X					
ILK						X	X						
GAA												X	
GATAD1		X			X								
GBE1												X	
GLA	X				X	X		X				X	X
GPD1L									X	X			X
ILK							X						
JPH2						X		X				X	
JUP			X		X	X			X				X
KCNAB3													X
KCND2													X
KCND3													X
KCNE1									X		X		X
KCNE2									X		X		X
KCNE3									X	X			X
KCNH2									X		X		X
KCNIP2													X
KCNJ2									X		X		X
KCNJ8									X	X			

GÈNES	PARTNERS HEALTHCARE					AMBRY GENETICS						CHUS	STE-JUSTINE
	CMH (18)	CMD (27)	CVDA TVPC (8)	NCVG (10)	CMP (51)	CMP (56)	CMD (37)	CMH (31)	Aryth (29)	SdB (9)	SQTL (12)	CMH (22)	CMP/Aryth (67)
KCNQ1									X		X		X
LAMA4					X								X
LAMP2	X	X			X	X	X	X				X	X
LDB3		X		X	X	X	X						X
LMNA		X		X	X	X	X		X				X
MYBPC3	X	X		X	X	X	X	X				X	X
MYH6					X	X	X	X					X
MYH7	X	X		X	X	X	X	X				X	X
MYL2	X				X	X		X				X	X
MYL3	X				X	X		X				X	X
MYLK2					X								X
MYOM1						X		X					
MYOZ2	X				X	X		X				X	X
MYPN						X	X						
NEBL					X	X	X						
NEXN	X	X			X	X	X	X				X	X
PDLIM3						X	X						
PKP2			X		X	X			X				X
PLN	X	X			X	X	X	X				X	X
PRKAG2	X				X	X		X				X	X
PTPN11						X		X					
RAF1						X		X					
RBM20		X			X	X	X						X

GÈNES	PARTNERS HEALTHCARE					AMBRY GENETICS						CHUS	STE-JUSTINE
	CMH (18)	CMD (27)	CVDA TVPC (8)	NCVG (10)	CMP (51)	CMP (56)	CMD (37)	CMH (31)	Aryth (29)	SdB (9)	SQTL (12)	CMH (22)	CMP/Aryth (67)
<i>RYR2</i>			X		X	X			X				X
<i>SCN1B</i>									X	X			X
<i>SCN3B</i>									X	X			X
<i>SCN4B</i>									X		X		X
<i>SCN5A</i>		X			X	X	X		X	X	X		X
<i>SGCD</i>		X			X	X	X						X
<i>SNTA1</i>									X		X		X
<i>TAZ</i>		X		X	X	X	X						X
<i>TCAP</i>		X			X	X	X	X					X
<i>TGFB3</i>													X
<i>TMEM43</i>			X		X	X			X				X
<i>TMPO</i>					X	X	X						
<i>TNNC1</i>	X	X			X	X	X	X				X	X
<i>TNNI3</i>	X	X			X	X	X	X				X	X
<i>TNNT2</i>	X	X		X	X	X	X	X				X	X
<i>TPM1</i>	X	X			X	X	X	X				X	X
<i>TTN</i>		X			X	X	X	X					X
<i>TTR</i>	X				X	X	X	X				X	X
<i>TXNRD2</i>						X	X						
<i>VCL</i>		X		X	X	X	X	X				X	X

Abréviations : Aryth : arythmies; CMD : cardiomyopathie dilatée; CMH : cardiomyopathie hypertrophique; CMP : cardiomyopathies; CVDA : cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène; NCVG : non-compaction du ventricule gauche; SdB : syndrome de Brugada ; SQTL : syndrome du QT long ; TVPC : tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique.

5.2 Validité clinique

Le séquençage semi-automatisé de Sanger est utilisé depuis plusieurs années dans les analyses diagnostiques et est considéré comme l'« étalon de référence » (*gold standard*). Toutefois, l'évolution des technologies de séquençage (NGS) permet maintenant une analyse simultanée de plusieurs gènes, de l'exome ou même de l'ensemble du génome à l'aide d'une approche à haut débit et à faible coût. Pour ces raisons, le NGS est en processus d'être adopté dans un contexte clinique. Dans cette foulée, la FDA a approuvé l'utilisation de la plateforme MiSeqDx d'Illumina à des fins cliniques, à la fin de 2013.

L'utilisation de l'approche de NGS pour déceler les maladies d'origine multigénique a permis de repérer plusieurs variations décrites comme pathogéniques et confirmées pathogéniques par la suite par séquençage classique [Lepri *et al.*, 2014; Umbarger *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Pomianowski et Elefteriades, 2013]. De par sa capacité analytique, le NGS surpasse le séquençage de Sanger puisque le séquençage simultané de plusieurs gènes tel qu'il est effectué par NGS serait difficile sinon irréalisable dans un contexte de laboratoire diagnostique selon l'approche classique.

Toutefois, les limitations de cette technologie ont mené à la recommandation que les approches par NGS ne doivent pas être utilisées exclusivement pour investiguer et valider la présence de variants. Le séquençage selon la méthode de Sanger est nécessaire pour investiguer les régions où la profondeur de lecture est inadéquate et pour valider les variants observés. Toutefois, son introduction dans un contexte clinique est souhaitable considérant que les bénéfices associés à l'utilisation des NGS sont supérieurs à leurs risques associés (mémoire de la FDA quant à l'introduction de MiSeqDx, ACMG [Rehm *et al.*, 2013; Sikkema-Raddatz *et al.*, 2013]).

L'enrichissement des cibles à séquencer constitue une étape importante pour assurer une profondeur de lecture appropriée. Plusieurs études ont donc comparé les différentes troupes disponibles sur le marché.

D'Argenio et ses collaborateurs [2014] ont publié une procédure de criblage moléculaire de 202 gènes associés aux cardiomyopathies en NGS dans le but de réduire les coûts et les délais liés au diagnostic. L'enrichissement a été réalisé en utilisant une capture sur puce de Nimblegen optimisée pour la plateforme de séquençage Roche 454 GS FLX. Une approche destinée à prioriser les variants a également été testée. Trois patients atteints de CMH ayant des phénotypes différents ont été étudiés. Huit gènes sarcomériques chez deux d'entre eux, ainsi que leurs apparentés, ont préalablement été testés au moyen de la dHPLC⁸/séquençage de Sanger. Le tableau 10 synthétise la présentation clinique de la maladie chez les trois patients. Une profondeur de lecture $\geq 10X$ a été obtenue pour 91,8 % des régions ciblées. Plus de 6 000 variants par patient ont été obtenus. Le processus d'exclusion a permis de mettre en évidence une liste de quelques 30 variants par patient. Parmi les mutations codantes, 7 à 11 sont ponctuelles, non synonymes et vraisemblablement délétères. Également, 3 à 6 mutations par changements de cadre de lecture, 0 à 1 délétion complexe et 15 à 18 changements aux sites d'épissage ont été retenus. Comparativement à la dHPLC/Sanger, le NGS a permis de repérer plusieurs variants supplémentaires chez les patients 1 (25 par rapport à 14) et 2 (22 par rapport à 14), respectivement. En comparaison avec la dHPLC/Sanger, le NGS affiche des valeurs de sensibilité clinique de 96,2 % [80,4-99,9] et de 95,7 % [78,1-99,9], contre 53,8 % [33,4-73,4]

⁸ Chromatographie liquide à haute performance en condition dénaturante (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*).

et 60,9 % [38,5-80,3] chez les patients 1 et 2, respectivement. Les deux méthodes ont une spécificité équivalente (de 99,9 % pour les patients) [D'Argenio *et al.*, 2014].

Tableau 10 Présentation clinique de la maladie chez trois patients [D'Argenio *et al.*, 2014]

CAS	CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES	SURVEILLANCE/TRAITEMENT	MUTATIONS
F 15	HVG et défaut de VM <i>in utero</i> . VG normal et légère régurgitation de la VM à l'adolescence. Père en santé : <i>MYH7</i> p.A326P/wt	ECG et écho fréquents. Traitement avec antagonistes du Ca	<i>MYH7</i> p.A326P <i>MYH7</i> 3'UTR c.5808+20G>A <i>IGF2</i> p.Q172X
F 0	HVG (8,3 mm) stable, plusieurs défauts des septa ventriculaires et QT de 490 ms. Père atteint : <i>MYBPC3</i> c.3627+2T>A/wt Mère atteinte de bradycardie sinusale : <i>KCNQ1</i> p.W176Lfs*65/wt	ECG + écho	<i>MYBPC3</i> Splice c.3627+2T>A <i>KCNQ1</i> p.W176Lfs*65
M 51	Sténose valvulaire pulmonaire à la naissance. DM et polycythémie à 44 ans. À 45 ans : HVG (15 mm), FA, troubles de conduction et QT de 495 ms. ICC terminale. Fille non atteinte (légère dépression comme son père) : porte les deux mutations <i>CACNA1C</i>	ECG, écho, tests biochimiques et biopsie musculaire à 45 ans. Valvulotomie à 14 ans, HTx à 51 ans	<i>CACNA1C</i> p.G490R <i>CACNA1C</i> p.E771G

Abréviations : DM : diabète mellitus; ECG : électrocardiogramme; écho : échocardiographie; F : féminin; M : masculin; FA : fibrillation auriculaire; HVG : hypertrophie ventriculaire gauche; HTx : transplantation cardiaque; ICC : insuffisance cardiaque congestive; VG : ventricule gauche; VM : valve mitrale.

Fokstuen et ses collaborateurs [2014] ont exploré l'utilité et le coût-efficacité du NGS comme outil diagnostique auprès de deux patients présentant une CMH familiale et de deux cas sporadiques de syndrome du QT long. Un enrichissement des séquences codantes, points de jonction et régions non traduites (5' et 3') de 130 gènes⁹ en lien avec les cardiomyopathies (83) et phénocopies (22), arythmies (21) et aortopathies (4) a été réalisé en utilisant une capture sur puce de Nimblegen. Le tableau 11 présente les caractéristiques cliniques et les résultats du criblage moléculaire. Une profondeur de lecture $\geq 8X$ a été obtenue dans 89 % des régions ciblées. En moyenne, 217 variants par patient ont été obtenus (43 % non synonymes). Seuls les variants ayant une fréquence allélique $< 0,01$ ont été considérés, soit 18 par patient [10-25]; 52 % ont été confirmés par la méthode de Sanger, ce qui résulte en une liste de 9 variants exoniques non synonymes ou des points de jonction par échantillon [Fokstuen *et al.*, 2014].

⁹ Tous les gènes inclus dans au moins une des deux demandes ont été testés par Fokutsen et ses collaborateurs [2013], à l'exception de *AKAP9*, *ANKRD1*, *CTF1*, *FHL2*, *GBE1*, *KCNAB3*, *KCNE3*, *KCNIP2*, *LAMA4*, *NEXN*, *RBM20*, *SCN1B*, *SCN3B* et *SNTA1*.

Tableau 11 Caractéristiques cliniques et criblage moléculaire de 4 patients [Fokstuen et al., 2014]

CAS	CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES	SURVEILLANCE/TRAITEMENT	MUTATIONS
68 M	HVG (10 mm), FEVG (75 %), troubles de la conduction, inversion de l'onde T et antécédents familiaux de MCS, ICC terminale	Restriction quant à l'alcool	MYH7 p.T1377M MYBPC3 p.R326Q
45 M	Asymptomatique, HVG (16 mm), FEVG (65 %), inversion de l'onde T et antécédents familiaux de MCS	Pas de symptômes; β-bloquants; suivi pour TAAD	MYBPC3 <i>Splice</i> c.1224-10G>A FBN1 p.V984I TGFBR2 p.E125fs
65 F	Régurgitation modérée de la valve tricuspide, QT de 512 ms, syncopes récurrentes	DCI	SCN5A p.R1860S KCNQ1 p.R243C
8 M	Échocardiogramme normal, QT situé entre 130-550 ms, syncopes	β-bloquants	MYBPC3 p.Q921E

Abréviations : DCI : défibrillateur cardiovertteur implantable; F: féminin; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche; HVG : hypertrophie du ventricule gauche; ICC : insuffisance cardiaque congestive; M : masculin; MCS : mort cardiaque subite; TAAD : anévrisme et dissection de l'aorte thoracique.

L'étude de Lopes [2013] avait comme principal objectif d'explorer les implications cliniques reliées à l'utilisation d'un large panel de gènes en NGS auprès de 223 cas de CMH (âgés de 46 ans en moyenne lors de l'évaluation initiale, [étendue entre 5 et 76 ans]; 74 % des cas sont de sexe masculin; 37 % ont des antécédents familiaux de la maladie). Vingt gènes associés aux CMH/CMD, 17 liés à d'autres cardiomyopathies ou arythmies et 4 autres gènes exploratoires ont été testés¹⁰. L'enrichissement et le séquençage ont été réalisés à l'aide des technologies SureSelect d'Agilent et GAllx d'Illumina. Sur 2,1 Mb de séquences ciblées, la profondeur de lecture moyenne a été de 120 (4/223 entre 20 et 40); 91 % de toutes les séquences étaient égales ou supérieures à 10X et 85 % étaient égales ou supérieures à 20X. Les variants rares (fréquence < 0,5 %) ont été retenus comme « potentiellement pathogéniques ». Après avoir exclu les mutations silencieuses et filtré les variants (QS ≥ 30), 480 variants distincts ont été retenus (641 appels) chez 209 des 223 patients inclus (94 %). En excluant la titine, 152 variants distincts, dont 89 nouveaux chez 143 patients (64 %) ont été repérés parmi les 20 gènes associés aux CMH/CMD. Les gènes les plus souvent touchés par des mutations très probables ou certainement pathogènes ont été *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*. Par ailleurs, 94 variants additionnels (73 nouveaux) de pathogénicité probable ont été décelés chez 96 patients parmi les gènes du desmosome ou des canaux ioniques. Les auteurs concluent que l'inclusion de gènes autres que les huit gènes sarcomériques dans un panel visant des patients atteints de CMH n'apportent aucune valeur ajoutée, sinon davantage de variants de signification inconnue (*variant of unknown significance* ou VUS [Lopes et al., 2013]).

¹⁰ **20** : *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, *TNNC1*, *MYH6*, *TTN*, *PDLIM3*, *CSRP3*, *DES*, *LMNA*, *LDB3*, *VCL*, *TCAP*, *PLN*, *RBM20*; **17** : *JUP*, *DSP*, *PKP2*, *DSG2*, *DSC2*, *RYR2*, *TMEM43*, *TGFβ3*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *ANK2*, *CASQ2*, *CAV3*, *KCNJ2*; **4** : *PLEC*, *GJA1*, *PKP4*, *PNN*

Meder et ses collaborateurs [2011] ont mis au point une technique d'enrichissement exomique de 47 gènes associés aux cardiomyopathies (hypertrophiques et dilatées) par capture d'hybride sur puce suivie d'un séquençage à haut débit sur la plateforme ABI SOLiD 3G+. Une approche destinée à filtrer les variants repérés a également été testée. Dix patients atteints de cardiomyopathies ayant des phénotypes différents ont été étudiés avec l'approche proposée. Le tableau 12 en présente les caractéristiques cliniques. Après avoir exclu les mutations silencieuses et filtré les variants (QS $\geq$ 20), 35 variants différents par patient ont été repérés, dont 11 nouveaux. Au final, une moyenne de trois variants [0-6] prédits pathogéniques par patient a été retenue. Les auteurs ont pu calculer une spécificité et une sensibilité cliniques établies à 98 % et 96 %, respectivement [Meder *et al.*, 2011].

Tableau 12 Caractéristiques cliniques de 10 patients atteints de cardiomyopathies [Meder *et al.*, 2011]

CAS (ÂGE)	CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES	MUTATIONS CONNUES CMH	MUTATIONS CONNUES CMD
10 (11-77)	CMD : 5 cas et CMH : 5 cas. Antécédents familiaux : 90 %. HVG (9-27 mm) et FEVG : 20 à 71 %.	MYBPC3 F412fs MYBPC3 P955fs MYH7 R143Q MYH7 R453C	MYBPC3 R326Q LMNA R321X

Abréviations : CMD : cardiomyopathie dilatée; CMH : cardiomyopathie hypertrophique; FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche; HVG : hypertrophie ventriculaire gauche.

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 ¹¹		X	
Exactitude		X	

5.3 Validité analytique (ou technique)

Données de validation locale

L'analyse proposée par le CHUS relativement au panel de CMH comprend la technologie de capture Nimblegen, le séquenceur Miseq et l'analyse bio-informatique, telle que le recommande l'*American College of Medical Genetic* [Rehm, 2013; Richards *et al.*, 2008] (annexe B). Cette approche a fait l'objet d'une validation relativement à la sélection de 96 gènes. L'analyse bio-informatique est basée sur l'alignement par *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) et le *Genome Analysis Toolkit* (GATK), initialement conçu dans le cadre du projet *1000 Genomes* du *Broad Institute*¹². Les variations de séquence obtenues font l'objet d'une double révision manuelle de l'analyse bio-informatique. Les bases de données de variants pathologiques (ClinVar, HGMD, LOVD) et de polymorphismes (dbSNP et Exome

¹¹ Courbe caractéristique de la performance d'un test (ROC curve).

¹² Broad Institute. GATK [site Web]. Disponible à : <http://www.broadinstitute.org/gatk>.

Server Project) sont utilisées à cette étape. La confirmation des variations par séquençage de Sanger est effectuée.

L'ADN d'un sujet de référence CEPH (NA12878) a été utilisé afin de réaliser deux expériences indépendantes de séquençage. Les variations obtenues ont été comparées au génome de référence de NA12878, rendu disponible par le *National Institute of Standards and Technology* (NIST)¹³.

La couverture médiane du séquençage était de 90X, avec <0,3 % des séquences montrant une couverture inférieure à 20X. Lors de l'analyse bio-informatique des séquences, les paramètres minimaux pour les variations étaient de qualité supérieure à Q30 (1 erreur sur 1 000) et la couverture était égale ou supérieure à 20X.

Au total, 373 variations, dont 14 indels, ont été repérées, ce qui se traduit en une sensibilité clinique globale proche de 100 % [IC à 95 % : 99-100 %]. Lors de l'investigation du gène *GAA*, riche en GC, parmi 20 sujets, un total de 197 variations, dont 18 indels (≤ 10 nucléotides), ont été décelées, ce qui se traduit par une sensibilité clinique également proche de 100 % [IC à 95 % : 98-100 %]. Relativement à l'évaluation de la spécificité, 208 variations ont été observées uniquement dans les régions codantes et les jonctions intron-exon. Comparativement au génome de référence, quatre faux-positifs ont été confirmés, ce qui correspond à une spécificité clinique de 98 % [IC à 95 % : 95-99 %].

Une validation supplémentaire a été effectuée auprès de 20 échantillons de patients atteints de CMH, répartis sur 3 séquençages indépendants, et dont 19 ont également été séquencés par un laboratoire américain reconnu pour son expertise en NGS (*Partners Healthcare*). Parmi ces 19 cas, 11 étaient connus pour contenir au moins une variation d'intérêt clinique. Chacune des mutations attendues a été retrouvée. Les huit cas négatifs selon *Partners Healthcare* ont aussi été confirmés par le CHUS. Le taux de détection des indels > 10 nucléotides n'a pas été déterminé. La contribution de ce type de changement aux CMH est inconnue pour la plupart des gènes du panel. Les demandeurs prévoient utiliser l'algorithme « CoNIFER » pour rechercher des indels de plus grande taille [Krumm *et al.*, 2012].

L'analyse proposée par le CHU Sainte-Justine relativement au panel étendu (cardiomyopathies et arythmies) comprend la technologie de capture Haloplex d'Agilent, le séquenceur HiSeq2500 et l'analyse bio-informatique. Cette dernière étape comprend l'utilisation de logiciels conçus par des institutions reconnues comme le *Broad Institute*. Ceux-ci sont accessibles gratuitement et peuvent être modifiés (code source ouvert). Les demandeurs ont paramétré et configuré ces outils selon leurs besoins d'analyse. Par exemple, la visualisation du nombre de lectures bidirectionnelles a été modifiée, car le logiciel GATK ne donne pas cette information par défaut. Différents logiciels sont actuellement utilisés :

- 1) l'alignement des lectures est effectuée grâce à l'algorithme de BWA 0.6.2 ;
- 2) le réalignement des indels s'effectue au moyen de l'outil GATK v2.6 du *Broad Institute*
- 3) l'outil Picard enlève les duplicatas; (<http://picard.sourceforge.net>)
- 4) le module de GATK Unified Genotyper s'occupe de l'identification des variations (*variant calling*) (<https://www.broadinstitute.org>)

¹³ Tiré de la Grille d'information complémentaire relativement à l'utilisation d'une approche de séquençage à haut débit complétée par le D^r Bruno Maranda, le D^r Sébastien Lévesque et le D^r Serge Gravel et transmise à l'INESSS le 23 mai 2014.

- 5) Annovar permet l'annotation des variations (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>). Quelques outils maison ont aussi été élaborés afin de faciliter le travail d'interprétation et de mieux contrôler la qualité tout au long de l'analyse bio-informatique¹⁴.

Tableau 13 Comparaison des données de lecture issues des 4 études présentées dans la section consacrée à la validité clinique

ÉTUDE	MALADIE	n GÈNES CIBLÉS	ENRICHISSEMENT ET PLATEFORME DE SÉQUENÇAGE	n BASES LUES/ÉCH	FRAGMENTS LUS CIBLÉS	ENRICHISSEMENT DES RÉGIONS D'INTÉRÊT	PROFONDEUR DE LECTURE (Moyenne et % de gènes)
D'Argenio 2014	CMH	202 (3,9 Mb)	Capture sur puce; Roche 454 GS FLX	203 Mb	73 % à 77 %	288 - 333X	Moy. 33X à 36X > 10X : 92 % > 15X : 85 %
Fokstuen 2014	CMH + CMD Arythmies TAAD	130 (1,1 Mb)	Capture sur puce; Illumina HiSeq 2000	14 Mb	55 %	-	Moy. 37X > 8X : 89 %
Lopes 2013	CMH + CMD Arythmies	41 (2,1 Mb)	Capture en solution; Illumina GAllx	?	?	?	Moy. 120X > 10X : 91 % > 20X : 85 %
Meder 2011	CMH + CMD	47 (0,3 Mb)	Capture sur puce; ABI SOLiD 3G+	1,5 Gb	6 % à 40 %	2 169X (1 345 - 4 556)	Moy. 412X (34 - 1 155) > 1X : 97 % > 20X : 85 %

Abréviations : CMD : cardiomyopathie dilatée; CMH : cardiomyopathie hypertrophique; éch : échantillon; Gb : gigabase (1 billion de paires de bases); Mb : mégabase (1 million de paires de bases); Moy : moyenne; TAAD : anévrisme et dissection de l'aorte thoracique.

Hedges et ses collaborateurs (2011) ont comparé trois méthodes d'enrichissement génomique préalable au NGS sur la plateforme SOLiD3+. Les méthodes sont *Sequence capture array* (Nimblegen), *SureSelect liquid-based hybrid capture system* (Agilent) et *Raindance Technologies Multiplex PCR*. La technologie d'Agilent démontre une meilleure efficacité d'enrichissement des régions ciblées (60,8 % par rapport à environ 53 % pour les deux autres) ainsi qu'une meilleure corrélation des profondeurs de lecture entre les échantillons. Les performances de Nimblegen sont similaires aux profondeurs de lecture de 20X ou moins. Raindance et Nimblegen SeqCap offrent des profondeurs de lecture moins variables, donc plus près de la moyenne. Raindance offre une plus grande capacité d'adaptation dans le design expérimental [Hedges *et al.*, 2011].

Kiialainen et ses collaborateurs [2011] ont comparé deux méthodes d'hybridation visant l'enrichissement de séquences génomiques préalable au séquençage de masse en parallèle : *Sequence capture array* (Nimblegen) et *SureSelect liquid-based hybrid capture system* (Agilent). La plateforme de séquençage utilisée était Illumina GAllx. Concernant les technologies de Nimblegen et d'Agilent, respectivement : 74 % et 75 % contre 41 % et 67 % des séquences lues étaient correctement ciblées. Les séquences enrichies ont pu être lues

¹⁴ Tiré de la Grille d'information complémentaire relativement à l'utilisation d'une approche de séquençage à haut débit complétée par les
^D¹⁵ Jacques Michaud, Guy Rouleau et Julie Gauthier et transmise à l'INESSS le 23 mai 2014.

dans près de 100 % des cas avec les deux méthodes, c'est-à-dire dans 99,9 % (Agilent) et 99,5 % (Nimblegen) des cas [Kiialainen *et al.*, 2011].

Teer et ses collaborateurs [2010] ont comparé trois méthodes d'enrichissement génomique préalable au NGS sur la plateforme Illumina en évaluant la sensibilité propre au génotype et l'efficacité de détection des variants. Les méthodes comparées sont la MIP (*molecular inversion probe*), dérivé d'hybridation et d'extension PCR, une méthode d'hybridation en solution (HSS) et une méthode d'hybridation sur puce (HSP). Un ensemble d'exons regroupant des séquences hautement conservées issus de 528 gènes non contigus (2 612 Mb) était visé [Teer *et al.*, 2010].

Performance comparée

Le design des sondes pour chacune des méthodes a permis d'obtenir de l'information de séquence s'élevant à 95,9 % (2 506 Mb), à 92,6 % (2 419 Mb) et à 93,8 % (2 450 Mb) relativement aux méthodes MIP, d'hybridation en solution et d'hybridation sur puce, respectivement.

Fraction de séquences alignées aux régions d'intérêt

La fraction reflète la capacité de la méthode à enrichir les séquences cibles appropriées. L'analyse a porté sur six échantillons différents (deux par méthode). La MIP a généré environ 30 millions de fragments lus (1 100 Mb, au total) et l'hybridation (HSS et HSP), entre 10 et 14 millions de fragments lus (environ entre 400 et 500 Mb, au total). Parmi ces séquences lues, 57 % (600 Mb), 55 à 59 % ($\approx$ 290 Mb) et 52 % à 55 % (193 à 270 Mb) étaient relatives aux méthodes par MIP, HSS et HSP.

Profondeur et uniformité de couverture

Les méthodes d'enrichissement par MIP, HSS et HSP ont permis d'atteindre une couverture de séquence minimale de 10X pour 79 %, 87 % et 93 % des régions d'intérêt, et de 20X pour 74 %, 83 % et 89 % des régions d'intérêt, respectivement.

Sensibilité

Les sensibilités analytiques globales calculées étaient de 78 % en ce qui concerne la MIP, de 86 % quant au HSS et de 92 % en ce qui a trait au HSP. Un génotype a été assigné par les trois méthodes dans 70 % des bases situées dans des régions d'intérêt, alors qu'un génotype a été assigné au moyen d'une seule méthode dans 25 % des bases. Les trois méthodes n'ont pas réussi à assigner un génotype dans 5 % des bases.

Concordance du génotype

Il n'existe pas d'étalon-or pour chacune des bases à tester. Deux sources de données ont été utilisées afin de vérifier la précision du génotype assigné (Infinium 1M SNP et un séquençage selon la stratégie aléatoire *shotgun*, 30X de couverture). Toutes les méthodes ont permis d'obtenir un taux de concordance entre le génotype assigné et le génotype de référence, qui varie entre 99,84 % et 99,99 %.

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité	X		
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Effet de matrice			X
Concordance	X		
Corrélation entre test et comparateur	X		
Autres selon le type de test			

5.4 Recommandations d'autres organismes

L'American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force ont émis en 2011 des recommandations concernant les stratégies de tests génétiques et de dépistage familial dans les cas de cardiomyopathie hypertrophique [Gersh *et al.*, 2011]. Elles sont présentées selon la classification et le niveau de preuve :

Recommandations de classe I; niveau de preuve B¹⁵ :

- L'évaluation de l'hérédité familiale et le conseil génétique sont recommandés lors de l'évaluation des patients atteints de CMH.
- Les patients soumis à des tests génétiques devraient aussi avoir accès au conseil génétique spécialisé en cardiologie, de manière à assurer une bonne évaluation des résultats et de leur signification clinique avec le patient.
- Le dépistage (avec ou sans tests génétiques) est recommandé chez les apparentés du premier degré d'un cas index.
- Les tests génétiques pour la CMH ou l'hypertrophie cardiaque non expliquée sont recommandés chez les cas atypiques ou si une cause génétique autre est suspectée.

Recommandation de classe IIa; niveau de preuve B¹⁶ :

- Il est raisonnable de soumettre un cas index à des tests génétiques dans le but de repérer les apparentés du premier degré à risque d'être atteints d'une CMH.

Recommandation de classe IIb; niveau de preuve B¹⁷ :

- L'utilité clinique des tests génétiques dans le but d'évaluer le risque de mort cardiaque subite chez un cas de CMH est incertaine.

Recommandations de classe III; niveau de preuve B¹⁸

- Les tests génétiques ne sont pas indiqués chez les apparentés d'un cas index sans mutation pathogénique claire décelée.
- La surveillance clinique n'est pas indiquée chez les apparentés de génotype négatif.

Un énoncé de position de la Société canadienne de cardiologie et de la Société canadienne de rythmologie sur les tests génétiques relatifs aux troubles du rythme et aux cardiomyopathies a été publié en 2011 [Gollob *et al.*, 2011]. Voici quelques énoncés tirés du document publié :

¹⁵ Recommandation de classe I, niveau de preuve B : la procédure est utile/efficace; preuve basée sur un essai clinique randomisé ou des études non randomisées.

¹⁶ Recommandation de classe IIa; niveau de preuve B : recommandation en faveur de l'utilité/l'efficacité de la procédure, basée sur une preuve non concluante à partir d'un essai clinique randomisé ou des études non randomisées.

¹⁷ Recommandation de classe IIb; niveau de preuve B : utilité/efficacité moins bien établies; preuve encore moins concluante que dans la classe IIa à partir d'un essai clinique randomisé ou des études non randomisées.

¹⁸ Recommandation de classe III; niveau de preuve B : la procédure n'est pas utile/efficace et peut causer un tort; preuve basée sur un essai clinique randomisé ou des études non randomisées.

- **QT long** : l'analyse génétique devrait inclure les gènes *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2* et *SCN5A*. L'évaluation des gènes rares ($\leq 1\%$) ne devrait pas se faire sur une base routinière, en raison du risque de détection de VUS. Chez les patients présentant un phénotype clair et dont le test des gènes listés ci-dessus s'est avéré négatif, il faut considérer la poursuite de la recherche moléculaire au cas par cas.
- **SdB** : l'analyse génétique devrait se limiter au gène *SCN5A*. L'investigation des gènes *SCN1B*, *SCN3B*, *KCNE3*, *CACN1AC*, *CACNB2b*, *CACNA2D1* et *GPD1L* n'est pas indiquée en clinique en raison de leur rareté et devrait être considérée uniquement dans des circonstances spéciales.
- **CVDA** : l'analyse génétique de *PKP2* et *DSP* devrait être réalisée en première intention en raison du taux élevé de détection d'une mutation dans *PKP2* (45 % des cas) et *DSP* (6 à 16 % des cas). Si l'analyse est négative, on devrait par la suite inclure les gènes *DSG2* et *DSC2*, présents dans 5 à 10 % des cas. *TMEM43* devrait être investigué chez les patients qui ont un ancêtre originaire de Terre-Neuve.
- **TVPC** : l'analyse génétique de *RYR2* est justifiée en raison de la taille du gène et de la présence de points chauds (*hotspots*) dans certains exons. La recherche doit se poursuivre à l'ensemble du gène advenant un résultat négatif des points chauds des exons et si le tableau clinique est très convaincant. Si le test de *RYR2* est négatif et : 1) qu'une transmission autosomale récessive est possible, le criblage de *CASQ2* est recommandé; ou 2) le patient présente une onde U proéminente, le criblage de *KCNJ2* est recommandé.
- **CMH** : comme le diagnostic de la CMH repose sur l'imagerie cardiaque, l'analyse génétique devrait servir à fournir les informations nécessaires pour tester les apparentés et non pour confirmer le diagnostic. Une approche en trois temps est recommandée. Il faut débiter par *MYH7* et *MYBPC3*, car ils sont en cause dans 30 à 50 % des cas. Si les tests sont négatifs, tester *TNNT2*, *TNNI3* et *TPM1* afin d'ajouter un 10 à 15 % de couverture supplémentaire. L'évaluation des gènes rares ($\leq 1\%$) n'est pas recommandée en clinique en raison du risque d'identification de VUS et de la réduction du coût-efficacité. Finalement, si la CMH s'accompagne d'une préexcitation ventriculaire évidente, l'investigateur devrait d'abord considérer une maladie cardiaque de stockage et tester *PRKAG2*, *LAMP2* et *GLA*.
- **CMD** : en l'absence d'antécédents familiaux, le rendement de l'analyse génétique diminue beaucoup. Les gènes *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *LMNA* et *SCN5A* comptent pour environ 15 % à 30 % des cas familiaux. Il faut suspecter un défaut du gène *DMD* dans les cas familiaux aux prises avec de la faiblesse musculaire et une transmission liée au chromosome X. Si l'évaluation des gènes principaux ne révèle pas la cause de la CMD, le criblage de *PLN* et *MYH6* devrait être envisagé. En présence d'arythmie auriculaire ou de troubles de la conduction, il faudrait tester en priorité *SCN5A* et *LMNA*. Une recherche élargie de tous les gènes associés à la DCM n'est pas coût-efficace.

6 RÉPERCUSSIONS À ANTICIPER DE L'INTRODUCTION ÉVENTUELLE DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

L'interprétation des variants repérés nécessite l'emploi de ressources bio-informatiques et humaines importantes. Les bases de données de mutations connues, les logiciels de prédiction des variations sur la fonction de la protéine et la littérature scientifique doivent être consultés afin de caractériser un variant.

La complexité de la technologie et de l'interprétation des résultats requière la mobilisation d'un personnel spécialisé doté d'une formation professionnelle initiale, continue et appropriée.

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

En l'absence de tests génétiques, tous les apparentés du premier degré hautement susceptibles d'être atteints d'une CMH devront être surveillés en moyenne aux cinq ans par échocardiogramme. L'identification des porteurs de la mutation causale permettrait de suivre uniquement les sujets ayant un risque réel [Gollob *et al.*, 2011; Bos *et al.*, 2009]. L'annexe A présente l'algorithme de dépistage de la CMH proposé par Bos et ses collaborateurs. La recherche de mutations pour chacun des gènes du panel de façon individuelle par la méthode de Sanger est plus coûteuse qu'une analyse de séquence de masse. Toutefois, les limites technologiques actuelles ne permettent pas d'écarter complètement les techniques standards d'analyse de mutations (approche de Sanger et MLPA).

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

La ligne de partage entre l'utilité du NGS à des fins cliniques ou à des fins de recherche est difficile à tracer.

Le NGS repère des mutations de pathogénicité variable, probable ou incertaine qui peuvent influencer les décisions cliniques et personnelles.

Le NGS ouvre la porte aux découvertes fortuites de mutations pathogéniques se situant hors de la question clinique initiale [Evans et Rothschild, 2012; Makrythanasis et Antonarakis, 2012].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Le NGS permet une évaluation moléculaire rapide et à moindre coût de plusieurs gènes en simultané.

7.2 Validité clinique

La sensibilité relative au panel de CMH de 22 gènes, y compris les autres gènes plus rares, n'est pas connue avec exactitude. Pour ce qui est de la spécificité clinique, certains gènes sarcomériques ont également été associés non seulement à la CMH, mais aussi la CMD ou à la NCVG, d'où l'importance de bien documenter le phénotype du patient dans l'indication clinique.

Lorsqu'une variation est trouvée dans l'un des gènes sarcomériques au sein d'un panel de gènes similaire à celui de 22 gènes relativement à la CMH, il a été observé que 80 % des variations rares peuvent être classifiées comme pathologiques ou probablement pathologiques. Les 20 % qui restent sont des cas de signification incertaine et requièrent des études de ségrégation familiale.

7.3 Recommandations d'autres organismes

Un énoncé de position canadien publié en 2011 concernant la CMH recommande de procéder aux tests génétiques dans la population atteinte. La recommandation vise non pas à établir le diagnostic, mais bien à permettre : 1) le dépistage des apparentés; et 2) le traitement des personnes à risque en temps opportun. En effet, il existe des traitements efficaces pour prévenir la mort cardiaque subite, comme le défibrillateur implantable.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Panel de 22 gènes par NGS - Cardiomyopathies hypertrophiques

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 après vérification de la conformité du laboratoire aux principes directeurs du MSSS sur l'« Organisation des services publics de diagnostic moléculaire au Québec »
- ☐ 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

Panel de 67 gènes par NGS – Cardiomyopathies et arythmies familiales

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 étapes suivantes seront effectuées :
 - la démonstration clinique de l'effet sur la santé des patients;
 - une démonstration plus solide de la validation des aspects techniques et bio-informatiques;
 - la démonstration de la conformité du laboratoire aux principes directeurs du MSSS sur l' « Organisation des services publics de diagnostic moléculaire au Québec ».

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

Le Comité s'interroge sur la raison pour laquelle le panel inclut les gènes associés aux cardiomyopathies et aux arythmies, deux conditions cardiaques qui ne coexistent pas nécessairement.

RÉFÉRENCES

- Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm* 2011;8(8):1308-39.
- Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, et al. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007;115(4):442-9.
- Arimura T, Hayashi T, Matsumoto Y, Shibata H, Hiroi S, Nakamura T, et al. Structural analysis of four and half LIM protein-2 in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357(1):162-7.
- Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz JE, McKenna WJ. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2007;81(5):964-73.
- Awad MM, Dalal D, Cho E, Amat-Alarcon N, James C, Tichnell C, et al. DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2006;79(1):136-42.
- Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nurnberg G, et al. Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 2011;14(1):77-84.
- Banyersad SM, Moon JC, Whelan C, Hawkins PN, Wechalekar AD. Updates in cardiac amyloidosis: A review *J Am Heart Assoc* 2012;1(2):e000364.
- Basso C, Corrado D, Bauce B, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5(6):1233-46.
- Bastiaenen R et Behr ER. Sudden death and ion channel disease: Pathophysiology and implications for management. *Heart* 2011;97(17):1365-72.
- Bauer R, Hudson J, Muller HD, Sommer C, Dekomien G, Bourke J, et al. Does delta-sarcoglycan-associated autosomal-dominant cardiomyopathy exist? *Eur J Hum Genet* 2009;17(9):1148-53.
- Beffagna G, Occhi G, Nava A, Vitiello L, Ditadi A, Basso C, et al. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res* 2005;65(2):366-73.
- Benito B, Brugada J, Brugada R, Brugada P. Brugada syndrome. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(11):1297-315.
- Berge KE, Haugaa KH, Fruh A, Anfinson OG, Gjesdal K, Siem G, et al. Molecular genetic analysis of long QT syndrome in Norway indicating a high prevalence of heterozygous mutation carriers. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68(5):362-8.

- Bhuiyan ZA, van den Berg MP, van Tintelen JP, Bink-Boelkens MT, Wiesfeld AC, Alders M, et al. Expanding spectrum of human RYR2-related disease: New electrocardiographic, structural, and genetic features. *Circulation* 2007;116(14):1569-76.
- Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Cholain F, Gao F, et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet* 2004;36(4):382-7.
- Bleil SB, Mumford BR, Brown-Harrison MC, Pagotto LT, Carey JC, Pysher TJ, et al. Xq28-linked noncompaction of the left ventricular myocardium: Prenatal diagnosis and pathologic analysis of affected individuals. *Am J Med Genet* 1997;72(3):257-65.
- Bloise R et Napolitano C. Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique [site Web]. Orphanet; 2011. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=3286.
- Bos JM1, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(3):201-11.
- Boucek D, Jirikowic J, Taylor M. Natural history of Danon disease. *Genet Med* 2011;13(6):563-8.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpon E, Hu D, Desai M, et al. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010;7(12):1872-82.
- Burton H, Alberg C, Stewart A. Mainstreaming genetics: A comparative review of clinical services for inherited cardiovascular conditions in the UK. *Public Health Genomics* 2010;13(4):235-45.
- Carballo S, Robinson P, Otway R, Fatkin D, Jongbloed JD, de Jonge N, et al. Identification and functional characterization of cardiac troponin I as a novel disease gene in autosomal dominant dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2009;105(4):375-82.
- Carniel E, Taylor MR, Sinagra G, Di Lenarda A, Ku L, Fain PR, et al. Alpha-myosin heavy chain: A sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112(1):54-9.
- Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2010;31(22):2715-26.
- Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(52):20990-5.
- Cheng J, Van Norstrand DW, Medeiros-Domingo A, Valdivia C, Tan BH, Ye B, et al. Alpha1-syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;2(6):667-76.
- Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, et al. Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: A genome-wide analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(11):1127-35.
- Christiaans I, Birnie E, Bonzel GJ, Mannens MM, Michels M, Majoor-Krakauer D, et al. Manifest disease, risk factors for sudden cardiac death, and cardiac events in a large nationwide

- cohort of predictively tested hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers: Determining the best cardiological screening strategy. *Eur Heart J* 2011;32(9):1161-70.
- Christiaans I, Birnie E, van Langen IM, van Spaendonck-Zwarts KY, van Tintelen JP, van den Berg MP, et al. The yield of risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy myosin-binding protein C gene mutation carriers: Focus on predictive screening. *Eur Heart J* 2010;31(7):842-8.
- Clarke SL, Bowron A, Gonzalez IL, Groves SJ, Newbury-Ecob R, Clayton N, et al. Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:23.
- Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schroder R. Desminopathies: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 2013;125(1):47-75.
- Coats CJ et Elliott PM. Genetic biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy. *Biomark Med* 2013;7(4):505-16.
- Corrado D et Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Clinical impact of molecular genetic studies. *Circulation* 2006;113(13):1634-7.
- Cronk LB, Ye B, Kaku T, Tester DJ, Vatta M, Makielski JC, Ackerman MJ. Novel mechanism for sudden infant death syndrome: Persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* 2007;4(2):161-6.
- D'Argenio V, Frisso G, Precone V, Boccia A, Fienga A, Pacileo G, et al. DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *J Mol Diagn* 2014;16(1):32-44.
- Dalal D, James C, Devanagondi R, Tichnell C, Tucker A, Prakasa K, et al. Penetrance of mutations in plakophilin-2 among families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(7):1416-24.
- Davis JS, Hassanzadeh S, Winitsky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, et al. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell* 2001;107(5):631-41.
- Delatycki MB et Corben LA. Clinical features of Friedreich ataxia. *J Child Neurol* 2012;27(9):1133-7.
- Dellefave L et McNally EM. The genetics of dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2010;25(3):198-204.
- Delpon E, Cordeiro JM, Nunez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, et al. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1(3):209-18.
- Duboscq-Bidot L, Charron P, Ruppert V, Fauchier L, Richter A, Tavazzi L, et al. Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2009;30(17):2128-36.
- Ellinor PT, MacRae CA, Thierfelder L. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Fail Clin* 2010;6(2):161-77.
- Elliott P, O'Mahony C, Syrris P, Evans A, Rivera Sorensen C, Sheppard MN, et al. Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3(4):314-22.

- Erdmann J, Hassfeld S, Kallisch H, Fleck E, Regitz-Zagrose V. Genetic variants in the promoter (g983G>T) and coding region (A92T) of the human cardiotrophin-1 gene (CTF1) in patients with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2000;16(5):448.
- Evans JP et Rothschild BB. Return of results: Not that complicated? *Genet Med* 2012;14(4):358-60.
- Fan KY, Chan CW, Cheng LC, Ko RL, Lam YM, Jim MH, et al. Isolated left ventricular non-compaction: An unusual indication for heart transplantation. *Hong Kong Med J* 2009;15(5):378-80.
- Fokstuen S, Makrythanasis P, Nikolaev S, Santoni F, Robyr D, Munoz A, et al. Multiplex targeted high-throughput sequencing for Mendelian cardiac disorders. *Clin Genet* 2014;85(4):365-70.
- Fowler SJ, Napolitano C, Priori SG. The genetics of cardiomyopathy: genotyping and genetic counseling. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2009;11(6):433-46.
- Frisso G, Limongelli G, Pacileo G, Del Giudice A, Forgione L, Calabro P, et al. A child cohort study from southern Italy enlarges the genetic spectrum of hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2009;76(1):91-101.
- Fukuyama M, Ohno S, Wang Q, Kimura H, Makiyama T, Itoh H, et al. L-type calcium channel mutations in Japanese patients with inherited arrhythmias. *Circ J* 2013;77(7):1799-806.
- Garcia-Pavia P, Syrris P, Salas C, Evans A, Mirelis JG, Cobo-Marcos M, et al. Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: A clinicopathological study. *Heart* 2011;97(21):1744-52.
- George AL Jr. Molecular and genetic basis of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 2013;123(1):75-83.
- Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani JA, Fifer MA, Link MS, et al. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;142(6):e153-203.
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004;36(11):1162-4.
- Gillis J, Burashnikov E, Antzelevitch C, Blaser S, Gross G, Turner L, et al. Long QT, syndactyly, joint contractures, stroke and novel CACNA1C mutation: Expanding the spectrum of Timothy syndrome. *Am J Med Genet A* 2012;158A(1):182-7.
- Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV, et al. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2011;8(7):1024-32.
- Gollob MH, Blier L, Brugada R, Champagne J, Chauhan V, Connors S, et al. Recommendations for the use of genetic testing in the clinical evaluation of inherited cardiac arrhythmias associated with sudden cardiac death: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society joint position paper. *Can J Cardiol* 2011;27(2):232-45.

- Gordon E, Panaghie G, Deng L, Bee KJ, Roepke TK, Krogh-Madsen T, et al. A KCNE2 mutation in a patient with cardiac arrhythmia induced by auditory stimuli and serum electrolyte imbalance. *Cardiovasc Res* 2008;77(1):98-106.
- Haley SM, Fragala MA, Skrinar AM. Pompe disease and physical disability. *Dev Med Child Neurol* 2003;45(9):618-23.
- Haruna Y, Kobori A, Makiyama T, Yoshida H, Akao M, Doi T, et al. Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome. *Hum Mutat* 2007;28(2):208.
- Hassel D, Dahme T, Erdmann J, Meder B, Hüge A, Stoll M, et al. Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2009;15(11):1281-8.
- Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, et al. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(11):2192-201.
- Hedges DJ, Guettouche T, Yang S, Bademci G, Diaz A, Andersen A, et al. Comparison of three targeted enrichment strategies on the SOLiD sequencing platform. *PLoS One* 2011;6(4):e18595.
- Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: A mutation update. *Hum Mutat* 2009;30(11):1486-511.
- Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2012;366(7):619-28.
- Hershberger RE et Siegfried JD. Update 2011: Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(16):1641-9.
- Hershberger RE, Pinto JR, Parks SB, Kushner JD, Li D, Ludwigsen S, et al. Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(4):306-13.
- Hickey KT et Rezzadeh K. Hypertrophic cardiomyopathy: A clinical and genetic update. *Nurse Pract* 2013;38(5):22-31.
- Hoedemaekers YM, Caliskan K, Michels M, Frohn-Mulder I, van der Smagt JJ, Pfefferkorn JE, et al. The importance of genetic counseling, DNA diagnostics, and cardiologic family screening in left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3(3):232-9.
- Hoogendijk MG. Diagnostic dilemmas: Overlapping features of Brugada syndrome and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Front Physiol* 2012;3:144.
- Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, et al. A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(3):270-8.
- Inagaki N, Hayashi T, Arimura T, Koga Y, Takahashi M, Shibata H, et al. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(2):379-86.

- Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, On YK, et al. Novel SCN3B mutation associated with Brugada syndrome affects intracellular trafficking and function of Nav1.5. *Circ J* 2013;77(4):959-67.
- Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, Carr JL, Harris-Kerr C, Pollevick GD, et al. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 2009;6(9):1297-303.
- Kaski JP, Syrris P, Esteban MT, Jenkins S, Pantazis A, Deanfield JE, et al. Prevalence of sarcomere protein gene mutations in preadolescent children with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(5):436-41.
- Kato Y, Horigome H, Takahashi-Igari M, Yoshida K, Aonuma K. Isolation of pulmonary vein and superior vena cava for paroxysmal atrial fibrillation in a young adult with left ventricular non-compaction. *Europace* 2010;12(7):1040-1.
- Kiialainen A, Karlberg O, Ahlford A, Sigurdsson S, Lindblad-Toh K, Syvanen AC. Performance of microarray and liquid based capture methods for target enrichment for massively parallel sequencing and SNP discovery. *PLoS One* 2011;6(2):e16486.
- Klaassen S, Probst S, Oechslin E, Gerull B, Krings G, Schuler P, et al. Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation* 2008;117(22):2893-901.
- Kloos W, Katus HA, Meder B. Genetic cardiomyopathies. Lessons learned from humans, mice, and zebrafish. *Herz* 2012;37(6):612-7.
- Knoll R, Postel R, Wang J, Kratzner R, Hennecke G, Vacaru AM, et al. Laminin-alpha4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation* 2007;116(5):515-25.
- Knoll R, Hoshijima M, Chien KR. Muscle LIM protein in heart failure. *Exp Clin Cardiol* 2002;7(2-3):104-5.
- Konno T, Chang S, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2010;25(3):205-9.
- Koop A, Goldmann P, Chen SR, Thieleczek R, Varsanyi M. ARVC-related mutations in divergent region 3 alter functional properties of the cardiac ryanodine receptor. *Biophys J* 2008;94(12):4668-77.
- Krumm N, Sudmant PH, Ko A, O'Roak BJ, Malig M, Coe BP, et al. Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome Res* 2012;(8):1525-32.
- Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, et al. A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 2001;69(6):1378-84.
- Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B, et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;103(4):485-90.
- Landstrom AP et Ackerman MJ. The Achilles' heel of cardiovascular genetic testing: Distinguishing pathogenic mutations from background genetic noise. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90(4):496-9.

- Landstrom AP, Adekola BA, Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. PLN-encoded phospholamban mutation in a large cohort of hypertrophic cardiomyopathy cases: Summary of the literature and implications for genetic testing. *Am Heart J* 2011a;161(1):165-71.
- Landstrom AP, Kellen CA, Dixit SS, van Oort RJ, Garbino A, Weisleder N, et al. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling. *Circ Heart Fail* 2011b;4(2):214-23.
- Lepri FR, Scavelli R, Digilio MC, Gnazzo M, Grotta S, Dentici ML, et al. Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. *BMC Med Genet* 2014;15:14.
- Li D, Morales A, Gonzalez-Quintana J, Norton N, Siegfried JD, Hofmeyer M, Hershberger RE. Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci* 2010;3(3):90-7.
- Li X, Buckton AJ, Wilkinson SL, John S, Walsh R, Novotny T, et al. Towards clinical molecular diagnosis of inherited cardiac conditions: A comparison of bench-top genome DNA sequencers. *PLoS One* 2013;8(7):e67744.
- Liu N, Ruan Y, Priori SG. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis* 2008;51(1):23-30.
- Lombardi R. Genetics and sudden death. *Curr Opin Cardiol* 2013;28(3):272-81.
- London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, et al. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 2007;116(20):2260-8.
- Lopes LR, Zekavati A, Syrris P, Hubank M, Giambartolomei C, Dalageorgou C, et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2013;50(4):228-39.
- Loporcaro CG1, Tester DJ, Maleszewski JJ, Kruisselbrink T, Ackerman MJ. Confirmation of cause and manner of death via a comprehensive cardiac autopsy including whole exome next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(8):1083-9.
- Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, Fressart V, Simon F, Bozio A, et al. Long QT syndrome in neonates: Conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(5):826-30.
- Magoulas PL, El-Hattab AW, Roy A, Bali DS, Finegold MJ, Craigen WJ. Diffuse reticuloendothelial system involvement in type IV glycogen storage disease with a novel GBE1 mutation: A case report and review. *Hum Pathol* 2012;43(6):943-51.
- Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, et al. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 2008;118(6):2219-29.
- Makrythanasis P et Antonarakis SE. High-throughput sequencing and rare genetic diseases. *Mol Syndromol* 2012;3(5):197-203.
- Marian AJ. Hypertrophic cardiomyopathy: From genetics to treatment. *Eur J Clin Invest* 2010;40(4):360-9.
- Maron BJ. Sudden death in young athletes. *N Engl J Med* 2003;349(11):1064-75.

- Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: Clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2012;60(8):705-15.
- Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113(14):1807-16.
- McNair WP, Sinagra G, Taylor MR, Di Lenarda A, Ferguson DA, Salcedo EE, et al. SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(21):2160-8.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, et al. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007;116(2):134-42.
- Meder B, Haas J, Keller A, Heid C, Just S, Borries A, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4(2):110-22.
- Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet* 2008;82(4):809-21.
- Mizusawa Y et Wilde AA. Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5(3):606-16.
- Mogensen J, Murphy RT, Shaw T, Bahl A, Redwood C, Watkins H, et al. Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(10):2033-40.
- Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, et al. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* 2003;80(1-2):207-15.
- Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(24):9137-42.
- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003;421(6923):634-9.
- Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 2000;24(2):163-6.
- Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, et al. Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2000;101(6):616-23.

- Muelas N, Hackman P, Luque H, Garces-Sanchez M, Azorin I, Suominen T, et al. MYH7 gene tail mutation causing myopathic profiles beyond Laing distal myopathy. *Neurology* 2010;75(8):732-41.
- Mullally J, Goldenberg I, Moss AJ, Lopes CM, Ackerman MJ, Zareba W, et al. Risk of life-threatening cardiac events among patients with long QT syndrome and multiple mutations. *Heart Rhythm* 2013;10(3):378-82.
- Murphy RT, Mogensen J, McGarry K, Bahl A, Evans A, Osman E, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase disease mimicks hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome: Natural history. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(6):922-30.
- Nakajima T, Wu J, Kaneko Y, Ashihara T, Ohno S, Irie T, et al. KCNE3 T4A as the genetic basis of Brugada-pattern electrocardiogram. *Circ J* 2012;76(12):2763-72.
- Nishii N, Ogawa M, Morita H, Nakamura K, Banba K, Miura D, et al. SCN5A mutation is associated with early and frequent recurrence of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Circ J* 2010;74(12):2572-8.
- Nishio Y, Makiyama T, Itoh H, Sakaguchi T, Ohno S, Gong YZ, et al. D85N, a KCNE1 polymorphism, is a disease-causing gene variant in long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(9):812-9.
- Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: In-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain* 2009;132(Pt 11):3175-86.
- Oechslin EN, Attenhofer Jost CH, Rojas JR, Kaufmann PA, Jenni R. Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: A distinct cardiomyopathy with poor prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(2):493-500.
- Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002;105(4):431-7.
- Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michels VV. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(4):723-32.
- Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998;280(5364):750-2.
- Orphanet. Non-compaction ventriculaire gauche [site Web]. 2014. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=54260.
- Pasotti M, Klersy C, Pilotto A, Marziliano N, Rapezzi C, Serio A, et al. Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(15):1250-60.
- Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, Mogensen J, McKenna WJ, Elliott P. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5(1):10-7.
- Perrot A, Schmidt-Traub H, Hoffmann B, Prager M, Bit-Avragim N, Rudenko RI, et al. Prevalence of cardiac beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)* 2005;83(6):468-77.

- Pflaumer A et Davis AM. Guidelines for the diagnosis and management of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Heart Lung Circ* 2012;21(2):96-100.
- Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, et al. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113(9):1171-9.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001;105(4):511-9.
- Poliac LC, Barron ME, Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Anesthesiology* 2006;104(1):183-92.
- Pomianowski P et Elefteriades JA. The genetics and genomics of thoracic aortic disease. *Ann Cardiothorac Surg* 2013;2(3):271-9.
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002;91(8):e21-6.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 2013;10(12):1932-63.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;106(1):69-74.
- Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, et al. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: Impact on clinical management. Study group on molecular basis of arrhythmias of the working group on arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 1999;20(3):174-95.
- Probst V, Wilde AA, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, et al. SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(6):552-7.
- Quarta G, Syrris P, Ashworth M, Jenkins S, Zuborne Alapi K, Morgan J, et al. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2012;33(9):1128-36.
- Quarta G, Muir A, Pantazis A, Syrris P, Gehmlich K, Garcia-Pavia P, et al. Familial evaluation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Impact of genetics and revised task force criteria. *Circulation* 2011;123(23):2701-9.
- Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, et al. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2002;71(5):1200-6.
- Rehm HL. Disease-targeted sequencing: A cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 2013;14(4):295-300.
- 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.

- Richard P, Fressart V, Charron P, Hainque B. Génétique des cardiomyopathies héréditaires. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58(5):343-52.
- Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107(17):2227-32.
- Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med* 2008;10(4):294-300.
- Rigaud C, Lebre AS, Touraine R, Beaupain B, Ottolenghi C, Chabli A, et al. Natural history of Barth syndrome: A national cohort study of 22 patients. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:70.
- Rosa LV, Salemi VM, Alexandre LM, Mady C. Noncompaction cardiomyopathy: A current view. *Arq Bras Cardiol* 2011;97(1):e13-9.
- Ruggiero A, Chen SN, Lombardi R, Rodriguez G, Marian AJ. Pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy caused by myozenin 2 mutations is independent of calcineurin activity. *Cardiovasc Res* 2013;97(1):44-54.
- Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, Elliott PM. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002;105(12):1407-11.
- Saguner AM, Vecchiati A, Baldinger SH, Rueger S, Medeiros-Domingo A, Mueller-Burri AS, et al. Different prognostic value of functional right ventricular parameters in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circ Cardiovasc Imaging* 2014;7(2):230-9.
- Schuler PK, Haegeli LM, Saguner AM, Wolber T, Tanner FC, Jenni R, et al. Predictors of appropriate ICD therapy in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Long term experience of a tertiary care center. *PLoS One* 2012;7(9):e39584.
- Schulze-Bahr E, Eckardt L, Breithardt G, Seidl K, Wichter T, Wolpert C, et al. Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: Different incidences in familial and sporadic disease. *Hum Mutat* 2003;21(6):651-2.
- Schulze-Bahr E, Haverkamp W, Wedekind H, Rubie C, Hordt M, Borggrefe M, et al. Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum Genet* 1997;100(5-6):573-6.
- Schwartz PJ. QT prolongation, sudden death, and sympathetic imbalance: The pendulum swings. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12(9):1074-7.
- Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R. Long-QT syndrome: From genetics to management. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5(4):868-77.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, et al. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2009;120(18):1761-7.
- Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993;88(2):782-4.
- Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec* 2000;258(4):319-37.

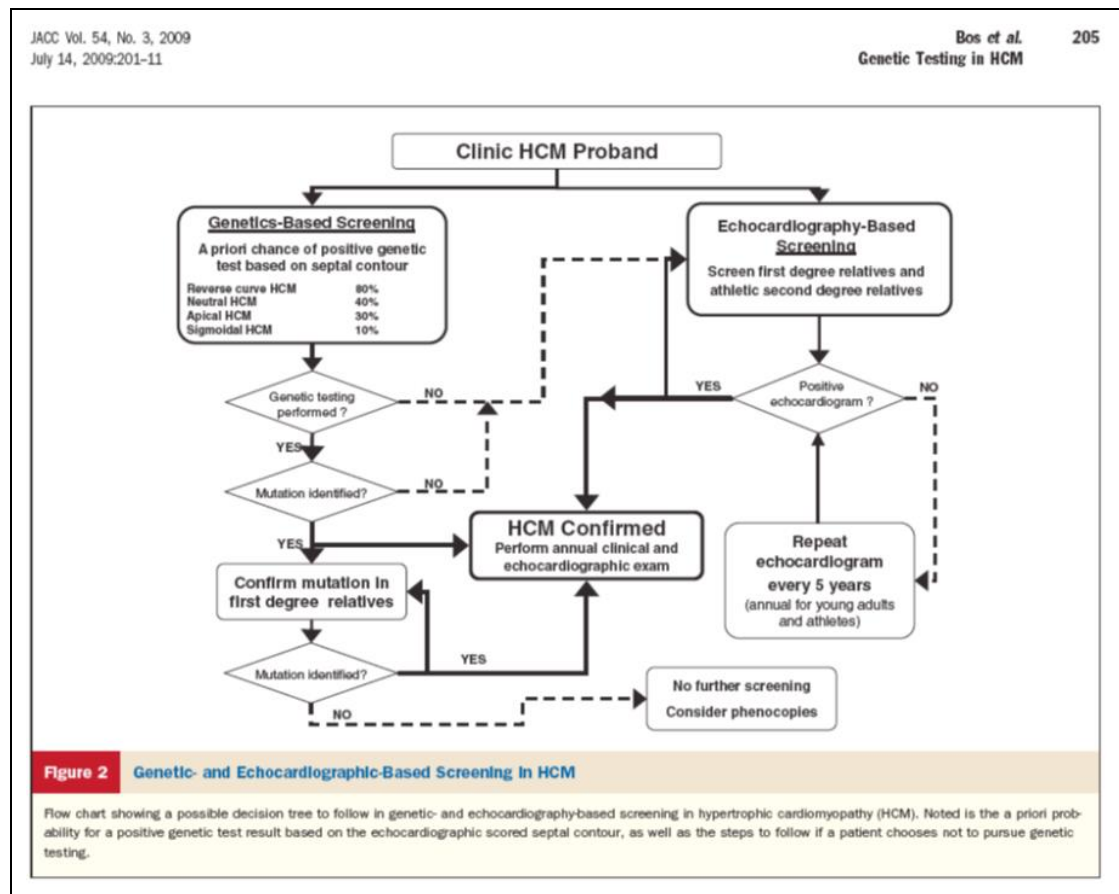
- Sen-Chowdhry S, Syrris P, Pantazis A, Quarta G, McKenna WJ, Chambers JC. Mutational heterogeneity, modifier genes, and environmental influences contribute to phenotypic diversity of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3(4):323-30.
- Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 2013;34(7):1035-42.
- Spencer CT, Bryant RM, Day J, Gonzalez IL, Colan SD, Thompson WR, et al. Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome. *Pediatrics* 2006;118(2):e337-46.
- Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, et al. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8089-98.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, et al. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004;119(1):19-31.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;102(10):1178-85.
- Sunsaneewitayakul B, Yao Y, Thamaree S, Zhang S. Endocardial mapping and catheter ablation for ventricular fibrillation prevention in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2012;23(Suppl 1):S10-6.
- Swope D, Li J, Radice GL. Beyond cell adhesion: the role of armadillo proteins in the heart. *Cell Signal* 2013;25(1):93-100.
- Syrris P, Ward D, Evans A, Asimaki A, Gandjbakhch E, Sen-Chowdhry S, McKenna WJ. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet* 2006;79(5):978-84.
- Teekakirikul P, Kelly MA, Rehm HL, Lakdawala NK, Funke BH. Inherited cardiomyopathies: molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era. *J Mol Diagn* 2013;15(2):158-70.
- Teer JK, Bonnycastle LL, Chines PS, Hansen NF, Aoyama N, Swift AJ, et al. Systematic comparison of three genomic enrichment methods for massively parallel DNA sequencing. *Genome Res* 2010;20(10):1420-31.
- Tester DJ et Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(2):240-6.
- Tester DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC, Ackerman MJ. Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing. *Heart Rhythm* 2006;3(7):800-5.
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 2001;10(3):189-94.

- Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, et al. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000;106(5):655-62.
- Umbarger MA, Kennedy CJ, Saunders P, Breton B, Chennagiri N, Emhoff J, et al. Next-generation carrier screening. *Genet Med* 2014;16(2):132-40.
- Van Berlo JH, de Voogt WG, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, Bonne G, Yaou RB, et al. Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: Do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? *J Mol Med (Berl)* 2005;83(1):79-83.
- Van Bon BW, Gilissen C, Grange DK, Hennekam RC, Kayserili H, Engels H, et al. Cantu syndrome is caused by mutations in ABCC9. *Am J Hum Genet* 2012;90(6):1094-101.
- Van Norstrand DW, Valdivia CR, Tester DJ, Ueda K, London B, Makielski JC, Ackerman MJ. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007;116(20):2253-9.
- Van Spaendonck-Zwarts KY, van Rijsingen IA, van den Berg MP, Lekanne Deprez RH, Post JG, van Mil AM, et al. Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: Overview of 10 years' experience. *Eur J Heart Fail* 2013;15(6):628-36.
- Van Spaendonck-Zwarts KY, van Hessem L, Jongbloed JD, de Walle HE, Capetanaki Y, van der Kooi AJ, et al. Desmin-related myopathy. *Clin Genet* 2011;80(4):354-66.
- Vasile VC, Ommen SR, Edwards WD, Ackerman MJ. A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(3):998-1003.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, et al. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006;114(20):2104-12.
- Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, et al. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(11):2014-27.
- Waldmuller S, Erdmann J, Binner P, Gelbrich G, Pankuweit S, Geier C, et al. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: Results from the German Competence Network Heart Failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13(11):1185-92.
- Wang H, Li Z, Wang J, Sun K, Cui Q, Song L, et al. Mutations in NEXN, a Z-disc gene, are associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2010;87(5):687-93.
- Ware JS, Roberts AM, Cook SA. Next generation sequencing for clinical diagnostics and personalised medicine: implications for the next generation cardiologist. *Heart* 2012;98(4):276-81.
- Ware SM et Jefferies JL. New genetic insights into congenital heart disease. *J Clin Exp Cardiol* 2012;S8.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, et al. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008;118(6):2260-8.

- Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 2011;364(17):1643-56.
- Wichter T, Borggrefe M, Haverkamp W, Chen X, Breithardt G. Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease. Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia. *Circulation* 1992;86(1):29-37.
- Wilde AA et Behr ER. Genetic testing for inherited cardiac disease. *Nat Rev Cardiol* 2013;10(10):571-83.
- Wilde AA et Bezzina CR. Genetics of cardiac arrhythmias. *Heart* 2005;91(10):1352-8.
- Wooderchak-Donahue WL, O'Fallon B, Furtado LV, Durtschi JD, Plant P, Ridge PG, et al. A direct comparison of next generation sequencing enrichment methods using an aortopathy gene panel- clinical diagnostics perspective. *BMC Med Genomics* 2012;5:50.
- Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, et al. alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1(3):193-201.
- Yang Y, Liang B, Liu J, Li J, Grunnet M, Olesen SP, et al. Identification of a Kir3.4 mutation in congenital long QT syndrome. *Am J Hum Genet* 2010;86(6):872-80.
- Zaragoza MV, Arbustini E, Narula J. Noncompaction of the left ventricle: Primary cardiomyopathy with an elusive genetic etiology. *Curr Opin Pediatr* 2007;19(6):619-27.
- Zimmerman RS, Cox S, Lakdawala NK, Cirino A, Mancini-DiNardo D, Clark E, et al. A novel custom resequencing array for dilated cardiomyopathy. *Genet Med* 2010;12(5):268-78.
- Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *J Am Coll Cardiol* 2006;48(5):e247-346.

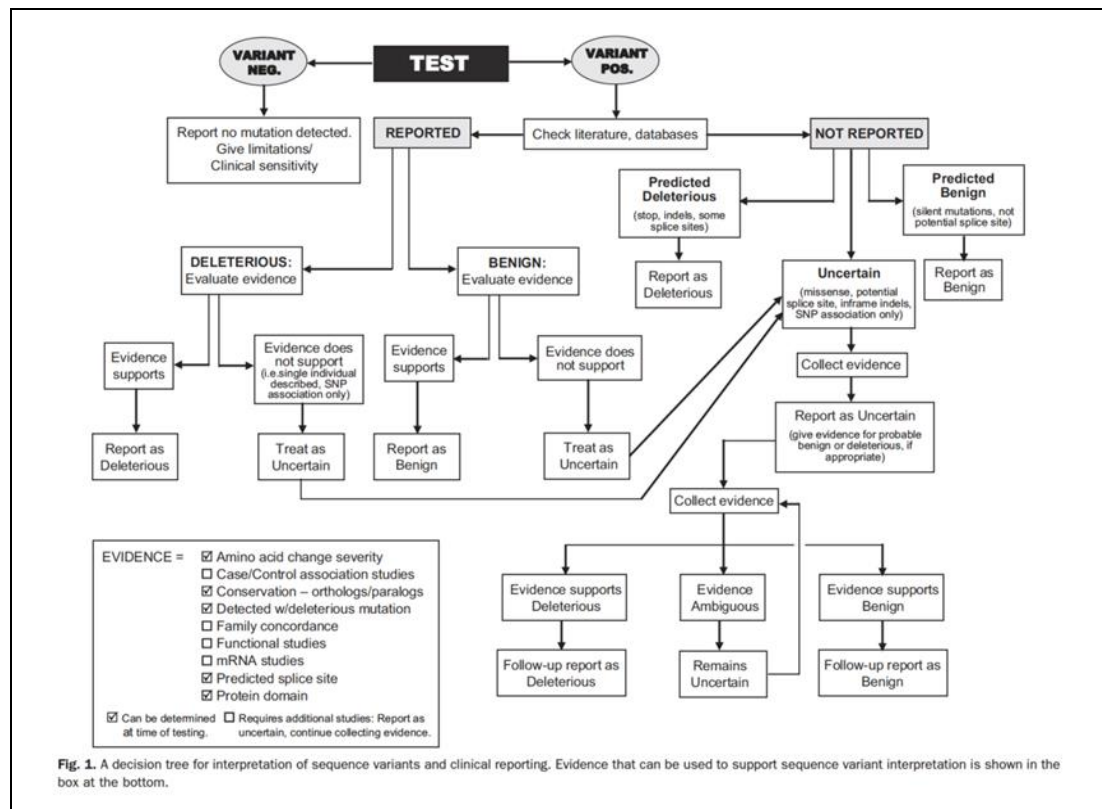
ANNEXE A

Prise en charge des cardiopathies hypertrophiques repérées en clinique (selon Bos *et al.*, 2009)



ANNEXE B

Algorithme illustrant l'interprétation et la caractérisation des variants de séquences (selon Richards *et al.*, 2008)



QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN – RECHERCHE DE MUTATIONS (RÉFÉRENCE 2013.03.011)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeurs : CSSS de Chicoutimi – CHA régional

1.2 Date de transmission des demandes d'examen au MSSS

- 3 et 27 septembre 2013 : analyse qualitative par amplification multiple suivie de la détection des mutations par hybridation spécifique directe des amplicons.
- 29 janvier 2014 : nouvelle technique proposée, soit l'analyse par amplification suivie de la détection des mutations par hybridation spécifique directe des amplicons (technologie TaqMan®).

1.3 Date de réception des demandes à l'INESSS : 1^{er} novembre 2013 et 30 janvier 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juin 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

Le dépistage de quatre maladies récessives au Saguenay–Lac-Saint-Jean, soit l'acidose lactique congénitale (ALC-SLSJ), la tyrosinémie héréditaire de type I (TH1), la neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux (NSM/ACC) et l'ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) effectué à l'aide de la technologie TaqMan® qui permet de déterminer la présence ou l'absence d'un allèle muté correspondant à l'une de ces quatre maladies. Cinq mutations sont recherchées pour les quatre maladies, l'ARSACS ayant deux mutations qui lui sont propres.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

« L'amplification des régions génétiques abritant les cinq mutations ciblées est assurée par la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Une réaction d'amplification est nécessaire pour chaque mutation. La détection des amplicons ainsi générés est assurée par l'utilisation de sondes spécifiques (sic) de type TaqMan® (Life Technologies/Applied Biosystems) à chacun des 10 allèles possibles. Une fois l'amplification complétée, les échantillons sont analysés à l'aide d'un thermocycleur en temps réel ABI 7500Fast (Life Technologies), qui mesure la fluorescence émise pour chacune des 10 sondes. L'hybridation ou non d'un amplicon sur chacune des 10 sondes détermine la présence ou l'absence de

fluorescence. Cette analyse s'appuie sur le principe d'appariement des bases de Watson et Crick et est hautement spécifique. Ce principe est largement utilisé en génétique moléculaire » (Formulaire des requérants : précisions sur les gènes et la technique).

Cette technique de PCR avec sonde d'hydrolyse (ou essai TaqMan®) est un système polyvalent et individualisé d'analyse de polymorphismes de gènes, car il est possible de faire synthétiser par la compagnie des amorces et des sondes de son cru ou de faire préparer un essai sur mesure. Ainsi, il sera facile de discriminer, par fluorescence, de façon automatisée et rapide, les allèles naturels de ceux porteurs d'une mutation. Un bulletin de Life Technologies, TaqMan® SNP genotyping assays [Life Technologies, 2011] décrit la technologie qui est aussi rapportée dans la littérature [De Kok *et al.*, 2002]. L'annexe A présente une brève description de la technologie (par Nathalie Girard) et son illustration (Life Technologies).

2.3 Société ou développeur

Technique maison. Élaboration locale par suite d'une étude pilote qui a débuté en 2009 et s'est terminée en 2012, de concert avec le Centre hospitalier universitaire de Québec (CHUQ). Le demandeur a fourni un protocole opératoire normalisé.

2.4 Valeur pondérée : 28,3 avec l'ancienne technologie et 23,0 avec la technologie TaqMan®.

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

3.1 Patients ciblés

La détection des mutations de quatre maladies récessives au Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) vise les personnes habitant le SLSJ, qui ont au moins un grand-parent né au Saguenay–Lac-Saint-Jean, dans Charlevoix ou dans la région de la Haute-Côte-Nord.

Cette analyse s'adresse spécialement aux personnes et aux couples dont la femme est enceinte depuis moins de 14 semaines ou aux couples qui ont 18 ans et plus et qui désirent avoir des enfants.

3.2 Description de la maladie visée

Le tableau 1 présente les faits saillants et caractéristiques des quatre maladies dépistées. Les abréviations utilisées sont décrites à l'annexe B.

Tableau 1 Faits saillants et caractéristiques des 4 maladies

NOM DE LA MALADIE	ACIDOSE LACTIQUE CONGÉNITALE DE TYPE SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN	TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE CONGÉNITALE DE TYPE I (PROPRE AU SLSJ)	NEUROPATHIE SENSITIVOMOTRICE AVEC OU SANS AGÉNÉSIE DU CORPS CALLEUX	ATAXIE RÉCESSIVE SPASTIQUE AUTOSOMIQUE DE CHARLEVOIX-SAGUENAY
Acronyme	ALC SLSJ	HT1 – TH1	NSM/ACC	ARSACS
Numéro Orphanet	70472	882	14059	98
Prévalence mondiale	Inconnue	1/120 000 [Bergeron <i>et al.</i> , 2001]	Très rare (2 cas)	Inconnue
Prévalence au SLSJ	1/2 000 naissances	1/1 846 [Bergeron <i>et al.</i> , 2001]	1/2 117 naissances	1/1 932 naissances
Porteurs au SLSJ	1/23	1/20 [Bergeron <i>et al.</i> , 2001]	1/23	1/22
Enzyme	Déficiencia en COX	Déficiencia en FAH		
Gène	<i>LRPPRC</i>	<i>FAH</i>	<i>SLC12A6</i>	<i>SACS</i>
Mutations	c.1061C>T (p.Ala354Val) (> 95 %) c.3830_3839delins10 (p.C1277Xdel8)	Effet fondateur : c.1062+5G>A (IVS12+5G>A) mutation d'épissage (<i>splice mutation</i>)	Exon 18 : c.2436delG (> 99 %) Exon 11 : c.1584_1585delCTinsG (1 cas)	c.6594delT (96 %) c.5254C>T
Chromosome	2p21	15q23-25	15q14 (localisé en 1996, identifié en 2002)	13q11
Protéine	LRPPRC (2003, 4, 6)		Encore inconnue	SACSIN
Type de maladie	Maladie métabolique mitochondriale	Erreur innée du métabolisme des AA	Type de dystrophie musculaire due à une dégénérescence des nerfs périphériques : mouvements du corps, perception et sensation perturbés	Maladie neurodégénérative caractérisée par une ataxie cérébelleuse précoce, une spasticité et une neuropathie périphérique

NOM DE LA MALADIE	ACIDOSE LACTIQUE CONGÉNITALE DE TYPE SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN	TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE CONGÉNITALE DE TYPE I (PROPRE AU SLSJ)	NEUROPATHIE SENSITIVOMOTRICE AVEC OU SANS AGÉNÉSIE DU CORPS CALLEUX	ATAXIE RÉCESSIVE SPASTIQUE AUTOSOMIQUE DE CHARLEVOIX-SAGUENAY
Diagnostic génétique et autre	Mutation Ala354Val, surtout lactate dans le sang ou le liquide céphalorachidien (LCR) Activité COX mesurée dans les fibroblastes	Mutation d'épissage (<i>splice mutation</i>) IVS12+5G>A Urine : acide delta aminolévulinique Urine : succinylacétone	Mutation unique Examen neurologique, imagerie par résonance magnétique (IRM), électromyogramme (EMG)	2 mutations génétiques IRM, tomodensitométrie (TDM) + examen neurologique
Manifestations	Forme néonatale : crise acidose lactique Forme classique : 0 à 24 mois, acidose lactique grave, démarche ataxique Forme dite des survivants : hypotonie, asthénie, retard du développement, démarche ataxique	Forme infantile précoce (0 à 5 mois) : nécrose hépatocellulaire avec vomissements, diarrhée, hypoglycémie, œdème et tubulopathie rénale Forme tardive : rachitisme vitamino-résistant, polynévrite, dystonie, hépatomes malins fréquents	< 1 an : manque de force musculaire, retard du développement moteur Puis : perte de la mobilité, déformations des membres, retard intellectuel	12 à 18 mois : démarche difficile, dysarthrie, nystagmus, syndrome pyramidal, perturbation de la sensibilité profonde
Traitements	Pas propre à la maladie (régime alimentaire spécial, toute la journée)	Nitisinone (NTBC) Transplantation hépatique	Incurable (décès entre 29 et 33 ans) Soutien, confort	Traitement symptomatique, physiothérapie, fauteuil roulant jusqu'à 50-60 ans

3.2.1 Acidose lactique congénitale type Saguenay–Lac-Saint-Jean

L'acidose lactique congénitale particulière au Québec fait partie d'une catégorie de maladies appelée encéphalopathie ou maladie de Leigh. D'autres noms sont utilisés dans la littérature : maladie de Leigh de type canadien-français, syndrome de Leigh de type Saguenay–Lac-Saint-Jean, déficience en cytochrome c oxydase de type canadien-français [Morin, 2011].

La prévalence mondiale est inconnue. Au Saguenay–Lac-Saint-Jean, la maladie atteint une naissance sur 2 000, alors qu'une personne sur 23 serait porteuse de la mutation génétique en particulier (tableau 1).

En 2003, la cause génétique de l'acidose lactique, propre à la région, a été découverte sur le chromosome 2; il s'agit du gène *LRPPRC* (*leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein*).

En 2004, il a été confirmé que le gène *LRPPRC* muté réduit la production de cytochrome c oxydase (COX) et cause l'accumulation de l'acide lactique dans le sang. En 2006, le rôle de cette protéine dans les mitochondries a été découvert. Dans plus de 95 % des cas, il s'agit de la mutation A354V sur le chromosome 2(2p21). La maladie se caractérise par une acidose métabolique chronique, une hypotonie, une dysmorphie faciale (proéminence du front, insertion basse des cheveux, hypertélorisme, et sourcils de forme arquée, entre autres) ainsi que par un retard de développement psychomoteur et une déficience intellectuelle modérée. Le risque de déclenchement d'une crise métabolique acidotique lors d'une infection, d'un exercice physique violent, d'un jeûne prolongé ou d'un stress psychologique intense constitue une particularité de l'acidose lactique du SLSJ. En effet, l'accumulation sanguine d'acide lactique diminue le pH sanguin; l'enfant se met alors à compenser l'acidémie en respirant très profondément et en hyperventilant. Il peut alors tomber dans un coma et présenter un œdème pulmonaire [Ouellette, 2008].

Le diagnostic de la maladie se fait habituellement entre 0 et 4 ans. L'acidose lactique du SLSJ se présente sous trois formes qui correspondent à des niveaux différents de gravité : 1) la forme néonatale comprend des crises acidotiques fulminantes; 2) la forme classique peut survenir dès la naissance par une acidose lactique grave ou se manifester par une démarche ataxique entre 14 et 24 mois; 3) la forme dite « des survivants », ayant survécu à plusieurs crises, présente à des degrés divers de l'hypotonie, une asthénie, un retard du développement et plus tard, une ataxie du tronc et une démarche assez caractéristique. Aucun traitement particulier n'existe pour soigner cette condition et il est suggéré aux personnes atteintes de prendre de multiples repas durant la journée afin de réduire les fortes demandes énergétiques de la digestion [Morin, 2011].

Le diagnostic définitif est effectué au moyen du test génétique qui détecte la mutation caractéristique. Il est aussi possible de mesurer la concentration de lactate dans le sang ou le liquide céphalorachidien. Finalement, l'activité enzymatique de la COX peut être mesurée dans les fibroblastes (tableau 1).

3.2.2 Tyrosinémie congénitale héréditaire de type I (TH 1), propre au Saguenay–Lac-Saint-Jean

La tyrosinémie héréditaire de type 1 est une maladie métabolique résultant d'un déficit en fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), dernière enzyme en cause dans le catabolisme de la tyrosine. L'expression de cette enzyme s'effectue principalement dans le foie et les reins, ce qui explique le fait que les conséquences pathologiques surviennent principalement dans ces deux tissus [AETMIS, 2007].

Depuis 1970, au Québec, la TH 1 fait partie du programme de dépistage néonatal sanguin, mais n'était pas recherchée chez les parents, ni les adultes à plus haut risque.

Selon Bergeron et ses collaborateurs [2001], la prévalence globale de la tyrosinémie congénitale héréditaire de type I est de 1/120 000 naissances. Cependant, la prévalence est beaucoup plus élevée au Saguenay–Lac-Saint-Jean, où près de 1 nouveau-né sur 1 846 est atteint et une personne sur 20 serait porteuse (tableau 1). La très haute prévalence dans cette région serait due à un effet fondateur, surtout à une mutation particulière dans l'intron 12 (IVS12+5G>A-splice mutation) qui représenterait 95 % des mutations [Bergeron *et al.*, 2001].

Le gène *FAH* est localisé sur la région q23 – q25 du chromosome 15 (tableau 1).

Deux formes cliniques (aiguë et chronique) ont été décrites. La forme aiguë, plus grave, représente la majorité des cas, et apparaît entre deux semaines et trois mois, mais souvent dans les premières heures de vie. Il s'agit d'une maladie rapidement progressive et grave du foie (nécrose hépatocellulaire) et de dysfonction rénale tubulaire. La défaillance hépatique se manifeste par des vomissements, de la diarrhée, de l'ictère, de l'hypoglycémie, de l'œdème et de l'ascite ainsi que par des anomalies de la coagulation [Grompe, 2014; De Lonlay, 2007]. Une détérioration rapide est souvent observée, s'accompagnant d'un décès précoce. Quant à la forme chronique, elle comprend une cirrhose mixte (micronodulaire et macronodulaire) couplée à un risque élevé de carcinome hépatocellulaire, et jusqu'à 37 % des patients de plus de deux ans en sont atteints [Grompe, 2014]. La maladie peut aussi débuter tardivement par un rachitisme hypophosphatémique ou même, un rachitisme vitamino-résistant lié à la tubulopathie [De Lonlay, 2007]. Des manifestations neurologiques très graves sont fréquentes lorsque le traitement est sous-optimal, qui augmenteront la mortalité et la morbidité; il s'agit ici de crises neurologiques, similaires aux crises de porphyrie neuropathique, caractérisées par des douleurs intenses s'accompagnant d'une hypertonie des extenseurs, de vomissements, d'iléus paralytique, de faiblesse musculaire et d'automutilation [Grompe, 2014].

Le diagnostic définitif se confirme par l'identification génétique de la mutation quand elle est connue ou soupçonnée. Une mutation fondatrice explique la haute prévalence dans la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean (tableau 1). Par ailleurs, le diagnostic est confirmé par la mise en évidence de l'acide aminolévulinique dans les urines, alors que la chromatographie en phase gazeuse des urines montre la présence de la succinylacétone caractéristique. Un dosage enzymatique sur fibroblastes est également possible [De Lonlay, 2007].

Antérieurement, le traitement reposait essentiellement sur un régime alimentaire très strict, pauvre en tyrosine, phénylalanine et méthionine. Actuellement, le traitement pharmacologique s'appuie sur la prise d'un inhibiteur de l'enzyme hydroxyphénylpyruvate dioxygénase, agissant en amont de la FAH [AETMIS, 2007]. Ce médicament, appelé nitisinone ou NTBC (2-(2-nitro-4- trifluorométhylbenzoyl)-1, 3-cyclohexanédione), existe depuis 2005 et a permis une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de tyrosinémie congénitale héréditaire de type I, lorsqu'il est associé au régime alimentaire strict et à la surveillance rigoureuse de l'évolution de la maladie [De Laet *et al.*, 2013]. La transplantation hépatique peut être offerte en cas de complications ou de réponse thérapeutique insuffisante [Grompe, 2014; De Lonlay, 2007].

3.2.3 Neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux

La neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux (NSM/ACC) est une maladie neuromusculaire évolutive qui touche en grande majorité les personnes originaires du Saguenay–Lac-Saint-Jean et de Charlevoix [Dystrophie musculaire Canada, 2013].

La NSM/ACC provoque rapidement la dégénérescence progressive des nerfs périphériques responsables des mouvements du corps et de la perception des sensations (tableau 1). Des anomalies décelées au cerveau concernent le corps calleux, structure séparant les deux hémisphères cérébraux. Celui-ci est complètement absent chez 57,8 % des personnes atteintes, partiellement absent chez 9,4 % des sujets et normalement présent chez 32,8 % d'entre eux [Dystrophie musculaire Canada, 2013].

La prévalence mondiale de la maladie est excessivement faible; il y aurait quatre cas rapportés ailleurs, en Italie (deux) et en Turquie (deux). Dans la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean, la prévalence est de 1 sur 2 117 naissances, alors qu'une personne sur 23 serait porteuse du gène récessif [Dupré *et al.*, 2014].

La NSM/ACC est causée par une mutation du gène *SLC12A6* (c.2436delG), exon 18 sur le chromosome 15. Un cas rapporte la mutation c.1584_1585delCTinsG sur l'exon 11 du même chromosome. En 2002, des chercheurs québécois ont isolé la mutation c.2436delG sur l'exon 18, présente dans plus de 99 % des cas [Dupré *et al.*, 2003].

Les manifestations cliniques de la NSM/ACC apparaissent peu après la naissance ou dans la première année de vie par un manque de force musculaire et un retard du développement moteur (fait de se tenir la tête, de s'asseoir, de se tenir debout et de commencer à marcher). La maladie évolue progressivement et entraîne une perte de la mobilité ainsi que des déformations de la colonne vertébrale, des mains et des pieds. Un retard intellectuel léger à modéré est présent chez les personnes atteintes qui nécessitent un enseignement spécialisé dès la 2^e ou 3^e année du primaire. Le diagnostic repose sur l'identification de la mutation génétique, les manifestations cliniques, les examens neurologiques, l'imagerie cérébrale (IRM, TDM) et l'EMG [Dupré *et al.*, 2014].

La maladie est incurable. L'enfant commencera à marcher vers 3,8 ans, cessera de marcher vers 13,8 ans, nécessitera souvent une chirurgie correctrice des déformations thoraciques, de la physiothérapie, et un soutien important en raison de la perte progressive de son autonomie [Dystrophie musculaire Canada, 2013]. L'âge moyen du décès chez les personnes atteintes de neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux est de 33 ans [Dupré *et al.*, 2014].

3.2.4 Ataxie récessive spastique autosomale de Charlevoix–Saguenay

L'ataxie récessive spastique autosomale de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) est une maladie neurologique évolutive précoce propre aux personnes originaires des régions de Charlevoix et du Saguenay–Lac-Saint-Jean ainsi que chez les personnes dont les ancêtres sont issus de ces régions.

L'ARSACS est une maladie neurodégénérative caractérisée par une ataxie cérébelleuse précoce accompagnée de spasticité, d'un syndrome pyramidal et d'une neuropathie périphérique (tableau 1). La maladie survient entre l'âge de 12 et 18 mois où les sujets atteints présentent une démarche altérée et de la difficulté à marcher [Fontaine, 2008]. Les autres signes précoces de l'ataxie cérébelleuse comprennent une dysarthrie (difficulté à prononcer les mots) et un nystagmus. Les enfants ont de la difficulté à exécuter des travaux

manuels et à écrire à l'âge scolaire ainsi qu'à pratiquer des sports comme le vélo, le ski et le patin [Dystrophie musculaire Canada, 2007]. Par la suite, la difficulté à marcher et à effectuer des activités nécessitant des habiletés manuelles augmentera progressivement à l'adolescence; ainsi, le jeune adulte devra souvent utiliser une canne pour se déplacer et aura besoin d'un fauteuil roulant vers l'âge de 30 ans [Dystrophie musculaire Canada, 2007].

La prévalence mondiale de l'ARSACS est inconnue, mais des cas similaires ont été rapportés en Turquie, au Japon, en Hollande, en Italie, en Belgique, en France et en Espagne [Fontaine, 2008]. Ces cas présentent cependant un âge d'apparition variable et plus tardif qu'au Québec. Dans la région de Charlevoix-Saguenay, l'incidence à la naissance a été estimée à 1 sur 1 932, alors qu'une personne sur 22 serait porteuse du gène [Fontaine, 2008; Mercier *et al.*, 2001].

L'ARSACS est due à des mutations du gène SACS sur le chromosome 13 (13q11) codant pour une grande protéine nommée SACSIN, dont la fonction est encore inconnue (tableau 1).

La structure de la SACSIN a récemment été décrite [Kozlov *et al.*, 2011]. Puis, une autre découverte a montré que la SACSIN est localisée dans les mitochondries des cellules non neuronales et dans les neurones primaires et interagit avec une autre protéine dans la fission mitochondriale. Par conséquent, une dysfonction mitochondriale pourrait expliquer ce qui cause l'ARSACS sur le plan cellulaire [Girard *et al.*, 2012]. Deux mutations ont été rapportées dans les familles de la région de Charlevoix-Saguenay : c.6594delT (96 % des cas) et c.5254C>T chez deux familles [Mercier *et al.*, 2001]. Il est à noter qu'avec un nombre grandissant de cas d'ARSACS, dans le monde, au moins une douzaine d'autres mutations ont été découvertes, ce qui explique peut-être la grande variabilité d'expressions cliniques et de gravité de la maladie, lorsque celle-ci est rapportée à l'extérieur du Québec [Thiffault *et al.*, 2013].

Le diagnostic clinique de l'ataxie récessive spastique autosomale de Charlevoix-Saguenay se fait généralement à un jeune âge et repose sur les résultats des examens de neuroimagerie (IRM, TDM) et sur les examens neurophysiologiques. L'examen de la rétine montre une hypermyélinisation des fibres nerveuses rétinienne, sans perte de vision, systématique [Fontaine, 2008].

La maladie évolue très lentement et l'espérance de vie des personnes atteintes est de 60 à 70 ans. La prise en charge se doit d'être évolutive selon la variabilité de leurs besoins et l'évolution de leur état : ceci comprend entre autres la prévention de la spasticité dès le jeune âge, la physiothérapie, la pharmacothérapie et le recours aux orthèses plantaires et de cheville [Fontaine, 2008; Dystrophie musculaire Canada, 2007].

3.3 Nombre de patients visés

Le test de dépistage s'adresse à tous les adultes de 18 ans et plus qui désirent éventuellement avoir un enfant, qui habitent le Saguenay–Lac-Saint-Jean ou qui ont un parent né dans cette région, dans la région de Charlevoix ou de la Haute-Côte-Nord. De plus, ce test peut être effectué chez tous les couples où la femme est enceinte depuis moins de 14 semaines.

Au Québec, il est estimé que 7 000 personnes par année passeront un test de dépistage, dont 5 000 au Saguenay–Lac-Saint-Jean.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Tous les professionnels de santé concernés dans les suivis prénataux qui s'occupent des couples où la femme est en cours de grossesse dont les infirmières en soins prénataux, les médecins obstétriciens (médecins de famille et spécialistes), les pédiatres et les conseillers en génétique doivent être impliqués dans ce dépistage.

Par ailleurs, les médecins de famille, les pédiatres et les professionnels de la santé spécialisés en dépistage génétique devraient s'impliquer dans le dépistage des enfants et des adultes.

3.5 Modalités d'administration du test

Selon la procédure opératoire normalisée (PON), il s'agit d'effectuer un prélèvement sanguin sur papier buvard du Réseau de médecine génétique appliquée du Québec (RMGA).

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Cette analyse n'est pas inscrite dans le *Répertoire*, mais a fait l'objet d'un projet pilote de dépistage génétique parrainé par le MSSS et l'ASSS 02, depuis 2009.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Il s'agit d'un dépistage simultané de quatre maladies génétiques récessives autosomales au moyen de la technique de PCR de type TaqMan® (annexe A).

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La technologie comporte des avantages : grande simplicité, précision et rapidité de réalisation. Par ailleurs, la valeur pondérée est réduite de cinq unités par test comparativement à l'ancienne technologie de panel multiplex.

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 par un autre test

Il s'agit de l'introduction d'un nouveau test suite à une étude pilote entreprise en mars 2009. Le panel multiplex sur plateforme Luminex mis au point pour les besoins du projet pilote a été remplacé récemment par la technique de PCR quantitative de type TaqMan® (Life Technologies).

Cette dernière technologie présente des avantages : spécificité, rapidité, simplicité d'exécution et coût moindre.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

De fait, il s'agit d'un test de dépistage propre à quatre maladies autosomales récessives qui permettra d'établir le statut de porteur d'une (ou de plusieurs) de ces maladies. Quelle que soit la maladie, dans ces régions spécifiques, le statut de porteur se rencontre chez 1 sur 20 à 1 sur 23 personnes, alors qu'un enfant sur 2 000 environ est atteint.

Chacune de ces quatre maladies est grave, débilitante et a un pronostic très sombre en matière de mortalité ou de morbidité.

L'identification du statut de porteur permettra un conseil génétique adéquat, que ce soit avant la grossesse ou au cours du premier trimestre de grossesse.

5.1.3 Valeur thérapeutique : sans objet.

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			

Sensibilité (Se) et spécificité (Sp)

Pour évaluer la sensibilité et la spécificité, un nombre important de porteurs d'une mutation doit être testé, ce qui peut s'avérer difficile dans le cas de mutations plus rares. Tel que l'indique le rapport d'étape du 19 octobre 2009, « il fallait valider 92 porteurs sans aucune discordance pour être certain à 95 % que la sensibilité et la spécificité est supérieure ou égale à 0,95 ». Pour les mutations les plus fréquentes, de 84 (acidose lactique) à 106 porteurs ont été détectés (plus de 92 pour la tyrosinémie, la polyneuropathie et la première mutation de l'ARSACS) (tableau 2).

Comme aucun résultat discordant n'a été trouvé, « la sensibilité et la spécificité peuvent être évaluées avec confiance à 100 % pour la tyrosinémie, la polyneuropathie et la première mutation de l'ARSACS, très élevée pour l'acidose lactique et la deuxième mutation causant l'ARSACS » (Rapport final du 17 mai 2013; document non publié).

Tableau 2 Évaluation du projet pilote des quatre maladies héréditaires récessives du Saguenay–Lac-Saint-Jean

ANNÉE	ÉCHANTILLONS	SÉRIES	TECHNIQUE	CONCORDANCE	SE	SP	REPRISES PONCTUELLES	REPRISES COMPLÈTES	DÉLAIS 5-10-20 JOURS ¹
2009	1 755 (n = 351)	27	Multiplex sur plateforme Luminex	100 % (-1) ²	< n ³	<n	10 %	> 50 %	7 à 13 13 n. d.
2010	-	-	Multiplex	100 %	<n	<n	-	3 périodes : 13 %, 27 % et 7 %	-
2013 (total) (03/09-11/12)	2 866	86	Multiplex	100 %	100 % ⁴	100 % ⁴	5 %	12,8 %	5 5,7 5,9
2014	2 400	-	TaqMan®	100 %	-	-	0,4 %	1,0 %	-

Abréviations : n : nombre de patients chez qui les cinq mutations des quatre maladies ont été testées; n. d. : non disponible; Se : sensibilité; Sp : spécificité.

1 Délais : délais entre l'arrivée du papier buvard au laboratoire et la validation des résultats par l'équipe médicale de Québec, selon le statut : 1) « urgent » (5 jours) (spécimen prénatal : 13 - 16 semaines); 2) « stat » (10 jours) (spécimen prénatal < 13 semaines); 3) de « routine » (20 jours) (spécimen préconceptionnel).

2 Concordance : durant 2 ans, comparaisons entre les résultats obtenus au laboratoire local et les résultats obtenus au CHUQ et au CHU Sainte-Justine (10 échantillons envoyés et reçus dont au moins un porteur de chacune des mutations et un non-porteur (-1 : polymorphisme rare).

3 < n : taille de l'échantillon insuffisante.

4 Sensibilité et spécificité à 100 % pour la tyrosinémie, la polyneuropathie et la première mutation de l'ataxie spastique (en raison d'un nombre suffisant détecté d'au moins 92 porteurs; en fait, 106 porteurs ont été détectés quant à ces 3 mutations). Seulement 84 porteurs ont été détectés quant à l'acidose lactique et 16, relativement à la deuxième mutation de l'ataxie spastique, ce qui suggère une sensibilité et une spécificité « très élevées », selon le rapport final du 17 mai 2013.

Les auteurs ajoutent cependant que « la performance du test en multiplex se compare probablement aux techniques traditionnelles puisqu’aucune discordance n’a été notée à ce jour. Cependant, une estimation de la sensibilité et de la spécificité des techniques traditionnelles n’a pas été publiée, ce qui empêche de comparer avec précision la performance des différentes approches analytiques » (Rapport final du 17 mai 2013).

À noter que la validation clinique médicale a été effectuée avec trois médecins biochimistes du CHUQ.

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	
Corrélation entre test et comparateur		X	
Autre test	X		

Le dépistage de quatre maladies récessives autosomales du Saguenay–Lac-Saint-Jean a fait l’objet d’un projet pilote qui a vu le jour en mars 2009 et qui s’est terminé le 30 novembre 2012. La technologie consistait en un panel multiplex sur une plateforme Luminex. La validation technique a donc été effectuée surtout à l’aide de cette méthode. Certaines difficultés techniques conduisant à un taux élevé de reprises complètes ont mené à l’adoption de la méthode de PCR avec sonde d’hydrolyse (TaqMan®) vers la fin de 2012 et en 2013. L’évaluation de la validation technique avec l’une sera donc rapportée plus brièvement qu’avec l’autre méthode.

Procédures opératoires normalisées

Le test de dépistage, conçu localement, a été planifié avec beaucoup d’attention d’après les avis d’audit externe et un rapport du Comité d’éthique de santé publique (projet pilote d’offre de tests de porteur. Document interne du projet pilote, 2006-2013). Deux rapports intermédiaires (2009-2010) et un rapport final (2013) font état des résultats de mises au point, de la performance et de validations techniques de ces analyses. De plus, des procédures opératoires normalisées (PON) dont la dernière mise à jour date du 23 septembre 2013 ont été élaborées et mises en application pour assurer un contrôle de la qualité approprié.

Contrôle de la qualité interne

Le contrôle de la qualité interne est effectué au niveau des réactifs, sur les prélèvements ou sur l’analyse des résultats des témoins et des échantillons. À chaque série d’analyses, il y a au moins un témoin négatif (ADN remplacé par de l’eau), un témoin non porteur, un porteur connu hétérozygote et si possible, un porteur connu homozygote.

Pour chaque nouveau test de trousse d’amorces et de sondes, l’analyse d’une série de 16 échantillons comprendra au moins 4 porteurs connus et un échantillon de référence négatif.

Contrôle de la qualité externe

Le contrôle de la qualité externe mis en place au début du projet pilote a été respecté. Ainsi, à 6 reprises, soit à tous les 3 mois pendant une période de 21 mois, 10 échantillons étaient envoyés au CHU Ste-Justine et au CHUQ, alors que le CSSS de Chicoutimi analysait 10 échantillons provenant de chacun de ces centres hospitaliers. Les 10 échantillons incluaient au moins un porteur pour chacune des 5 mutations et au moins un non-porteur. Ainsi, en 21 mois, 280 échantillons ont été envoyés et le CSSS de Chicoutimi en a reçu 160. La concordance était parfaite à 100 % (discordance : 0 %) (tableau 2).

Validation externe

La validation externe a été effectuée dans deux situations :

- 1) lorsque les deux conjoints sont porteurs d'une mutation dans le même gène, ce qui est arrivé à 19 reprises et a été confirmé dans 100 % des cas par les deux autres centres hospitaliers (Rapport final, 2013);
- 2) en cas de fluorescence atypique. Il y a eu 55 cas de fluorescence atypique pour la mutation p.A354V du gène de l'acidose lactique en raison d'un polymorphisme (rs4953042) situé à quelques nucléotides en aval de la mutation.

Ceci a été déterminé avec la technique TaqMan® élaborée à Chicoutimi (Rapport final, 2013). L'analyse faite avec la méthode de PCR multiplex a également obtenu de résultats non concluants à 2 reprises dans 79 cas. Ces cas ont été envoyés aux laboratoires de référence pour validation en raison de l'impossibilité d'obtenir un profil de fluorescence conforme pour une mutation avec la technique multiplex. Ceci devrait se corriger avec la nouvelle technologie TaqMan® (Rapport final, 2013).

Délais de résultats

Le respect du délai selon le statut du spécimen constituait une autre mesure de performance du laboratoire. Il s'agit du délai entre l'arrivée du papier buvard au laboratoire et la validation des résultats par l'équipe médicale de Québec selon le statut « urgent » (spécimen prénatal : 13 à 16 semaines), « stat » (spécimen prénatal < 13 semaines) et « de routine » (spécimen préconceptionnel). Ces délais étaient fixés à 5, 10 et 20 jours, respectivement.

Après 6 mois, le délai relatif au statut urgent était de 7 à 13 jours au lieu de 5 jours et il était de 13 jours plutôt que de 10 jours quant au statut « stat ». Les délais se sont prolongés en raison de problèmes techniques qui ont forcé la reprise complète d'une série d'analyses (Rapport intérimaire 1, 2009; tableau 2).

Néanmoins, le problème semblait résolu vers la fin du projet pilote où les délais étaient à peu près tous de 5 jours, quel que soit le statut du prélèvement (Rapport final, 2013; tableau 2).

Reprises d'analyses

Le premier rapport de 2009 fait état de reprises de tests pour un participant (reprises ponctuelles) de 10 % du total des échantillons, ce qui était conforme aux attentes lors de l'initiation du projet pilote. Les reprises complètes de toute une série de tests ont été plus importantes que prévues et dans 60 % des cas, elles étaient attribuables à des résultats non conformes des témoins négatifs. Il y a eu 10 reprises des analyses faites au moyen de la technique de PCR et 5 reprises de celles sur plateforme Luminex (Rapport intérimaire 1, 2009).

Le deuxième rapport de 2010 montre, à nouveau, des taux élevés et inconstants de reprises complètes variant entre 13 %, 27 % et 7,3 % après plusieurs modifications (tableau 2, Rapport préliminaire II, 2010).

Le rapport final cumulatif (2013) fait état de 143 reprises ponctuelles sur les 2 886 échantillons, ce qui représente un taux de 5 %, alors que 11 séries sur les 86 des 2 années du projet pilote ont dû être reprises complètement (fréquence de 12,8 %) (tableau 2, Rapport final, 2013).

Cette fréquence élevée de reprises complètes a encouragé l'élaboration d'une méthodologie de remplacement, vers la fin de 2012. Depuis, près de 2 400 échantillons ont été évalués au moyen de la technologie TaqMan® et la fréquence de reprise obtenue s'est avérée exceptionnellement basse, soit 0,4 % en ce qui concerne les reprises ponctuelles et 1 % pour ce qui est des reprises complètes (lettre du 5 février 2014; tableau 2).

Technologie TaqMan®

La technologie TaqMan® a été conçue en parallèle par le requérant et, en date du 17 mai 2013, a été validée à plus de 75 % (Rapport final, 2013). Il est rapporté que cette technologie est déjà en place au CHU Ste-Justine.

Selon le requérant, les avantages sont nombreux : absence de la nécessité d'extraction de l'ADN, cycle complet d'amplification de courte durée (< 40 min), résultat directement lu en cours d'analyse, absence de manipulation des produits d'amplification en chaîne par polymérase (moins de risques de contamination) et achat d'un seul réactif (en plus des amorces/sondes), ce qui diminue les besoins en matière de contrôle de la qualité (Rapport final, 2013).

De plus, la technologie TaqMan® est considérée plus robuste, plus précise, plus rapide, moins coûteuse et permettrait d'effectuer un plus grand nombre d'analyses simultanées que les autres approches.

5.4 Recommandations d'autres organismes

La présente section est sans objet, car l'avis se concentre sur des maladies héréditaires récessives propres à la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean et de Charlevoix en ce qui concerne l'ARSACS.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

Du personnel bien formé est déjà sur place. Cependant, il est possible de s'attendre à une augmentation des analyses qui passeront à 7 000 par année comparativement aux presque 3 000 analyses effectuées durant les 2 ans du projet pilote.

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 (sociaux, juridiques, politiques)

La disponibilité du dépistage systématique dans la région devrait s'accompagner de ressources vraisemblablement accrues en conseil génétique. Les enjeux éthiques ont été abordés dans l'avis du Comité d'éthique de santé publique de juillet 2007.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Il s'agit de l'introduction d'un nouveau test de dépistage élaboré et évalué à l'occasion d'un projet pilote (mars 2009 à novembre 2012). Le test établit le statut de porteur d'une ou de plusieurs des quatre maladies héréditaires récessives particulières à la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean ou à la région de Charlevoix. Le statut de porteur est présent chez 1 sur 20 à 23 personnes, alors qu'un enfant sur 2 000 naîtra atteint. Toutes les maladies qui font l'objet du dépistage (acidose lactique, tyrosinémie de type I du Saguenay–Lac-Saint-Jean, NSM/ACC et ARSACS) sont graves et débilitantes et ont un pronostic très sombre en matière de mortalité ou de morbidité.

7.2 Validité clinique

Bien que la technologie élaborée localement n'ait pas été comparée à d'autres techniques, sa sensibilité et sa spécificité sont virtuellement à 100 %. Il est à noter que la sensibilité et la spécificité avec la technologie proposée TaqMan® n'ont pas été rapportées. Cependant, en raison de la précision et de la robustesse de cette méthode, il serait surprenant d'obtenir de moins bons résultats.

7.3 Validité analytique

Les mesures de contrôle de la qualité ont fait l'objet de procédures opératoires normalisées élaborées par le requérant. Les contrôles de la qualité interne sont décrits. Il y a concordance complète (100 %) entre les analyses effectuées dans le laboratoire du requérant et celles réalisées dans deux autres laboratoires universitaires du Québec. Par ailleurs, s'il n'y a qu'un centre désigné pour effectuer ces analyses, certaines procédures de validation externe de la nouvelle technologie devraient être mises en place pour fins de contrôle de la qualité, en particulier lorsque les deux personnes du couple ont le statut de porteur de la mutation.

Les délais de transmission des résultats ont été respectés, surtout depuis l'introduction de la technologie TaqMan® qui a réduit de façon considérable la fréquence de reprises ponctuelles ou complètes des analyses. Notons que la validité technique de la méthode TaqMan® quant à ces analyses ne semble complétée qu'à 75 %. Bien que la nouvelle technologie TaqMan® soit une technologie très robuste, simple d'application, précise et propre aux analyses à effectuer, il est nécessaire de s'assurer que la validation technique appliquée aux quatre maladies du Saguenay–Lac-Saint-Jean soit complétée et que la fréquence des reprises ponctuelles et complètes soit minimale.

7.4 Recommandations d'autres organismes : sans objet.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Quatre maladies du Saguenay-Lac-Saint-Jean – recherche des mutations

Statut de la technologie diagnostique

- ☒ Établie, mais pas validée pour les mutations à l'étude
- ☐ 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 la validation avec la nouvelle technologie TaqMan sera complétée

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

Notes

- Il est nécessaire d'encadrer la pratique et de garantir que le contrôle de la qualité, dont la validation externe, se poursuive.
- Le fait de tester cinq mutations simultanément pourrait générer des analyses non pertinentes dans les populations dépistées; il faut s'assurer que la prescription de la recherche de ces mutations puisse se faire séparément.

RÉFÉRENCES

- Agence d'évaluation des technologies et des modes d'interventions en santé (AETMIS). Spectrométrie de masse en tandem et dépistage néonatal des erreurs innées du métabolisme – Rapport technique. Rapport préparé par Héra Makni, Carole St-Hilaire, Laura Robb, Kathy Larouche et Ingeborg Blancquaert. Montréal, Qc : AETMIS; 2007.
- Bergeron A, D'Astous M, Timm DE, Tanguay RM. Structural and functional analysis of missense mutations in fumarylacetoacetate hydrolase, the gene deficient in hereditary tyrosinemia type I. *J Biol Chem* 2001;276(18):15225-31.
- De Kok JB, Wiegerinck ETG, Giesendorf AJ, Swinkels DW. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes) *Hum Mutat* 2002;19(5):554-9.
- De Laet C, Dionisi-Vici C, Leonard JV, McKiernan P, Mitchell G, Monti L, et al. Recommendations for the management of tyrosinemia type I. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:8.
- De Lonlay P. Tyrosinémie type 1 [site Web]. Orphanet; 2007. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=882.
- Dupré N, Howard HC, Rouleau GA. Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. Dans : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., éd. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle, WA : University of Washington; 2014. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1372/>.
- Dupré N, Howard HC, Mathieu J, Karpatis G, Vanasse M, Bouchard JP, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol* 2003;54(1):9-18.
- Dystrophie musculaire Canada. Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire [site Web]. Toronto, ON : Dystrophie musculaire Canada; 2013. Disponible à : <http://muscle.ca/la-dystrophie-musculaire/les-maladies-neuromusculaires/neuropathie-sensitivo-motrice-hereditaire/> (consulté le 9 avril 2014).
- Dystrophie musculaire Canada. L'ataxie de Charlevoix-Saguenay (ARSACS). Toronto, ON : Dystrophie musculaire Canada; 2007. Disponible à : http://muscle.ca/wp-content/uploads/2012/11/435F_L_ataxie_de_Charlevoix_Saguenay_f.pdf (consulté le 9 avril 2014).
- Fontaine B. Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay [site Web]. Orphanet; 2008. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=98.
- Girard M, Larivière R, Parfitt DA, Deane EC, Gaudet R, Nossova N, et al. Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(5):1661-6.
- Grompe M. Disorders of tyrosine metabolism. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com>.
- Kozlov G, Denisov AY, Girard M, Dicaire MJ, Hamlin J, McPherson PS, et al. Structural basis of defects in the sarsin HEPN domain responsible for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *J Biol Chem* 2011;286(23):20407-12.

- Life Technologies. TaqMan® SNP genotyping assays. Product Bulletin. Grand Island, NY : Life Technologies; 2011. Disponible à : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.
- Mercier J, Prévost C, Engert JC, Bouchard JP, Mathieu J, Richter A. Rapid detection of the sacsín mutations causing autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Genet Test* 2001;5(3):255-9.
- Morin C. Acidose lactique congénitale type Saguenay-Lac-Saint-Jean [site Web]. Orphanet; 2011. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=FR&Expert=70472.
- Orphanet. Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins [site Web]. Paris, France : Orphanet. Disponible à : <http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/?Ing=FR> (consulté le 26 mars 2014 pour les 4 maladies).
- Ouellette G. Trousse d'information sur l'acidose lactique. À l'intention des parents d'enfants atteints de l'acidose lactique. Jonquière, Qc : Association de l'acidose lactique du Saguenay-Lac-Saint-Jean; 2008. Disponible à : http://www.aal.qc.ca/File/Trousse_Information-AAL.pdf.
- Thiffault I, Dicaire MJ, Tetreault M, Huang KN, Demers-Lamarche J, Duquette A, et al. Diversity of ARSACS mutations in French-Canadians. *Can J Neurol Sci* 2013;40(1):61-6.
- Autres documents internes fournis par le demandeur.*

ANNEXE A

Essai TaqMan®

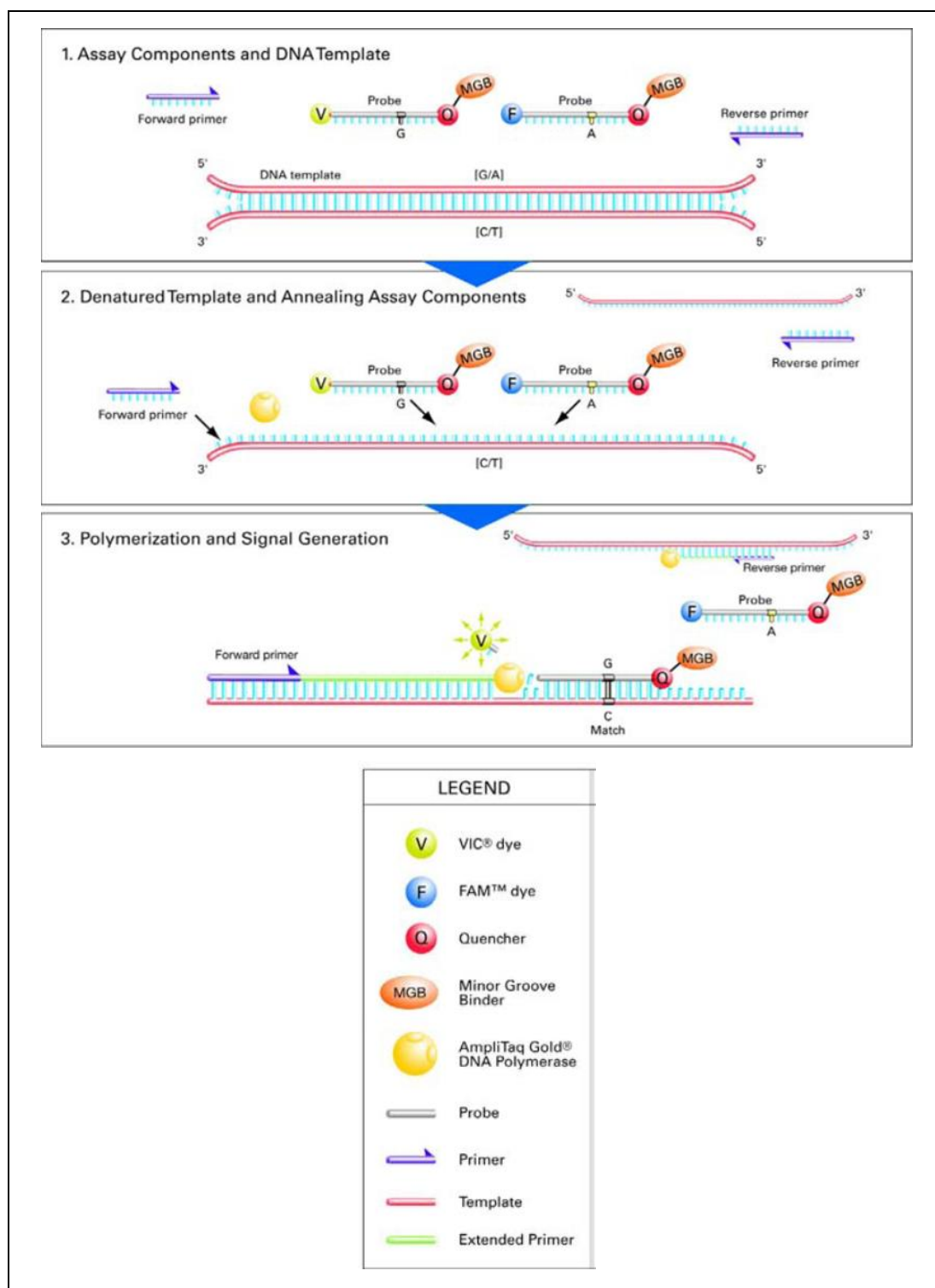
La PCR avec sonde d'hydrolyse (ou essai TaqMan® (il s'agit d'un nom réservé à LifeTechnologies/Applied Biosystems))

L'essai consiste à amplifier la ou les régions contenant le ou les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) à investiguer à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et de caractériser le SNP à l'aide de sondes spécifiques. Ces sondes portent un fluorochrome en 5' (tel que FAM, VIC, etc.) et un inhibiteur de la fluorescence (*quencher*) en 3' qui inhibe la fluorescence des sondes intactes. Pour un génotypage, une mesure semi-quantitative de la fluorescence à la fin de la réaction de PCR est effectuée (contrairement aux essais en temps réel qui sont quantitatifs et qui évaluent la fluorescence à chaque cycle). Le nombre de sondes concernées dans l'essai dépend des SNP possibles. Souvent, on retrouve deux sondes : une qui s'hybridera à l'allèle normal et une qui s'hybridera avec l'allèle mutant. Chaque type de sonde porte un fluorochrome qui la distingue de l'autre. Il existe certains essais TaqMan® sur le marché. Il s'agit évidemment d'essais relatifs à des mutations fréquemment recherchées comme *C282Y* ou *H63D* dans le gène *HFE* (dans l'hémochromatose). Il est toutefois possible de faire synthétiser des amorces et des sondes de son cru (ou de faire préparer un essai sur mesure).

Lors de la réaction de PCR, les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation se produisent comme dans une PCR ordinaire à la différence que, lors de l'étape d'hybridation, non seulement les amorces vont s'hybrider à la matrice d'ADN, mais également la sonde qui est parfaitement complémentaire à la séquence. À l'étape de l'élongation, la technologie TaqMan va synthétiser un brin complémentaire à la matrice à partir de l'amorce. Lorsqu'elle va rencontrer la sonde, elle va la dégrader au fur et à mesure qu'elle avance (activité 5' exonucléase) libérant ainsi le fluorochrome propre à la sonde qui est alors libre d'émettre sa fluorescence vu son éloignement soudain du *quencher* en 3'. Le type de fluorescence et sa semi-quantification à la fin de la PCR par le thermocycleur en temps réel permet de déterminer le génotype (homozygote normal ou mutant ou hétérozygote) du patient.

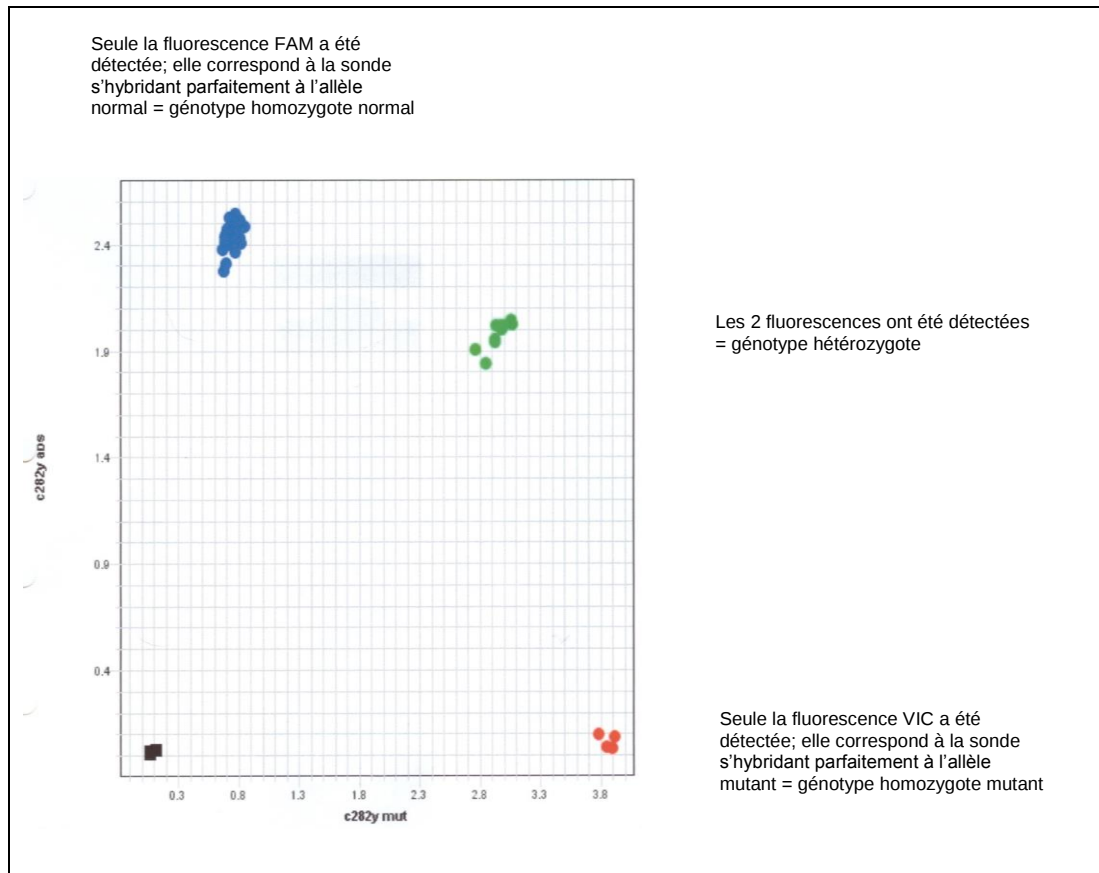
(Résumé par Nathalie Girard, Ph. D.)

Figure 1 Schéma du principe de base du génotypage par sondes d'hydrolyses



Tiré de Life Technologies. TaqMan® SNP genotyping assays. Product Bulletin. 2011. Disponible à : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.

Figure 2 Exemple de détection et attribution de génotype lors d'un essai



Tiré de Life Technologies. TaqMan® SNP genotyping Assays. Product Bulletin. Disponible à : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.

ANNEXE B

Précisions sur les gènes et la technique

Cinq mutations recherchées pour les quatre maladies suivantes :

- Acidose lactique congénitale (LRPPRC p.A354V);
- Tyrosinémie héréditaire de type 1 (FAH IVS12+5G>A);
- Polyneuropathie sensitivomotrice héréditaire avec ou sans agénésie du corps calleux (SLC12A6 2436delG);
- Ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay (SACS 6594delT et 5254C>T).

L'amplification des régions génétiques abritant les cinq mutations ciblées par cette analyse est assurée par la technique d'amplification en chaîne par polymérase. Une réaction d'amplification est nécessaire pour chaque mutation. La détection des amplicons ainsi générés est assurée par l'utilisation de sondes spécifiques de type TaqMan® (Life Technologies) à chacun des dix allèles possibles. Une fois l'amplification complétée, les échantillons sont analysés à l'aide d'un thermocycleur en temps réel ABI 7500Fast (Life Technologies), qui mesure la fluorescence émise pour chacune des dix sondes. L'hybridation ou non d'un amplicon sur chacune des dix sondes détermine la présence ou l'absence de fluorescence. L'analyse s'appuie sur le principe d'appariement des bases de Watson et Crick et est hautement spécifique. Ce principe est largement utilisé en génétique moléculaire.

ANNEXE C

Abréviations

AA	Acide aminé
ALC SLSJ	Acidose lactique congénitale de type Saguenay–Lac-Saint-Jean
ARSACS	Ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay
COX	Enzyme cytochrome c oxydase
FAH	Fumarylacétoacétate hydrolase (enzyme de dernière étape de la dégradation de la tyrosine)
HT1	Tyrosinémie congénitale héréditaire de type 1 (<i>Hereditary tyrosinemia, type 1</i>)
LRPRCP	<i>Leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein</i> (en cause dans la stabilité et le transport de l'ARN mitochondrial mature)
LSJ	Lac-Saint-Jean
NSM/ACC	Neuropathie sensitivomotrice héréditaire avec ou sans agénésie du corps calleux. Dans cette maladie, le corps calleux est complètement absent chez 57,8 % des personnes atteintes, partiellement absent chez 9,4 %, et présent chez 32,8 % (Dystrophie musculaire Canada, 9 avril 2014)
SLSJ	Saguenay–Lac-Saint-Jean
TH1	Tyrosinémie héréditaire congénitale de type 1

PANEL DE MUTATIONS DES GÈNES *BRCA 1/BRCA 2* – POPULATION DE L'EUROPE DE L'EST (RÉFÉRENCE 2014.01.001)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Hôpital Général Juif
- 1.2 **Date de transmission de la demande au MSSS** : 4 mars 2013
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 1^{er} mars 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 30 juin 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 LICENCES

2.1 Nom de la technologie

Analyse qualitative d'un panel de huit mutations du gène *BRCA*¹⁹ 1/2 par *Fluorescent liquid bead array* ou méthode de PCR en multiplex et détection par microbilles en milieu liquide (Luminex).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le demandeur emploie la technologie de détection xMAP^{®20} de Luminex[®]. Cette technologie utilise des microbilles (ou microsphères) de fluorescence différente, marquées par un code de couleur propre aux molécules à doser [Lehmann *et al.*, 2009]. Chaque type de microbilles est recouvert d'oligonucléotides spécifiques permettant son hybridation avec les amplicons complémentaires générés par PCR multiplex. Les microbilles permettent de capturer jusqu'à 100 analytes différents et sont en suspension, ce qui permet une plus grande surface de contact. Les groupements billes/amplicons émettent deux types de fluorescence : une intrinsèque à chaque type de bille et une émise par un rapporteur à la suite de l'hybridation de l'oligonucléotide avec un produit de la PCR. Le type de groupements présents (et par conséquent, le génotype présent) est déterminé par le Luminex après l'excitation des fluorophores, la détection et la quantification de la fluorescence²¹.

Le demandeur prévoit analyser huit mutations, soit six dans le gène *BRCA 1* et deux dans le gène *BRCA 2* (tableau 1).

¹⁹ *BRCA* : BReast CAncer gene.

²⁰ x désigne un biomarqueur ou un panel qui sera testé; MAP signifie *Multi-Analyte profiling*.

²¹ Les détails techniques de la xMAP[®] de Luminex[®] figurent pour consultation dans le document produit par la compagnie [Angeloni *et al.*, 2013; Lehmann *et al.*, 2009].

Tableau 1 Mutations dans *BRCA* proposées par le demandeur

MUTATIONS, SELON DIFFÉRENTES NOMENCLATURES					
<i>BRCA 1</i>	1	c.68_69delAG	185delAG 187delAG		
	2	c.181T>G		300T>G C61G	
	3	c.1016dupA	1135insA		p.Val340fs
	4	c.3700_3704del5	3819del5		
	5	c.4054delA	4153delA 4154delA		
	6	c.5266dupC	5382insC 5385insC		Gln1756fs
<i>BRCA 2</i>	1	c.7913_7917del5	8141del5		
	2	c.8537_8538del2	8765delAG		

2.3 Société ou développeur : protocole maison, emploie la technologie xMAP® de Luminex®.

2.4 Licences : sans objet.

2.5 Brevet

La compagnie étatsunienne *Myriad Genetics* détient des brevets sur les gènes *BRCA* depuis le milieu des années 1990. En 2013, la Cour suprême des États-Unis (la *Supreme Court of the United States*) a invalidé ces brevets, en argumentant que l'ADN est un produit de la nature et qu'il est uniquement possible de breveter des inventions humaines. Du même coup, la Cour statuait que dorénavant, il est interdit aux États-Unis de breveter l'ADN²². Au Canada, il semble que les brevets ne soient pas toujours respectés.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) : sans objet.

2.7 Valeur pondérée : 188,50

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

3.1 Patients ciblés

Selon le demandeur, les patientes ciblées sont celles de souche européenne de l'Est atteintes d'un cancer héréditaire du sein ou de l'ovaire.

Les lignes directrices du *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) [2014] sur le cancer du sein ou de l'ovaire héréditaire établissent la liste des critères requis pour procéder à des tests génétiques chez ces patients et leur famille. En voici quelques-uns :

- Cancer du sein diagnostiqué à l'âge de 50 ans ou moins;

²² Lecrubier A. Aux États-Unis, la Cour Suprême interdit le brevetage des gènes [site Web]. Medscape, 19 juin 2013. Disponible à : <http://www.medscape.fr/voirarticle/3553687>.

- Cancer du sein primaire multifocal dans le même sein ou dans le sein contrelatéral;
- Cancer du sein et de l’ovaire chez la même personne;
- Cancer du sein et plus de 1 cas dans la parenté proche ayant eu un cancer du sein diagnostiqué avant l’âge de 50 ans, ou plus de 1 cas de cancer de l’ovaire dans la parenté proche diagnostiqué à n’importe quel âge ou 3 cas ou plus de cancer du sein dans la parenté proche diagnostiqués à n’importe quel âge;
- Cancer du sein ou de l’ovaire à n’importe quel âge et origine juive ashkénaze;
- Cancer du sein triple négatif (récepteurs d’œstrogène et de progestérone, et HER2/neu²³ négatifs);
- Cancer du sein chez l’homme;
- Cancer de l’ovaire et antécédents familiaux de cancer du sein ou de l’ovaire.

La présente demande concerne plus particulièrement les personnes et les familles originaires des pays de l’Europe de l’Est.

Le demandeur prévoit réaliser 50 analyses par année.

3.2 Description de la maladie visée

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Au Québec, l’incidence du cancer du sein était estimée à 6 000 cas, en 2013²⁴. Le cancer de l’ovaire est plus rare. La plupart des cancers du sein et de l’ovaire sont sporadiques. Toutefois, dans 5 % à 10 % des cas, une prédisposition familiale liée à la présence d’une mutation dans un gène est observée.

La majorité des patientes atteintes du syndrome du cancer du sein et de l’ovaire héréditaires ont une mutation pathogénique dans les gènes *BRCA 1* (situé dans le chromosome 17 : 17q21.31) ou *BRCA 2* (situé dans le chromosome 13 : 13q13.1). Dans une revue de littérature récente sur les cancers héréditaires, Ballinger [2012] rapporte que 80 % des familles chez qui il y a eu diagnostic de cancers du sein et de l’ovaire ont des mutations du gène *BRCA 1*.

La transmission des mutations des gènes *BRCA* se fait selon le mode autosomal dominant, donc un porteur a un risque de 50 % de transmettre la mutation à chacun de ses descendants. La présence d’une de ces mutations est liée à un risque à vie d’avoir un cancer du sein. La pénétrance ou le risque cumulatif est de 50 % à 85 % pour ce qui est du cancer du sein et est un peu plus faible (entre 20 % et 60 %) en ce qui a trait au cancer de l’ovaire [Ballinger, 2012].

La fréquence des mutations dans *BRCA 1* et 2 dans la population générale est estimée entre 1 sur 300 à 1 sur 800. Par contre, la fréquence de mutations fondatrices²⁵ dans des populations ciblées peut être beaucoup plus élevée. Par exemple, chez les personnes d’origine juive de l’Europe de l’Est (Ashkénazes), deux mutations fondatrices dans *BRCA 1* (c.68_69delAG ou 185delAG ; c.5266dupC ou 5382insC) et 1 mutation dans *BRCA 2* (c.5946delT ou 6174delT) comptent pour plus de 90 % des mutations détectées [Ballinger,

²³ HER2/neu : *human epidermal growth factor receptor 2*.

²⁴ Société canadienne du cancer (SCC). Publication Statistiques canadiennes sur le cancer [site Web]. Disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics-publication/?region=qc>.

²⁵ Une mutation fondatrice survient plus fréquemment chez les descendants d’un groupe d’ancêtres communs en raison de leur isolement géographique ou ethnique (population fondatrice) [AETMIS, 2006].

2012; Janavičius, 2010]. Dans cette population, la prévalence de ces trois mutations serait dix fois plus élevée que dans une population non sélectionnée, soit entre 1,9 % et 2,7 % [AETMIS, 2006].

La découverte d'une mutation pathogénique dans *BRCA 1* ou *2* permet d'appliquer quelques mesures de prévention primaire, c'est-à-dire chirurgie (comme la mastectomie ou l'ovariectomie préventives) ou hormonothérapie [Petrucelli *et al.*, 2013]. Une surveillance accrue (dépiage annuel, autoexamen, etc.) est également recommandée.

3.3 Nombre de patients visés : 50 analyses par année.

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

Oncologie, génétique, oncogénétique et conseil génétique.

3.5 Modalités d'administration du test

Outre la prise d'un prélèvement selon les modalités usuelles, l'évaluation du risque et le conseil génétique pré- et post-analyse font partie intégrante du processus du diagnostic génétique des cancers héréditaires [Ballinger, 2012].

Il existe plusieurs modèles pour évaluer le risque de cancer héréditaire du sein et de l'ovaire et pour mieux cibler les personnes qui pourraient bénéficier d'une analyse en génétique. Petrucelli et ses collaborateurs [2013] présentent quelques-uns de ces modèles, ses avantages et ses limites, et indiquent que l'évaluation du risque est un art, et qu'aucun modèle ne peut remplacer le jugement clinique.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Nouvelle analyse, complémentaire à d'autres présentes dans le *Répertoire* (codes 50039, 50040 et 50041). Pourrait éventuellement remplacer l'analyse 50041.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Actuellement, trois analyses dans le *Répertoire* concernent les mutations des gènes *BRCA 1* et *2* :

- Cancer du sein et (ou) de l'ovaire – *BRCA 1/BRCA 2*. Mutation individuelle par séquençage (code 50039 ; valeur pondérée (VP) : 134,0);
- Cancer du sein et (ou) de l'ovaire – *BRCA 1/BRCA 2*. Mutations canadiennes-françaises (séquençage) (code 50040; VP : 485,0);
- Cancer du sein et (ou) de l'ovaire – *BRCA 1/BRCA 2*. Mutations juives ashkénazes (analyse de fragments) (test d'amplification des acides nucléiques, ou TAAN) (code 50041; VP : 174,0).

Par ailleurs, 809 analyses dans *BRCA 1/BRCA 2*, sans précision sur le type de mutations recherchées, ont été envoyées hors Québec au cours de la dernière année pour un montant total de 1,9 M \$, ce qui représente un coût moyen de 2 348,60 \$ par analyse.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La technologie permettra la recherche de huit mutations fondatrices prédisposant au cancer du sein et de l'ovaire chez la population originaire de l'Europe de l'Est.

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

Les huit mutations proposées par le demandeur incluent les trois mutations propres aux populations d'origine juive ashkénaze. La méthode d'analyse n'est pas la même que celle énoncée dans l'analyse 50041 (analyse des fragments, TAAN). Il est impossible, dans le cadre de cet avis, de comparer la performance diagnostique de ces deux techniques.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

La recherche de mutations dans *BRCA 1* ou *2* vise à détecter les porteurs des trois mutations afin de leur offrir des interventions préventives. De telles interventions ont démontré une efficacité pour réduire le risque de cancer, la mortalité et la morbidité associées. Cependant, elles entraînent également une morbidité non négligeable.

Mortalité et morbidité

Après révision de plusieurs études, Ballinger [2012] rapporte que l'utilisation des contraceptifs oraux par les femmes qui ont une mutation dans *BRCA* a été associée à une réduction de 50 % du risque de cancer de l'ovaire. La réduction serait plus importante si les contraceptifs oraux sont pris pendant plus de trois ans. La littérature rapporte une augmentation possible du risque de cancer du sein avec la prise de contraceptifs oraux. Toutefois, une méta-analyse citée dans la même revue n'a pas montré d'augmentation de risque chez les femmes porteuses d'une mutation dans *BRCA* [Ballinger, 2012].

Plusieurs études révisées par Ballinger [2012] ont montré une réduction du risque de cancer de l'ovaire et de la mortalité chez les femmes porteuses d'une mutation dans *BRCA* qui ont subi une salpingo-ovariectomie préventive. La réduction du risque est de 85 % à 95 %, surtout si l'intervention est pratiquée avant l'âge de 40 ans.

Petrucelli et ses collaborateurs [2013] ont révisé la littérature scientifique sur les conséquences des interventions préventives chez les personnes non atteintes de cancer mais qui ont une mutation dans *BRCA 1* ou *2* confirmée. Différentes études rapportent une réduction importante, jusqu'à 90 %, du risque de cancer après mastectomie ou salpingo-ovariectomie préventives. De plus, une étude récente sur 1 619 femmes atteintes du cancer du sein et porteuses d'une mutation dans *BRCA 1* et *2* montre un avantage de survie chez celles qui ont suivi une intervention chirurgicale préventive [Domchek *et al.*, 2010].

Qualité de vie et effets indésirables

L'ovariectomie préventive et l'hormonothérapie avec tamoxifène proposée aux femmes porteuses d'une mutation dans *BRCA* provoque une ménopause chirurgicale ou médicamenteuse qui s'accompagne des effets secondaires associés, notamment des symptômes vasomoteurs, de la sécheresse vaginale, de l'ostéoporose et une augmentation du risque de maladie cardiaque [Petrucelli *et al.*, 2013]. Le tamoxifène augmente le risque de cancer de l'endomètre et d'épisodes de thromboembolie, y compris l'embolie pulmonaire.

Disponibilité d'un traitement et modifications en raison des résultats du test

La découverte d'une mutation dans *BRCA 1* ou *2* ne modifie pas le traitement chez les

personnes atteintes du cancer du sein ou de l’ovaire. Le traitement du cancer du sein ou de l’ovaire héréditaire est le même que celui offert pour un cancer sporadique [Petrucelli *et al.*, 2013]. Toutefois, selon les lignes directrices du NCCN, une mastectomie bilatérale peut être offerte aux personnes atteintes du cancer du sein en raison du risque augmenté de cancer secondaire dans le même sein ou dans l’autre [NCCN, 2014].

La confirmation de la présence d’une mutation peut permettre d’offrir aux personnes porteuses de la mutation des interventions cliniques préventives, soit des interventions chirurgicales (salpingo-ovariectomie préventive, mastectomie préventive), un dépistage annuel ou de l’hormonothérapie avec tamoxifène, un antagoniste partiel de l’œstrogène.

5.1.3 Valeur thérapeutique : le test a une valeur pronostique.

5.2 Validité clinique

La sensibilité clinique de la recherche des mutations est égale au nombre de personnes qui ont le phénotype recherché – dans le cas présent, le cancer du sein ou de l’ovaire – ou qui acquerront ce phénotype, chez qui le test aura un résultat positif [AETMIS, 2006].

Les tableaux présentés en annexe montrent la prévalence des mutations selon différentes catégories et différents groupes ethniques originaires des pays de l’Europe de l’Est ainsi que les résultats de deux revues de littérature qui ont qualifié les mutations selon leur effet fondateur. Six mutations sur les huit proposées par le demandeur sont représentées dans ces données et fortement associées aux cancers du sein et de l’ovaire. Aucune information n’a été trouvée pour les deux autres.

5.3 Validité analytique (ou technique)

La recherche documentaire n’a pas repéré d’études ayant examiné la performance technique de la recherche des mutations dans *BRCA* par la méthode proposée par le demandeur, soit la PCR en multiplex et la détection par microbilles en milieu liquide.

Les données de validation locale fournies par le demandeur confirment la performance de la technique pour l’ensemble de mutations (données non publiées).

5.4 Recommandations d’autres organismes

Les lignes directrices européennes de la Société européenne d’oncologie médicale (*European Society for Medical Oncology* ESMO), publiées en 2010, recommandent la recherche de mutations dans *BRCA* chez les personnes à risque et leurs familles [Balmaña *et al.*, 2010]. Des recommandations sont également adressées quant aux interventions préventives et thérapeutiques aux personnes porteuses de mutations et à leurs familles.

Isaacs et ses collaborateurs ont révisé la littérature sur les tests génétiques pour ce qui est du syndrome du cancer héréditaire du sein et de l’ovaire (UpToDate, dernière mise à jour en février 2014). Parmi les conclusions et recommandations, ces auteurs recommandent l’analyse ciblée des mutations propres à des groupes ethniques pour lesquels des mutations fondatrices ont été décrites, comme les personnes d’origine juive ashkénaze [Isaacs *et al.*, 2014].

Le NCCN a également publié en 2014 la dernière mise à jour de son guide de pratique clinique sur l’évaluation génétique des cancers du sein et de l’ovaire. Des algorithmes cliniques sont présentés pour le traitement, les interventions préventives et la surveillance des patientes et des personnes porteuses d’une mutation dans *BRCA* et leurs familles.

6 RÉPERCUSSIONS DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines : n'ont pas été analysés.

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

Les répercussions économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois n'ont pas été analysées. Toutefois, la recherche des mutations et quelques panels ciblés se font déjà au Québec. Des séquençages plus complets dans les cas où le syndrome du cancer du sein et de l'ovaire est soupçonné sont envoyés aujourd'hui hors Québec à un coût qui dépasse largement la valeur pondérée calculée par le demandeur pour ce panel de mutations. Il y aurait certainement un avantage économique à mettre en œuvre et à réaliser ces analyses au Québec.

À titre informatif, le tableau 2 présente le volume d'analyses relatives à *BRCA 1* et *2* incluses dans le *Répertoire* et faites au Québec, ces deux dernières années.

Tableau 2 Volume d'analyses relatives à *BRCA 1* et *BRCA 2* faites au Québec, ces deux dernières années

CODE	ANALYSE	NOMBRE D'ANALYSES		VP
		2012-2013	2013-2014	
50039	Mutation individuelle par séquençage	1 502	1 110	134
50040	Mutations canadiennes-françaises (séquençage)	608	812	485
50041	Mutations juives ashkénazes (analyse de fragments) (TAAN)	123	71	174

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

Les questions autour du brevet concernent les analyses du gène *BRCA* en général. Également, les questions d'ordre éthique et la problématique des interventions préventives disponibles en présence d'un résultat positif s'appliquent aux analyses du gène *BRCA* en général et ne sont pas propres au panel ciblé pour les personnes originaires de l'Europe de l'Est.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La recherche de mutations dans les gènes *BRCA 1* et *2* a une valeur pronostique. Elle permet de repérer les personnes porteuses de la mutation qui pourraient bénéficier d'une surveillance accrue (augmentation de la fréquence des examens cliniques, mammographies, échographies, IRM) ou d'interventions préventives chirurgicales ou médicamenteuses (hormonothérapie). Ces interventions permettraient de réduire le risque de cancer, de mortalité et de morbidité associées, mais elles ne sont pas dépourvues d'effets secondaires qui peuvent influencer sur la qualité de vie. Le conseil génétique avant et après l'analyse est essentiel.

7.2 Validité clinique

Cinq des huit mutations incluses dans le panel du demandeur ont été citées comme ayant un effet fondateur chez les populations de l'Europe de l'Est. Deux autres sont citées comme étant fréquentes chez les mêmes populations. Une des mutations est souvent rapportée en lien avec la population d'origine scandinave, et est quelquefois mentionnée en lien avec les pays de l'Europe de l'Est.

7.3 Validité analytique

Aucune étude publiée de validation de la méthode proposée par le demandeur quant à la recherche des mutations dans *BRCA* n'a été repérée. Toutefois, les résultats d'une validation locale confirment la performance de la méthode utilisée.

7.4 Recommandation d'autres organismes

Les lignes directrices récentes sur le diagnostic du cancer du sein et de l'ovaire héréditaires comprennent dans leur algorithme la recherche de mutations dans *BRCA*.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Panel de mutations des gènes *BRCA 1/BRCA 2* – population de l'Europe de l'Est

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 mise en place d'un mécanisme de contrôle de la qualité externe
- ☐ 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). Contribution des analyses moléculaires des gènes BRCA 1/2 à l'évaluation du risque de prédisposition au cancer du sein ou de l'ovaire : rapport sommaire. Rapport préparé par Julie Tranchemontagne, Lucy Boothroyd et Ingeborg Blancquaert. Montréal, Qc : AETMIS; 2006.
- Angeloni S, Cordes R, Dunbar S, Garcia C, Gibson G, Martin C, Stone V. xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 1st Edition. Austin, TX : Luminex; 2013. Disponible à : http://cdn2.hubspot.net/hub/128032/file-213083097-pdf/Luninex-xMap_Cookbook.pdf.
- Armaou S, Pertesi M, Fostira F, Thodi G, Athanasopoulos PS, Kamakari S, et al. Contribution of BRCA1 germ-line mutations to breast cancer in Greece : A hospital-based study of 987 unselected breast cancer cases. *Br J Cancer* 2009;101(1):32-7.
- Ballinger LL. Hereditary gynecologic cancers: Risk assessment, counseling, testing and management. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2012;39(2):165-81.
- Balmaña J, Diez O, Rubio I, Castiglione M, ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl 5):v20-v22.
- Bogdanova NV, Antonenkova NN, Rogov YI, Karstens JH, Hillemanns P, Dörk T. High frequency and allele-specific differences of *BRCA1* founder mutations in breast cancer and ovarian cancer patients from Belarus. *Clin Genet* 2010;78(4):364-72.
- Brozek I, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, et al. Limited significance of family history for presence of BRCA1 gene mutation in Polish breast and ovarian cancer cases. *Fam Cancer* 2012;11(3):351-4.
- Brozek I, Cybulska C, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, et al. Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *J Appl Genet* 2011;52(3):325-30.
- Dobričić J, Krivokuća A, Brotto K, Mališić E, Radulović S, Branković-Magić M. Serbian high-risk families: Extensive results on BRCA mutation spectra and frequency. *J Hum Genet* 2013;58(8):501-7.
- Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA* 2010;304(9):967-75.
- Fostira F, Tsilaidou M, Papadimitriou C, Pertesi M, Timotheadou E, Stavropoulou AV, et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: Implications for genetic screening selection criteria: A Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134(1):353-62.
- Gaj P, Kluska A, Nowakowska D, Bałabas A, Piatkowska M, Dabrowska M, et al. High frequency of BRCA1 founder mutations in Polish women with nonfamilial breast cancer. *Fam Cancer* 2012;11(4):623-8.
- Hartwig M, Janiszewska H, Bąk A, Pilarska M, Heise M, Junkiert-Czarnecka A, et al. Prevalence of the BRCA1 c.68_69delAG (BIC: 185delAG) mutation in women with breast cancer from

- north-central Poland and a review of the literature on other regions of the country. *Contemp Oncol (Pozn)* 2013;17(1):34-7.
- Isaacs C, Fletcher SW, Peshkin BN. Genetic testing for hereditary breast and ovarian cancer syndrome. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; Disponible à : <http://www.uptodate.com>.
- Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: Implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J* 2010;1(3):397-412.
- Karami F et Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:928562.
- Konecny M, Milly M, Zavodna K, Weismanova E, Gregorova J, Mlkva I, et al. Comprehensive genetic characterization of hereditary breast/ovarian cancer families from Slovakia. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126(1):119-30.
- Lehmann S, Dupuy A, Beaudeau JL, Lizard G. Méthodes d'analyses moléculaires multiplexes sur supports solides ou en milieu liquide pour l'identification de biomarqueurs protéiques dans les fluides biologiques et les extraits cellulaires ou tissulaires. *Ann Biol Clin* 2009;67(4):381-93.
- Machackova E, Foretova L, Lukesova M, Vasickova P, Navratilova M, Coene I, et al. Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer* 2008;8:140.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Genetic/familial high-risk assessment: Breast and ovarian. Version 1.2014. Fort Washington, PA : NCCN; 2014. Disponible à : <http://www.nccn.org/>.
- Novaković S, Milatović M, Cerkovnik P, Stegel V, Krajc M, Hočevár M, et al. Novel BRCA1 and BRCA2 pathogenic mutations in Slovene hereditary breast and ovarian cancer families. *Int J Oncol* 2012;41(5):1619-27.
- Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer. Dans : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., éd. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle, WA : University of Washington; 2013. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>.
- Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, et al. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 2005;7(5):R728-36.
- Ratajska M, Brozek I, Senkus-Konefka E, Jassem J, Stepnowska M, Palomba G, et al. BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland. *Oncol Rep* 2008;19(1):263-8.
- Van del Looij M, Szabo C, Besznyak I, Liszka G, Csokay B, Pulay T, et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer* 2000;86(5):737-40.

ANNEXE A

Prévalence des mutations selon différentes catégories et différents groupes ethniques originaires des pays de l'Europe de l'Est

GÈNE ET MUTATIONS		POPULATION	NOMBRE DE CAS/FAMILLES	%	ÉCHANTILLON	EFFET FONDATEUR	ÉTUDE
BRCA 1	c.5266dupC	Biélorusse	49/1 945	2,5	Femmes atteintes du CS		Bogdanova <i>et al.</i> , 2010
			26/201	12,9	Femmes atteintes du CO		
			1/1 019	0,1	Témoins sains		
		Hongroise	7/500	1,4	Femmes atteintes du CS		Van der Looij <i>et al.</i> , 2000
			1/90	1,1	Femmes atteintes du CO		
			1/350	0,3	Témoins sains		
		Serbe	1/94		Proposants (cas index)		Dobričić <i>et al.</i> , 2013
		Polonaise	29/16 849	0,17	NN, population générale		Brozek <i>et al.</i> , 2012; 2011
			35/1 845	1,9	Sous-groupe atteint du CS		
			17/363	4,7	Sous-groupe atteint du CO		
		Polonaise	114/906	12,6	Cancer du sein familial	Oui	Gaj <i>et al.</i> , 2012
			51/675	7,6	Cancer du sein non familial		
		Polonaise	21/64		Familles atteintes du CS	Oui	Ratajska <i>et al.</i> , 2008
		Grecque	11/403		Cancer du sein, ER, PR, HER2-	Oui	Fostira <i>et al.</i> , 2012
		Grecque	13/987		Patientes atteintes du CS		Armaou <i>et al.</i> , 2009
		Tchèque	75/1 010		Proposants		Machackova <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	13/96		Familles atteintes d'unCSO récidivant		Pohlreich <i>et al.</i> , 2005
			5/55		Risque élevé sans antécédents familiaux		

GÈNE ET MUTATIONS		POPULATION	NOMBRE DE CAS/FAMILLES	%	ÉCHANTILLON	EFFET FONDATEUR	ÉTUDE
		Slovène	9/379		Familles atteintes d'un CSOH		Novaković <i>et al.</i> , 2012
		Slovaque	32/85	38	Familles atteintes du CSH		Konecny <i>et al.</i> , 2011
	c.181T>G	Biélorusse	20/1 945	1,0	Femmes atteintes du CS		Bogdanova <i>et al.</i> , 2010
			3/201	1,5	Femmes atteintes du CO		
			2/1 019	0,2	Témoins sains		
		Hongroise	9/500	1,8	Femmes atteintes du CS		Van der Looij <i>et al.</i> , 2000
			4/90	4,4	Femmes atteintes du CO		
			0/350	0	Témoins sains		
		Polonaise	11/13 462	0,08	NN, population générale		Brozek <i>et al.</i> , 2012; 2011
			18/1 486	1,2	Sous-groupe atteint du CS		
			12/363	3,3	Sous-groupe atteint du CO		
		Polonaise	38/906	4,2	Cancer du sein familial	Oui	Gaj <i>et al.</i> , 2012
			16/675	2,4	Cancer du sein non familial		
		Polonaise	9/64		Familles atteintes du CS	Oui	Ratajska <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	20/1 010		Proposants		Machackova <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	2/96		Familles atteintes d'un CSO récidivant		Pohlreich <i>et al.</i> , 2005
			1/55		Risque élevé sans antécédents familiaux		
		Slovène	31/379		Familles atteintes d'un CSOH		Novaković <i>et al.</i> , 2012
		Slovaque	14/85	17	Familles atteintes du CSH		Konecny <i>et al.</i> , 2011
	c.68_69delAG	Hongroise	1/500	0,2	Femmes atteintes du CS		Van der Looij <i>et al.</i> , 2000
			5/90	5,6	Femmes atteintes du CO		
			0/350	0	Témoins sains		

GÈNE ET MUTATIONS		POPULATION	NOMBRE DE CAS/FAMILLES	%	ÉCHANTILLON	EFFET FONDATEUR	ÉTUDE
		Polonaise	1/252	0,4	Femmes atteintes du CS		Hartwig <i>et al.</i> , 2013
			1/69	1,4	Avec critères de CS héréditaire		
			0/225	0	Témoins sains		
		Polonaise	0/12 485		NN, population générale		Brozek <i>et al.</i> , 2012; 2011
		Polonaise	8/906	0,9	Cancer du sein familial		Gaj <i>et al.</i> , 2012
			3/675	0,4	Cancer du sein non familial		
		Polonaise	3/64		Familles atteintes du CS	Oui	Ratajska <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	7/1 010		Proposants		Machackova <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	1/55		Risque élevé sans antécédents familiaux		Pohlreich <i>et al.</i> , 2005
	c.3700_3704del5	Slovaque	4/85	5	Familles atteintes du CSH		Konecny <i>et al.</i> , 2011
		Polonaise	4/3 923		NN, population générale		Brozek <i>et al.</i> , 2012; 2011
		Polonaise	11/906	1,2	Cancer du sein familial		Gaj <i>et al.</i> , 2012
			1/675	0,1	Cancer du sein non familial		
		Polonaise	4/64		Familles atteintes du CS		Ratajska <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	29/1 010		Proposants		Machackova <i>et al.</i> , 2008
		Tchèque	4/96		Familles atteintes du CSO récidivant		Pohlreich <i>et al.</i> , 2005
		Slovaque	4/85	5	Familles atteintes du CSH		Konecny <i>et al.</i> , 2011
		c.5256_5277+179del3200	Grecque	2/403	Cancer du sein, ER, PR, HER2 -	Oui	Fostira <i>et al.</i> , 2012
		c.5468-285_5592+4019del4429_insCACAG	Grecque	7/403	Cancer du sein, ER, PR, HER2 -	Oui	Fostira <i>et al.</i> , 2012
BRCA 2	c.7913_7917del5	Tchèque	15/1 010		Proposants		Machackova <i>et al.</i> , 2008
	c.8537_8538del2	Tchèque	14/1 010		Proposants		Machackova <i>et al.</i> , 2008

Abréviations : CO : cancer de l'ovaire; CS : cancer du sein; CSH : cancer du sein héréditaire; CSO : cancer du sein et de l'ovaire; CSOH : cancer du sein et de l'ovaire héréditaires; ER : récepteurs d'œstrogènes; HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain; NN : nouveau-né; PR : récepteurs de progestérone.

Mutations fondatrices selon deux revues de la littérature

ORIGINE	JANAVIČIUS 2010		KARAMI ET MEHDIPOUR 2013	
	BRCA 1	BRCA 2	BRCA 1	BRCA2
Juive ashkénaze	c.68_69delAG c.5266dupC	c.5946delT		
Slovaque		c.7806-2A>G		c.6589delA
Slovène			c.5266dupC	c.7806-2A>G
Tchèque	c.5266dupC	c.7913_7917del5 c.8537_8538del2		
Hongroise	c.5266dupC c.181T>G	c.5946delT	c.5266dupC c.68_69delAG	
Polonaise	c.5266dupC c.181T>G		c.5266dupC c.181T>G	
Lettonne	c.4035delA		c.5266dupC	
Lituanienne	c.4035delA			
Biélorusse	c.5266dupC		c.4035delA c.5266dupC	
Russe	c.5266dupC		c.5266dupC	

ANALYSE MUTATIONNELLE DE L'EXON 9 DU GÈNE CALR (RÉFÉRENCE 2014.01.002)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Hôpital Maisonneuve-Rosemont
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 15 janvier 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 1^{er} mars 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 30 juin 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 du statut mutationnel de l'exon 9 du gène *CALR*²⁶ par analyse de longueur de fragments suivant l'amplification des acides nucléiques (TAAN) avec des amorces fluorescentes.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Cette analyse est demandée afin de confirmer le diagnostic de néoplasie myéloproliférative, de type thrombocythémie essentielle (TE) ou myélofibrose primaire (MFP), chez des patients à Ph- (chromosome de Philadelphie) et pour lesquels la recherche de la mutation *JAK2*²⁷ V617F²⁸ s'est avérée négative. Le demandeur utilise un analyseur génétique (ABI 3130, Life Technologies) afin de déterminer avec précision la taille des insertions et des délétions décelées chez des patients qui ont obtenu un résultat positif pour la mutation.

Selon l'information fournie par le demandeur, la technique utilisée est un TAAN avec une amorce fluorescente et une amorce conventionnelle. La séquence codante de l'exon 9 du gène *CALR* (calréticuline²⁹) est entièrement amplifiée. À la suite de l'amplification sur un thermocycleur conventionnel, les produits de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur capillaires à l'aide de l'analyseur génétique. La résolution obtenue sur cet appareil est d'une paire de bases et la sensibilité est supérieure à 2 %. Il s'agit d'une analyse semi-quantitative qui permet de calculer le rapport allélique entre l'allèle de type sauvage et l'allèle muté.

²⁶ Le gène *CALR* de la calréticuline est localisé dans le chromosome 19p13.2 et contient 9 exons [Tefferi, 2014].

²⁷ *JAK2* : janus kinase 2, protéine membre de la famille appelée initialement *Just Another Kinase* [Olney, 2014].

²⁸ V617F : remplacement de la valine par la phénylalanine (*valine-to-phenylalanine alteration*).

²⁹ Calréticuline : protéine du réticulum endoplasmique pouvant fixer des ions calciums. (TERMIUM Plus®. Calréticuline [site Web]. 2011. Disponible à : <http://www.btb.termiumplus.gc.ca/tpv2alpha/alpha-fra.html?lang=fra&i=1&index=alt&srchtxt=CALRETICULIN>).

En effet, les mutations rapportées dans la littérature sont toutes des mutations somatiques, ce qui explique la variabilité au niveau des rapports alléliques détectés.

Le temps de réponse sera de 30 jours et l'analyse sera effectuée une fois par semaine.

2.3 Société ou développeur : analyse maison

2.4 Licence : sans objet

2.5 Brevet, le cas échéant : sans objet

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) : sans objet

2.7 Valeur pondérée : 37,0

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

3.1 Patients ciblés

L'analyse cible les patients chez qui une thrombocythémie essentielle (TE) ou une myélofibrose (MF) est soupçonnée et pour lesquels la recherche de la mutation dans *JAK2 V617F* s'est avérée négative.

3.2 Description des maladies visées

Selon la classification des tumeurs de tissus hématopoïétiques et lymphoïdes de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les néoplasies myéloprolifératives Ph- incluent la polycythémie vraie (*polycythemia vera* ou PV), la thrombocythémie essentielle (TE) et la myélofibrose primaire (MFP) [Casini *et al.*, 2013; Klampfl *et al.*, 2013].

La polycythémie vraie (PV) est une forme primaire de polyglobulie (hémoglobine > 185 g/l chez l'homme et > 165 g/l chez la femme) dont l'incidence est de 2,8/100 000 personnes par année. Elle est plus fréquente chez les personnes d'origine juive ashkénaze. Elle se distingue des autres polyglobulies par le risque augmenté de complications thrombotiques qu'elle entraîne. La mutation dans *JAK2 V617F* est présente chez 98 % des patients atteints [Olney, 2014].

La thrombocytose est définie comme un décompte de plaquettes supérieur à 450 000/ μ l³⁰ [Tefferi, 2014]. Quant à la thrombocythémie essentielle (TE), elle se caractérise par une hyperplaquettose persistante s'accompagnant de risques de thrombose et d'hémorragies. Elle peut être asymptomatique ou se manifester par des problèmes vasomoteurs (migraines, troubles visuels, paresthésies, etc.), thrombotiques ou hémorragiques dont la gravité et les séquelles dépendent de la localisation. Les transformations en leucémie aiguë ou myélodysplasie sont peu fréquentes (1,2/1 000 patients-années de suivi) [Olney, 2014] et généralement tardives. Elle peut être observée à tous les âges, mais elle est rare chez les enfants (âge médian au diagnostic de 60 à 65 ans). Sa prévalence dans la population générale serait d'environ 1/3 300 [Brière, 2007]. L'incidence annuelle de la TE est inconnue, mais elle est estimée entre 1,5 et 2,4/100 000 personnes. La mutation dans *JAK2 V617F* est présente chez 50 % à 60 % des patients atteints [Olney, 2014].

³⁰ Exprimé également comme > 450 x 10⁹/l.

Un des critères majeurs de diagnostic de la myélofibrose primaire (MFP) (OMS 2008, voir critères en annexe) est la présence de fibrose de la moelle osseuse avec prolifération de mégacaryocytes atypiques (de petite taille, ayant un rapport nucléo-cytoplasmique aberrant et un noyau hyperchromatique et irrégulier) [Tefferi *et al.*, 2009]. L'incidence annuelle de la MFP est estimée entre 0,5 et 1,5 cas/100 000 personnes [Orphanet, 2007]. La mutation dans *JAK2 V617F* est présente chez 53 % des patients atteints [Robert *et al.*, 2008].

Plus de 80 % des patients atteints de néoplasies myéloprolifératives Ph- éprouvent de la fatigue et plus de la moitié rapportent du prurit, des douleurs osseuses et des sueurs nocturnes. Plus rarement, les patients ont de la fièvre et une perte de poids [Tefferi, 2014].

Environ 40 % des patients atteints de TE ou de MFP n'ont pas de mutations dans les gènes *JAK2* ou *MPL*. Toutefois, entre 60 % et 88 % de ces patients portent une mutation dans le gène *CALR*. Dans 80 % à 90 % des cas, une délétion de 52-bp ou une insertion 5-bp est détectée dans l'exon 9 [Guglielmelli *et al.*, 2014]. Tefferi [2014] rapporte que plus de 80 % des patients aux prises avec une néoplasie myéloproliférative ont une mutation mutuellement exclusive dans l'un des trois gènes, soit *JAK2*, *MPL* ou *CALR*. Les mutations du gène *CALR* ne sont pas présentes dans le cas de PV ou en présence de mutations *JAK2* ou *MPL*.

3.3 Nombre de patients visés

Entre 200 et 300 patients par année sont visés, ce qui représente environ 10 % à 20 % des tests qui recherchent la mutation dans *JAK2 V617F* faits actuellement.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Biologie moléculaire, oncologie et hémato-oncologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Ce sont les hématologues qui prescriront l'analyse s'il y a suspicion de thrombocythémie essentielle ou d'une myélofibrose dont la mutation du gène *JAK2 V617F* est négative.

L'analyse est effectuée à partir de l'ADN extrait des cellules mononucléaires de la moelle osseuse ou des cellules nucléées du sang total périphérique.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

L'analyse est complémentaire à l'analyse mutationnelle de *JAK2 V617F* (code au Répertoire 20967). Elle sera faite dans les cas où la mutation dans *JAK2 V617F* est négative.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

L'algorithme de diagnostic actuel prévoit la recherche de la mutation dans *JAK2 V617F* en première intention. Cette analyse permet de détecter une mutation chez environ 50 % des sujets atteints de thrombocythémie essentielle ou de myélofibrose. En l'absence de cette mutation, un séquençage de l'exon 10 du gène de *MPL* est effectué. Une mutation dans ce gène sera détectée chez environ 3 % des patients [Tefferi *et al.*, 2014c; 2014d].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Près de 50 % des patients atteints de TE ont un résultat négatif au test de mutations diagnostiques de la maladie, ce qui est aussi le cas de 45 % des MFP. Dans 67 % à 88 % des cas, ces patients obtiendront un résultat positif pour cette mutation, ce qui permettra de diagnostiquer leur maladie avec certitude [Klampfl *et al.*, 2013].

Selon le demandeur, les résultats de l'analyse ne modifieront pas le choix du traitement ni le suivi, mais permettront un diagnostic clair de néoplasie myéloproliférative et l'instauration d'un traitement adéquat.

Certains patients ont actuellement un diagnostic d'exclusion qui nécessite un dépistage coûteux. Chez certains patients, cette incertitude diagnostique empêche la prise de décision thérapeutique (avoir recours ou non à la chimiothérapie). De plus, la recherche du gène *CALR* réduira le nombre de tests pour la mutation dans *MPL515* (peu fréquente) par une méthode plus coûteuse (séquençage) chez les patients pour lesquels la recherche de la mutation dans *JAK2 V617F* s'est avérée négative. La mutation dans le gène *MPL515* sera recherchée chez un très petit nombre de patients puisque la majorité des patients qui ont eu un résultat négatif pour le gène *JAK2 V617F* obtiendront un résultat positif pour le gène *CALR*. Le demandeur ajoute qu'une étude préliminaire locale montre qu'il sera très facile d'implanter l'algorithme de diagnostic dans son laboratoire.

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 : non

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Le lien entre les mutations du gène *CALR* d'une part, et la TE et la MFP avec absence de mutations dans *JAK2* et *MPL*, d'autre part, fait du génotypage du gène *CALR* un test indiqué chez les patients pour lesquels une néoplasie myéloproliférative est soupçonnée et chez qui la recherche des mutations dans *JAK2* et *MPL* a donné un résultat négatif [Guglielmelli *et al.*, 2014].

Les patients qui ont une mutation dans *CALR* ou qui sont triple négatifs ont obtenu un score IPSET³¹ significativement plus bas ($p = 0,04$) que ceux atteints de TE qui ont une mutation dans *JAK2* [Tefferi *et al.*, 2014c].

Mortalité

Deux études ont évalué le risque de décès associé à la présence de mutations dans *CALR*, *JAK2* et *MPL* chez des patients atteints de MFP [Tefferi *et al.*, 2014a] ou de TE/MFP [Klampfl *et al.*, 2013]. Ce risque est de 1,7 à 3,6 fois plus élevé chez les patients qui ont une mutation dans *JAK2* ou *MPL* ou qui sont triple négatifs (*JAK2*, *MPL* et *CALR*) comparativement à ceux qui ont la mutation dans le gène *CALR* (tableau 1).

³¹ Score IPSET : *International Prognostic Scoring Systems* pour la TE.

Tableau 1 Risque de décès associé à la présence des différentes mutations chez les patients atteints de TE ou de MFP

ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTS ET DIAGNOSTIC	RISQUE DE DECES		
		Comparaison	HR (IC à 95 %)	<i>p</i>
Tefferi <i>et al.</i> , 2014a	254 MFP	Triple négatifs* vs <i>CALR</i> +	3,6 (1,9 - 6,7)	< 0,0001†
		<i>JAK2</i> + vs <i>CALR</i> +	2,6 (1,6 - 4,0)	< 0,0001†
		<i>MPL</i> + vs <i>CALR</i> +	1,7 (0,9 - 3,3)	n. s.†
Klampfl <i>et al.</i> , 2013	1 215 894 TE et 321 MFP	<i>JAK2</i> + vs <i>CALR</i> +	3,1 (2,0 - 4,7)	< 0,001
		<i>MPL</i> + vs <i>CALR</i> +	3,5 (1,8 - 6,7)	< 0,001

Abréviations : IC : intervalle de confiance; HR : *hazard ratio* ou rapport du risque instantané; MFP : myélofibrose primaire; NM : néoplasie myéloproliférative; n. s. : différence non significative; *p* : signification statistique; PV : polycytémie vraie; TE : thrombocythémie essentielle; vs : versus.

* Mutations absentes dans les gènes *JAK2*, *CALR* et *MPL*.

† Après ajustement selon l'âge, les valeurs de *p* sont respectivement de 0,0008, de 0,01 et de 0,22.

Tefferi et ses collaborateurs viennent de publier une étude rétrospective sur 299 patients ayant reçu un diagnostic de TE entre 1956 et 2005 à la *Mayo Clinic*, aux États-Unis [Tefferi *et al.*, 2014c]. Le suivi médian est de 12,7 ans, et 47 % des patients ont été suivis jusqu'à leur décès. La fréquence des mutations était de 53 % (n = 159) pour la mutation dans le gène *JAK2*, de 32 % (n = 95) pour la mutation dans *CALR* et de 3 % (n = 8) pour la mutation dans *MPL*. Trente-sept patients (12 %) étaient triple négatifs. Parmi les porteurs des mutations dans *JAK2* et *CALR*, 42 (44 %) et 82 (52 %) respectivement, sont décédés.

Survie

La survie globale médiane semble meilleure chez les patients qui présentent une mutation du gène *CALR* que chez ceux qui ont d'autres mutations ou qui sont triple négatifs (tableau 2).

Tableau 2 Survie globale médiane et à 10 ans, selon le type de mutation présente

ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTS ET DIAGNOSTIC	MUTATION	SURVIE GLOBALE MÉDIANE (IC À 95 %)	SURVIE GLOBALE À 10 ANS % (IC À 95 %)
Rumi <i>et al.</i> , 2014a	127 NM	<i>CALR</i> +	n. d.	TE : 100 MFP : 100
		<i>JAK2</i> +	n. d.	TE : 96,8 (79,2 - 99,5) MFP : 91,7 (53,9 - 98,8)
		Aucune	n. d.	TE : 100 MFP : 0
Tefferi <i>et al.</i> , 2014c	299 TE	<i>CALR</i> +	20 ans*	n. d.
		<i>JAK2</i> +	19 ans*	n. d.
		<i>MPL</i> +	9 ans	n. d.
		Triple négatifs	n. d.	n. d.

ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTS ET DIAGNOSTIC	MUTATION	SURVIE GLOBALE MÉDIANE (IC À 95 %)	SURVIE GLOBALE À 10 ANS % (IC À 95 %)
Tefferi <i>et al.</i> , 2014a	254 MFP	<i>CALR</i> +	8,2 ans	n. d.
		<i>JAK2</i> +	4,3 ans	n. d.
		<i>MPL</i> +	4,1 ans	n. d.
		Triple négatifs	2,5 ans	n. d.
Klampfl <i>et al.</i> , 2013	1 215 894 TE et 321 MFP	<i>CALR</i> +	21,4 ans (17,1 - 22,9)	TE : 96,9 (91,7 - 98,8)
		<i>JAK2 V617F</i> +	11,0 ans (7,8 - 14,4)†	TE : 91,1 (87,1 - 93,9) ‡
		<i>MPL</i> +	8,2 ans (2,0 - n. d.)*	

Abréviations : ADN : acide désoxyribonucléique; HR : *hazard ratio* ou rapport du risque instantané; MFP : myélofibrose primaire; n. d. : non disponible; NM : néoplasie myéloproliférative; TE : thrombocythémie essentielle.

* Suivi médian : 12,7 ans. Niveau de signification de la différence entre les groupes qui ont obtenu un résultat positif quant aux mutations des gènes *CALR* et *JAK2* : $p = 0,32$. La différence est également non significative lors de la comparaison du groupe de personnes âgées de 65 ans et moins.

† Niveau de signification de la différence avec le groupe qui a une mutation du gène *CALR* : $p < 0,001$.

‡ Niveau de signification de la différence avec le groupe qui a une mutation du gène *CALR* : $p = 0,04$.

Toutefois, chez les patients atteints de TE, une récente étude ne montre pas de différence de survie globale médiane entre les patients atteints de TE porteurs de mutations du gène *CALR* et du gène *JAK2*. La durée médiane de suivi dans cette étude était de 12,7 ans. La survie médiane la plus longue était de 20 ans chez les patients pour lesquels une mutation a été détectée dans *CALR* et de 19 ans chez les patients qui ont un gène *JAK2* muté. Ce sont les patients qui ont un gène *MPL* muté qui ont le temps de survie le moins long [Tefferi *et al.*, 2014c]. Par ailleurs, la durée de survie est plus courte chez les patients atteints de MFP. Rumi et ses collaborateurs [2014b] ont observé la survie globale à 15 ans chez 745 patients atteints de TE. Elle était de 95,3 % chez les patients pour lesquels la recherche de la mutation dans *CALR* s'est avérée positive et de 90,4 % chez ceux qui ont un gène *JAK2 V617F* muté. La différence était non significative ($p = 0,085$) même après l'ajustement selon l'âge.

Morbidité

Quatre études ont évalué l'incidence cumulative de thrombose à 5 ans, 10 ans ou 15 ans chez les patients atteints de TE (tableau 3).

Il a été observé que l'incidence de thrombose est moindre en présence de la mutation du gène *CALR* qu'en présence de la mutation dans *JAK2*. Tefferi et ses collaborateurs [2014c] ont également noté une fréquence plus faible de thrombose récidivante chez les patients atteints de TE qui ont la mutation du gène *CALR* ($p = 0,04$) et sont triple négatifs ($p = 0,02$) en comparaison avec ceux porteurs d'une mutation du gène *JAK2*.

Tableau 3 Incidence cumulative de thrombose chez les patients atteints de TE

ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTS	MUTATION	INCIDENCE CUMULATIVE DE THROMBOSE % (IC A 95 %)		
			À 5 ANS	À 10 ANS	À 15 ANS
Rumi <i>et al.</i> , 2014a	127 NM	<i>CALR</i> +	n. d.	0	n. d.
		<i>JAK2</i> +	n. d.	12,8 (4-27)	n. d.
		Aucune	n. d.	0	n. d.
Rumi <i>et al.</i> , 2014b	745	<i>CALR</i> +	n. d.	n. d.	10,5
		<i>JAK2</i> +	n. d.	n. d.	25,1†
Rotunno <i>et al.</i> , 2014	576	<i>CALR</i> +	n. d.	5,12 (1,6-15,2)	n. d.
		<i>JAK2</i> +	n. d.	14,5 (10,0-20,8)	n. d.
		<i>MPL</i> +	n. d.	19,5 (7,6-44,6)	n. d.
		Triple négatifs	n. d.	8,2 (2,7-22,3)*	n. d.
Klampfl <i>et al.</i> , 2013	894	<i>CALR</i> +	6,3 (3,2-10,8)	11 (6,3-17,1)	12,8 (7,3-20)
		<i>JAK2 V617F</i> +	13 (10-16,4)	21 (16,6-25,7)†	27,1 (21,4-33)
		<i>MLP</i> +	9,3 (2,3-22,3)	9,3 (2,3-22,3)	17,6 (4,4-38,1)

Abréviations : HR : *hazard ratio* ou rapport du risque instantané; IC : intervalle de confiance; n. d. : non disponible; NM : néoplasie myéloproliférative; TE : thrombocytemie essentielle.

* Si ce groupe de patients (pas de mutations) est considéré comme groupe de référence, le risque de thrombose était : HR : 0,74 (IC à 95 % : 0,33 – 1,00) en présence d’une mutation *CALR*; 1,78 (IC à 95 % : 1,06 – 3,18) en présence d’une mutation *JAK2* et 1,65 (1,7 – 3,92) en présence d’une mutation *MPL*.

† Différence significative : $p = 0,003$.

‡ Différence significative : $p = 0,001$; la différence reste significative après l’ajustement selon l’âge.

Progression de la maladie

La progression de la TE à 10 ou 15 ans vers une transformation leucémique ou polycytémique est plus fréquente chez les patients pour lesquels la mutation du gène *JAK2 V617F* est présente. La transformation myélofibrotique serait plus fréquente chez les patients pour lesquels la mutation du gène *CALR* est présente, mais la différence n’est pas significative (tableau 4).

Tableau 4 Incidence cumulative de la progression de la maladie chez les patients atteints de TE, selon le type de mutation

ÉTUDE	SUIVI	TYPE DE PROGRESSION	CALR +	JAK2 +	P
			% (IC à 95 %)		
Rumi <i>et al.</i> , 2014a	10 ans	Sans précision	0	6,6 (1,1 - 19,1)	0,047
Rumi <i>et al.</i> , 2014b	15 ans	Myélofibrotique	13,4 (5,4 - 25,2)	8,4 (3,9 - 15,3)	n. s.
		Leucémique	2,5 (0,2 - 11,3)	4,3 (1,9 - 8,2)	0,026*
		Polycytémique	0	28,6 (20,7 - 37,0)	n. d.

ÉTUDE	SUIVI	TYPE DE PROGRESSION	CALR +	JAK2 +	P
			% (IC à 95 %)		
Tefferi <i>et al.</i> , 2014c	12,7 ans	Myélofibrotique	12	7,5	0,28
		Leucémique	8,4	5	0,28
		Polycytémique	0	5	

Abréviations : IC : intervalle de confiance; n. d. : non disponible; n. s. : non significatif; p : niveau de signification statistique.

* Pas de différence significative après l'ajustement selon l'âge.

5.1.3 Valeur thérapeutique

La présente analyse n'est pas en lien avec un traitement ciblé.

5.2 Validité clinique

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

Prévalence

La présence des mutations dans les gènes *JAK2*, *MPL* ou *CALR* est très fréquente chez les patients atteints de néoplasie myélodysplasique (TE ou MFP). Dans l'ensemble, moins de 10 % de ces patients n'ont pas de mutation dans l'un ou l'autre de ces trois gènes [Klampfl *et al.*, 2013]. Par ailleurs, le séquençage de l'exome réalisé chez 151 patients atteints de NM montre que 146 d'entre eux (97 %) ont des mutations dans les gènes *JAK2*, *MPL* ou *CALR* qui sont mutuellement exclusives ($q < 0,01^{32}$) [Nangalia *et al.*, 2013].

Klampfl et ses collaborateurs [2013] ont trouvé une mutation dans le gène *CALR* chez 73 % des patients qui n'ont pas de mutation dans les gènes *JAK2* ou *MPL*. De leur côté, Nangalia et ses collaborateurs [2013] ont montré que la mutation dans *JAK2 V617F* était présente chez les 48 patients ayant une PV (100 %), chez 35 des 62 patients atteints de TE (56 %) et chez 27 des 39 patients aux prises avec une MF (69 %).

³² La valeur q résulte d'un ajustement de la valeur p (niveau de signification) et elle représente la proportion de faux-positifs (taux d'erreurs ou de fausses découvertes) [Storey, 2003].

Tableau 5 Fréquence de mutations du gène *CALR* chez les patients avec ou sans une mutation des gènes *JAK2* et *MPL*

ÉTUDE	TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC	DIAGNOSTIC	MUTATIONS <i>JAK2</i> ET <i>MPL</i>		MUTATIONS DU GÈNE <i>CALR</i>	
			+	-	+	%
Rotunno <i>et al.</i> , 2014	PCR en temps réel (pour <i>JAK2</i> et <i>MPL</i>) et analyse des courbes de fusion à haute résolution (<i>high-resolution melting analysis</i>) suivis par le séquençage de Sanger bidirectionnel pour <i>MPL</i> . Séquençage bidirectionnel pour mutations de <i>CALR</i> dans l'exon 9.	TE	394		0/394	
				182	89/182	48,9
Tefferi <i>et al.</i> , 2014a	PCR	MFP	147		1/147	
				85	63/85	74
Klampfl <i>et al.</i> , 2013	<i>High resolution sizing of fluorescent dye-labeled PCR products</i> Confirmation par la méthode de Sanger classique	PV			Aucun	
		TE		289	195/289	67
		MFP		120	105/120	88
Nangalia <i>et al.</i> , 2013	Séquençage de l'exome entier	PV			0/48	
		TE	40		0/40	
				22	18/22	82
		MFP	24		0/24	
				9	8/9	88,9
	Méthode de Sanger*	PV			0/217	
		TE	138		0/138	
				112	80/112	71,4
		MFP	115		0/115	
				46	30/46	65

Abréviations : LMA : leucémie myéloïde aiguë; LMC : leucémie myéloïde chronique; LMM : leucémie myéломocyttaire chronique; MFP : myélofibrose primaire; NM : néoplasie myéloproliférative; PCR : amplification en chaîne par polymérase; PV : polycytémie vraie; TE : thrombocythémie essentielle.

* Aucune mutation dans le gène *CALR* n'a été trouvée chez 389 patients atteints d'autres néoplasies myéloïdes, ni chez 502 patients atteints de tumeurs solides, ni chez 287 patients atteints de néoplasies lymphoïdes, ni chez 550 témoins sains.

Les résultats de ces quatre études confirment l'absence de mutation dans le gène *CALR* chez les patients atteints de PV et chez ceux qui n'ont pas de mutations dans *JAK2* et *MPL*. Une seule étude a trouvé un cas qui a obtenu un résultat positif pour *CALR* chez un patient atteint de MFP et pour lequel la mutation dans *JAK2* était présente [Tefferi *et al.*, 2014b]. La mutation du gène *CALR* s'est avérée positive chez 50 % à 89 % des patients sans mutation des gènes *JAK2* et *MPL*.

5.3 Validité analytique (ou technique)

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

Le demandeur nous a transmis les résultats d'une étude de validation de la technique destinée à assurer la fiabilité et la sécurité des résultats. Pour chaque analyse, des contrôles de la qualité internes (négatif et positif) ont été inclus et il est prévu de procéder à une double validation des résultats. Finalement, le demandeur prévoit participer à des contrôles de la qualité externes. Chacun des paramètres relatifs à la validation de la technique est décrit dans les paragraphes qui suivent.

1) Étude de validation de la technique d'analyse par taille de fragments

- Afin de s'assurer de la fiabilité de la technique, une étude de validation a été réalisée dans un premier temps. Lors de cette étude, 124 échantillons de patients préalablement testés et caractérisés comme négatifs pour la mutation *JAK2 V617F* ont été analysés par taille de fragment afin de déceler la présence ou l'absence de mutation. Au total, 18 patients ont eu un résultat positif.
- De ces 18 patients qui ont obtenu un résultat positif, 11 ont été analysés par séquençage de type Sanger. Le séquençage de chacun de ces patients a confirmé dans 100 % des cas la présence de mutations (7 délétions et 4 insertions).
- Des tests de dilution ont été faits afin d'évaluer la sensibilité de la technique employée. Pour ce faire, l'ADN de deux patients qui ont obtenu un résultat positif a été comparé à l'ADN d'un patient sain. Les résultats montrent une très bonne sensibilité pouvant aller jusqu'à 1 % lorsque la mutation est préalablement détectée. Par conséquent, le seuil de sensibilité a été légèrement relevé pour être établi de manière conservatrice à 2 %.
- Cette étude de validation a permis de confirmer les résultats obtenus par analyse de la taille de fragments. De même, le demandeur a été en mesure d'établir le seuil de sensibilité de la technique à 2 %, sensibilité identique à celle retrouvée dans le même laboratoire pour l'analyse du gène *JAK2 V617F*.

2) Validation des résultats

- Chaque résultat est validé par deux personnes, c'est-à-dire qu'il y a une validation technique et une validation clinique ou médicale.

3) Participation à des contrôles de la qualité externes

- Le laboratoire du demandeur est le premier groupe au Canada à offrir cette analyse. Toutefois, pendant l'intérim, ils feront un contrôle de la qualité avec le groupe du D^r Ross L. Levine du *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) de New York. Ils échangeront des spécimens aux six mois.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Tefferi et ses collaborateurs [2014b] ont publié une revue de la littérature ciblant les mutations des gènes *CALR* et *CSF3R* et leur rôle possible dans l'amélioration de la classification et des critères diagnostiques de la TE, de la MFP et de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Sur la base de la littérature révisée, ils proposent une modification des critères de diagnostic des néoplasies myéloprolifératives de l'Organisation mondiale de la santé de 2008. Ces modifications visent à inclure la présence des mutations dans les gènes *CALR* et *MPL* en tant que critères majeurs de diagnostic de la TE et de la MFP, au même titre que la présence de la mutation du gène *JAK2* [Tefferi *et al.*, 2014b].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

Effets sur les ressources matérielles et humaines : n'ont pas été analysés.

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

N'ont pas été analysées.

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

N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Cette nouvelle analyse est utile aux fins de confirmation du diagnostic et d'établissement du pronostic, en matière de survie, de risque de thrombose et de progression de la maladie, surtout chez les patients atteints de TE et en complémentarité avec la recherche de la mutation du gène *JAK2 V617F*.

7.2 Validité clinique

La fréquence des mutations du gène *CALR* chez les patients qui ont obtenu un résultat négatif pour *JAK2* et le lien avec les différents diagnostics ont été démontrés dans plusieurs études.

7.3 Validité analytique

L'intérêt clinique de la recherche de mutations du gène *CALR* est récent. Il n'y a pas d'études de validation technique publiées. Toutefois, le demandeur a procédé à une étude locale qui confirme la performance de sa technique. Par ailleurs, un contrôle de la qualité externe est prévu.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Des recommandations d'organismes officiels ne sont pas encore disponibles, mais un groupe d'experts propose de modifier les recommandations actuelles pour inclure la recherche de mutations du gène *CALR* dans l'algorithme diagnostique de la TE et de la MFP, au même titre que la présence de la mutation du gène *JAK2*.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Analyse mutationnelle de l'exon 9 du gène CALR

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 complétion de la validation de la méthode
- ☐ 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

- Brière J. Thrombocytemie essentielle [site Web]. Orphanet; 2007. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=3318 (consulté le 16 avril 2014).
- Casini A, Boehlen F, Lecompte T, de Moerloose P. Risque thrombotique en cas de néoplasies myéloprolifératives : ce que devrait savoir le médecin praticien. *Rev Med Suisse* 2013;9(372):315-8, 320.
- Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum. *Am J Hematol* 2014; 89(5):453-6.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379-90.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391-405.
- Olney HJ. Les néoplasies myéloprolifératives. De la thrombocytose essentielle à la polycythémie vraie. *Le Médecin du Québec* 2014;49(3):31-6.
- Orphanet. Splénomégalie myéloïde [site Web]. 2007. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=824 (consulté le 16 avril 2014).
- Robert DE, Stalder M, Lovey PY, Hutter P. Un test décisif pour le diagnostic des syndromes myéloprolifératifs : la recherche de la mutation V617F de la JAK2. *Caduceus Express* 2008;10(1).
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014;123(10):1552-5.
- Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, Milosevic JD, Casetti IC, Bellini M, et al. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 2014a;123(15):2416-9.
- Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014b;123(10):1544-51.
- Storey JD. The positive false discovery rate: A Bayesian interpretation and the q-value. *Ann Statist* 2003;31(6):2013-35.
- Tefferi A. Overview of the myeloproliferative neoplasms. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com>.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: Clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014a;28(7):1472-7.

- Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014b;28(7):1407-13.
- Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP, et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014c; [Epub ahead of print].
- Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, et al. Type 1 vs Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol* 2014d;89(8):E121-4.
- Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: Order out of chaos. *Cancer* 2009;115(17):3842-7.

ANNEXE

Critères diagnostiques des néoplasmes myéloprolifératifs de l'OMS 2008 (tiré de Tefferi et al., 2009)

	PV*		TE†		MFP‡	
CRITÈRES MAJEURS DE DIAGNOSTIC	1	Hb > 185 g/l (hommes)† Hb > 165 g/l (femmes)†	1	Décompte plaquettaire $\geq 450 \times 10^9/l$	1	Prolifération de mégacaryocytes atypiques ¹ avec fibrose de la réticuline ou du collagène. En l'absence de fibrose de la réticuline, la prolifération doit s'accompagner d'une hypercellularité médullaire, d'une prolifération de granulocytes et, souvent, d'une diminution de l'érythropoïèse.
	2	Présence de la mutation dans le gène <i>JAK2 V617F</i> ou d'une mutation similaire	2	Prolifération de mégacaryocytes avec morphologie large et mature. Pas ou peu de prolifération de granulocytes ou d'érythrocytes.	2	Absence de critères de diagnostic de l'OMS pour la LMC, la PV, le SM ou d'autres NM
			3	Absence de critères de diagnostic de l'OMS pour la LMC, la PV, la MFP, le SM ou d'autres NM.	3	Présence de la mutation du gène <i>JAK2 V617F</i> ou d'un autre marqueur clonal ou absence d'arguments pour soutenir le diagnostic de fibrose médullaire réactionnelle
			4	Présence de la mutation du gène <i>JAK2 V617F</i> ou d'un autre marqueur clonal ou absence d'arguments pour soutenir un diagnostic de thrombocytose réactionnelle.		

	PV*		TE†		MFP§	
CRITÈRES MINEURS DE DIAGNOSTIC	1	Myéloprolifération médullaire pour les trois lignées cellulaires			1	Leucoérythroblastose
	2	Érythropoïétine sérique en-dessous des valeurs normales			2	Augmentation de la LDH sérique
	3	Croissance de colonies érythroïdes endogènes			3	Anémie
					4	Splénomégalie palpable

Abréviations : Hb : hémoglobine; Ht : hématocrite; LDH : lactico-déshydrogénase; LMC : leucémie myéloïde chronique; MFP : myélofibrose primaire; NM : néoplasie myéloïde; OMS : Organisation mondiale de la santé; PV : polycythémie vraie; SM : syndrome myélodysplasique; TE : thrombocytémie essentielle.

* Le diagnostic de PV requiert les deux critères majeurs et un critère mineur ou encore, le premier critère majeur plus deux critères mineurs.

† Ou Hb > 170 g/l (hommes) ou Hb > 150 g/l (femmes) si associé à une augmentation persistante de ≥ 20 g/l par rapport à la valeur basale qui ne peut pas être attribuée à une correction d'une déficience en fer; ou Hb ou Ht au-delà du 99e percentile de la valeur de référence selon l'âge, le sexe, l'altitude de résidence; ou volume érythrocytaire > 25 % de la valeur moyenne normale prédite.

‡ Le diagnostic de TE requiert la présence des quatre critères majeurs.

§ Le diagnostic de MFP requiert la présence de trois critères majeurs et de deux critères mineurs.

|| Mégacaryocytes de petite taille, ayant un rapport nucléo-cytoplasmique anormal et un noyau irrégulier et hyperchromatique et des groupements denses (dense clustering).

DÉTECTION DES SOUS-UNITÉS A ET B DU FACTEUR XIII ET DÉTECTION D'UN ANTI-FACTEUR XIII, PAR LA MÉTHODE ELISA (RÉFÉRENCE 2014.01.003)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine

1.2 Dates de transmission des demandes au MSSS : 15 et 16 juillet 2013

1.3 Date de réception des demandes à l'INESSS : 1^{er} mars 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juin 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 LICENCES

2.1 Nom des technologies

Détection des sous-unités A et B du facteur XIII et détection d'anticorps non neutralisants³³ dirigés contre le facteur XIII (« de routine » et en « stat »³⁴) au moyen de la méthode ELISA (méthode immunoenzymatique à double détermination d'anticorps, ou *enzyme-linked immunosorbent assay*).

2.2 Description brève des technologies et précisions techniques et cliniques

Détection des sous-unités A et B

Le demandeur utilise la trousse TECHNOZYM® FXIII-A et FXIII-B SUB ELISA (Technoclone). Il s'agit d'un coffret de dosage ELISA servant à la détermination des sous-unités A (FXIII-A) et B (FXIII-B) du facteur XIII (FXIII), qui utilise des anticorps monoclonaux propres au FXIII-A et B. Le coffret comprend :

- un support solide de 12 bandelettes, avec 8 puits chacune, recouvertes de streptavidine;
- un anticorps de capture monoclonal biotinylé de souris (anti-FXIII-A « A1 » ou anti-FXIII-B « B1 »);
- un anticorps de détection monoclonal conjugué avec la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase* ou HPRO) (anti-FXIII-A « A₂ » ou anti-FXIII-B « B₂ »);

³³ Un anticorps non neutralisant est un anticorps dont la fixation sur la protéine « facteur » induit la formation d'un complexe qui est éliminé par le système réticulo-endothélial, et responsable d'un déficit secondaire de ce facteur [Biomnis, 2012].

³⁴ Stat : analyse pouvant être effectuée et communiquée lors d'une urgence médicale. Il est important de faire les distinctions suivantes lors de demandes d'analyses et de bien indiquer l'information sur les requêtes : urgence médicale (« Stat ») : l'analyse sera faite et communiquée immédiatement; prélèvement « Stat » : prélèvement à faire immédiatement, mais analyse non urgente.

- un tampon concentré (*phosphate buffered saline* ou PBS, pH = 7,4) contenant un détergent (0,01 % de merthiolate) pour l'étape de lavage et un tampon de dilution de l'échantillon (PBS, pH = 7,4) contenant des protéines (0,03 % de Proclin 300) pour l'étape de stabilisation.

Un substrat chromogénique TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté durant la période d'incubation. La réaction est stoppée avec de l'acide sulfurique 0,45 mol/l. L'intensité de la couleur est mesurée en densité optique à 450 nm [Technoclone, 2010a].

Détection d'anticorps non neutralisants anti-FXIII

La méthode ELISA est utilisée pour rechercher la présence d'anticorps non neutralisants dirigés contre la sous-unité A du FXIII chez les patients traités avec des concentrés de FXIII-A. Le demandeur utilise un protocole maison qui comprend les étapes suivantes :

- dépôt du FXIII recombinant (TRETEN^{MD}³⁵) dans une plaque en polystyrène à 96 puits;
- détection des anticorps dirigés contre le FXIII-A liés à l'aide d'un anticorps de détection anti-IgG humain couplé à la peroxydase;
- ajout d'un substrat chromogène fait de tétraméthylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène pour obtenir une réaction colorée;
- mesure de l'intensité de la couleur en densité optique à l'aide d'un lecteur de microplaque à 492 nm (spectrophotomètre).

Pour établir la zone de positivité, six plasmas témoins négatifs sont utilisés.

2.3 Société ou développeur

Trousses commerciales TECHNOZYM® FXIII-A et FXIII-B SUB ELISA de la compagnie autrichienne Technoclone servant à la détection des sous-unités A et B du FXIII.

Il existe d'autres trousses ELISA pour le dosage du FXIII-A (Zymutest Factor XIII-A : fabriqué par Hyphen Biomed [Aniara, 2009]).

2.4 Licence : sans objet.

2.5 Brevet : sans objet.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les trousses commerciales TECHNOZYM® FXIII-A SUB ELISA [Technoclone, 2010a] et FXIII-B SUB ELISA [Technoclone, 2010b] ne sont pas homologuées par Santé Canada. Les monographies des produits portent la mention « Pour recherche seulement » (*Research Use Only*).

2.7 Valeur pondérée

- Détection de la sous-unité A du FXIII : 31,0 unités
- Détection de la sous-unité B du FXIII : 31,0 unités
- Détection d'un anti-FXIII : 33,29 unités (« de routine ») et 389,96 unités (en « stat »).

³⁵ Il s'agit d'un produit pharmaceutique fabriqué par la compagnie **Novo Nordisk Canada Inc.**, contenant l'ingrédient médicinal catridecacog, qui est un facteur de coagulation humain recombinant composé de deux sous-unité A du FXIII (rFXIII-A₂) avec une structure identique à la sous-unité A du facteur XIII chez l'humain. Après injection, les dimères rFXIII-A₂ se lient aux sous-unités B endogènes en excédent dans la circulation pour former un hétérotétramère rA₂B₂ stable. Santé Canada a émis, à l'intention de Novo Nordisk Canada Inc., un avis de conformité de ce produit, le 19 juillet 2012 (Sommaire des motifs de décision (SMD) portant sur TRETEN^{MD}, disponible à : http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd_smd_2012_tretten_152228-fra.php).

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

3.1 Patients ciblés

Patients ayant un déficit congénital en FXIII qui :

- nécessitent une classification du type de déficience par la détermination de la sous-unité en cause (FXIII-A ou B), dans le but de choisir le traitement de remplacement (concentré de FXIII ou FXIII recombinant);
- sont traités avec des concentrés de FXIII et dont le suivi permet d'évaluer la réponse immunitaire (trois fois par année) par la recherche d'anticorps non neutralisants dirigés contre le FXIII et de titrer ces anticorps. Pour les cas qui se manifestent en clinique par un saignement, ce test est fait en urgence (« stat »).

3.2 Description de la maladie visée

Déficit congénital en facteur XIII

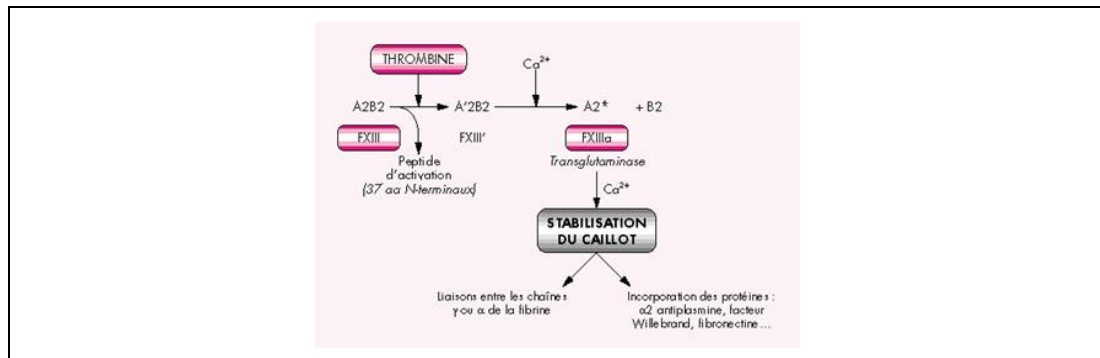
Le déficit congénital en facteur XIII (FXIII³⁶) est un trouble rare de la coagulation qui a une incidence approximative de 1 cas sur 2 millions. Il est transmis selon un mode autosomal récessif et sa fréquence est élevée dans les régions où se pratiquent les mariages consanguins. Le FXIII est une protransglutaminase qui a un rôle majeur dans la phase finale de la coagulation du sang et un rôle important dans la cicatrisation des plaies et la réparation tissulaire. Dans le plasma, le FXIII circulant (pFXIII) a une structure tétramérique constituée de la sous-unité A (FXIII-A de poids moléculaire : 83 kDa) produite par des cellules d'origine médullaire et de la sous-unité B (FXIII-B de poids moléculaire : 80 kDa) synthétisée par les hépatocytes. Ces deux sous-unités sont maintenues par des liaisons non covalentes et circulent dans le plasma, dans des conditions normales, sous forme de complexe (FXIII-A₂B₂). Le FXIII est également présent dans les cellules (cFXIII) telles que les plaquettes, les monocytes/macrophages et dans les cellules précurseurs de la moelle osseuse. En moyenne, 50 % du FXIII-B se présente sous forme libre et joue le rôle de stabilisateur du FXIII-A en empêchant son élimination rapide de la circulation. La thrombine plasmatique, avec ses cofacteurs de fibrine (le fibrinogène) et ses ions Ca²⁺, amorcent l'activation du FXIII durant la phase finale de la cascade de coagulation. La thrombine clive le peptide d'activation du FXIII-A et en présence de Ca²⁺, les sous-unités A et B se dissocient et le dimère FXIII-A₂ se transforme en une transglutaminase active, le FXIII activé [FXIIIa] (figure 1). Le rôle du FXIIIa est de catalyser la formation de liaisons covalentes entre les monomères α et β de fibrine pour augmenter la résistance mécanique du caillot de fibrine et le protéger de l'élimination rapide par la plasmine [Kohler *et al.*, 2001 ; Muszbek *et al.*, 2011].

Dans une population normale, le taux d'activité du FXIII varie largement de 53,2 % à 221,3 % (moyenne $\pm$ écart type : 105 $\pm$ 28,56 %) [Tahlan et Ahluwalia, 2014]. Il y a toutefois une incertitude quant aux valeurs basses de l'activité plasmatique du FXIII se traduisant par l'absence de corrélation entre la gravité des manifestations cliniques hémorragiques et les résultats de laboratoire [Muszbek *et al.*, 2011]. Dans la majorité des cas, les taux d'activité du FXIII qui définissent la forme clinique grave varient entre < 1 % [Jennings *et al.*, 2003],

³⁶ Toutes les abréviations utilisées pour désigner les différentes formes de facteur XIII sont conformes aux recommandations sur les termes et abréviations du facteur XIII du *Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee* [Muszbek *et al.*, 2007].

< 3 % [Karimi *et al.*, 2009] ou < 5 % [Tahlan et Ahluwalia, 2014]. Il est donc essentiel que les tests utilisés soient suffisamment sensibles pour détecter la réduction des taux de FXIII.

Figure 1 Fonctions du facteur XIII [Alhenc-Gelas, 2000]



Le déficit congénital en FXIII résulte d'une déficience du FXIII-A due à la mutation du gène *f13A1* localisé sur le chromosome 6 ou du FXIII-B causée par la mutation du gène *F13 B* localisé sur le chromosome 1. Jusqu'en 2009, plus de 70 mutations du gène du FXIII-A et quatre mutations du gène du FXIII-B ont été décrites [Muszbek *et al.*, 2011]. Les formes homozygotes ou hétérozygotes représentent les formes graves de la maladie. Le déficit en FXIII-A peut-être quantitatif (type I) résultant d'une diminution de synthèse de la protéine ou qualitatif (type II) lorsque la concentration de FXIII-A est normale ou presque normale mais la protéine est défectueuse sur le plan fonctionnel (figure 2). Le déficit en FXIII-B est relativement plus rare et les symptômes hémorragiques sont mineurs [Kohler *et al.*, 2011; Muszbek *et al.*, 2011].

Figure 2 Classification des déficiences en FXIII [Karimi *et al.*, 2009]

	Plasma Activity	Plasma Antigen		Platelet Antigen	
		A ₂ B ₂	A	B	A
FXIII-A deficiency					
Type I (quantitative)	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	>30%	↓↓↓
Type II (qualitative)	↓↓↓	↓-n	↓-n	>30%	↓-n
FXIII-B deficiency					
	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	n

n, normal.

En 2011, l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) recommandait un algorithme pour améliorer l'efficacité diagnostique et la classification des déficiences en FXIII intégrant les mesures de l'activité du FXIII. Si cette dernière est diminuée, le sous-type de déficience est établi par la mesure de la concentration de l'antigène du FXIII-A₂B₂. En cas de concentration diminuée, la concentration en antigène des sous-unités FXIII-A et FXIII-B et l'activité du FXIII et de l'antigène du FXIII dans le lysat plaquettaire devraient également être mesurées. La présence d'anticorps non neutralisants dirigés contre les FXIII-A ou B peut être responsable de la diminution du FXIII-A₂B₂ et devrait être recherchée [Kohler *et al.*, 2011; Muszbek *et al.*, 2011].

La plupart des patients présentant un déficit congénital en FXIII sont atteints de diathèse³⁷ hémorragique durant leur vie, dont les manifestations cliniques sont variables. Ces signes cliniques sont imprévisibles et présentent de longues périodes de survenue de symptômes bénins qui peuvent être suivis de complications hémorragiques graves s'accompagnant d'un risque très élevé de mortalité précoce. Il peut s'agir de saignements du cordon ombilical quelques jours après la naissance (56 %), de saignements intradermiques (57 %), intramusculaires (49 %) ou d'une hémorragie intracrânienne (34 %). Près de 80 % des décès sont attribuables à une hémorragie intracrânienne. Le FXIII joue également un rôle dans le maintien de la grossesse, la formation du cytotrophoblaste et l'implantation du placenta, ce qui explique le risque de fausse-couche précoce (> 80 %) chez les femmes ayant un déficit grave en FXIII [Fadoo *et al.*, 2013].

Le déficit en FXIII-B peut secondairement causer celui du FXIII-A plasmatique en raison de l'absence de protection par le FXIII-B. Très peu de cas de déficit congénital grave en FXIII-B ont été rapportés dans le monde [Wada *et al.*, 2013]. En clinique, le déficit en FXIII-B s'accompagne de saignements hémorragiques mineurs du fait de la présence de petites quantités de FXIII-A plasmatique (< 10 %) et des concentrations normales de FXIII-A intracellulaire (tableau 1). Pour cette raison, le diagnostic de déficit congénital en FXIII-B peut facilement passer inaperçu. Par contre, lorsque d'autres troubles hémostatiques sont concomitants, il est possible d'observer des épisodes hémorragiques graves et mortels [Schroeder et Kohler, 2013].

Traitement du déficit congénital en facteur XIII

Quand un déficit congénital grave en FXIII est confirmé, un traitement de remplacement prophylactique (10 à 20 U/kg de FXIII) aux 4 à 6 semaines est fortement recommandée, notamment en présence de concentrations de FXIII inférieures à 1 U/dl. Les concentrés de FXIII dérivés du plasma et le plasma frais congelé sont des options thérapeutiques très efficaces qui comportent toutefois des risques d'infections et des réactions allergiques, comme c'est le cas pour tous les produits sanguins dérivés du plasma. Au cours des dernières années, le développement de FXIII recombinant (rFXIII) hautement purifié dérivé du plasma représente une avancée majeure dans le traitement du déficit congénital en FXIII [Tahlan et Ahluwalia, 2014; Fadoo *et al.*, 2013; Inbal *et al.*, 2012; Lovejoy *et al.*, 2006]. L'efficacité d'un nouveau rFXIII (Tretten^{MD})³⁸ fabriqué dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été rapportée relativement au déficit congénital de FXIII-A [Inbal *et al.*, 2012]. Toutefois, contrairement aux concentrés de FXIII dérivés du plasma, les FXIII ne contiennent pas de FXIII-B et ne sont pas indiqués pour les déficiences en FXIII-B [Biswas *et al.*, 2014].

Anticorps non neutralisants anti-facteur XIII

Contrairement aux anticorps neutralisants³⁹, les anticorps non neutralisants forment un complexe immunitaire et réduisent ainsi les sous-unités du FXIII qui sont rapidement éliminées par le système réticulo-endothélial. Des publications plus anciennes ne rapportent que le développement d'anticorps neutralisants anti-FXIII-A et cela pourrait être dû à des

³⁷ Syndrome hémorragique causé par une anomalie du système vasculaire, plaquettaire ou plasmatique, nécessaire à l'hémostase normale.

³⁸ L'ingrédient médicamenteux de Tretten^{MD}, le catridécacog, est un facteur de coagulation humain recombinant XIII-A₂ (rFXIII-A₂). Il s'agit d'un homodimère composé de deux sous-unités A du FXIII. Il a une structure identique à la sous-unité A du facteur XIII (A₂) humain. Après injection, les dimères rFXIII-A₂ se lient aux sous-unités B endogènes en excédent dans la circulation pour former un hétérotétramère rA₂B₂ stable (Avis de conformité de Santé Canada sur le Tretten^{MD} émis le 19/07/2012). Disponible à : http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd_smd_2012_tretten_152228-fra.php#a2.

³⁹ Il s'agit d'anticorps dirigés contre le site actif du facteur de l'hémostase et capables de neutraliser *in vitro* le même facteur d'un plasma témoin [Biomnis, 2012]. Ces anticorps peuvent inhiber l'activation du FXIII, l'activité du FXIIIa ou la liaison du FXIII au fibrinogène [Muszbek *et al.*, 2011].

difficultés de détection des anticorps non neutralisants [Tahlan et Ahluwalia, 2014; Muszbek *et al.*, 2011]. Ces derniers sont transitoires, de faibles titres et apparaissent chez très peu de patients [Schroeder et Kohler, 2013].

3.3 Nombre de patients visés

Déficiences congénitales en sous-unité A ou B du FXIII : le demandeur estime à environ 20 à 30 patients par année le volume provincial attendu dans les trois prochaines années.

Selon l'information fournie par le demandeur, la détection d'anticorps non neutralisants anti-FXIII sera limitée par le nombre restreint de sujets présentant un déficit grave en FXIII, au Québec (actuellement : 13 sujets). Il prévoit environ 40 analyses par année dans les 3 prochaines années.

Au Canada, selon le *Canadian Hemophilia Registry*⁴⁰, le déficit en FXIII a été diagnostiqué en 2013 chez 54 personnes, dont 31 ont des formes graves.

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

Hématologie, hémostase, obstétrique et gynécologie, et chirurgie.

3.5 Modalités d'administration du test

Le prélèvement sanguin est effectué dans un centre de prélèvements à l'aide d'une ponction veineuse.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature des technologies diagnostiques : analyses uniques.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Traditionnellement, une méthode qualitative était utilisée pour le dosage du FXIII, le test de dissolution du caillot de fibrine dans une solution d'urée 5M ou d'acide monochloracétique à 1 % (test de solubilité du caillot). En cas de déficit en FXIII, la dissolution du caillot est rapide, en quelques minutes à 1 heure. En l'absence de déficit du FXIII, le caillot demeure insoluble. Cependant, cette méthode détecte seulement des déficits très graves du FXIII et présente des problèmes de standardisation. Sa sensibilité dépend des taux de fibrinogène, de thrombine ou de Ca^{2+} , de l'agent de solubilisation et de sa concentration. La limite de détection varie entre moins de 0,5 % et 5 % de l'activité du FXIII. Le nombre élevé de cas non diagnostiqués et les diagnostics tardifs sont en partie attribuables à la performance de ce test dont l'utilisation n'est plus recommandée [Kohler *et al.*, 2011]. Toutefois, il peut demeurer le seul test disponible dans un contexte de budget de la santé restreint [Schroeder et Kohler, 2013].

Les méthodes quantitatives de dosage de l'activité du FXIII s'appuient sur deux analyses :

- 1) la mesure du taux d'ammoniaque libéré durant la réaction de transglutaminase ;
- 2) la mesure d'amine marqué incorporé dans un substrat protéique. Dans les deux types de mesure, le pFXIII est activé par la thrombine et le Ca^{2+} .

⁴⁰ Canadian Hemophilia Registry. Rare coagulation disorders. 2013. Disponible à : <http://fhs.mcmaster.ca/chr/pdf/13/CHRRareCoag130517.pdf>.

La première analyse présente des avantages : sa rapidité d'exécution et sa facilité d'automatisation, et des inconvénients : sa faible sensibilité et une limite de quantification comprise entre 3 % et 5 %. La seconde analyse est très sensible, mais son exécution est plus longue et présente des problèmes de standardisation [Kohler *et al.*, 2011].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La méthode ELISA détecte directement le FXIII-A ou B. Cette méthode est très sensible et fiable pour les faibles valeurs de FXIII, mais elle exige plus de temps et ne peut pas être effectuée automatiquement [Schroeder *et al.*, 2007]. Selon une enquête menée auprès des laboratoires participant au programme *External Quality Control of Diagnostic Assays and Tests* (ECAT) sur la performance des analyses de laboratoire durant la période de 2010 à 2011, seulement 20 % des laboratoires utilisent la méthode ELISA pour quantifier les antigènes FXIII-A et B [Hsu *et al.*, 2014]. Il est souvent difficile de l'intégrer dans le flux de travail d'un laboratoire de coagulation soit parce que la technique est encore manuelle ou parce qu'elle est utilisée dans un mode de traitement par lot, c.-à-d. que les échantillons doivent être collectés – parfois pendant plusieurs jours – avant que l'analyse soit effectuée et que seules les bandes entières (habituellement huit tests) peuvent être utilisées pour un dosage [Kappel et Ehm, 2010]. Ces méthodes peuvent être également difficiles à intégrer en milieu péri-opératoire où des résultats doivent être obtenus rapidement. Généralement, des analyses immunologiques maison sont utilisées pour mesurer les sous-unités du FXIII, le FXIII-A ou le complexe FXIIIA₂B₂ [Raut *et al.*, 2007].

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : les tests ne remplacent pas une analyse existante.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

La détection des FXIII-A et B permet la classification de la déficience en FXIII et orientera le choix du traitement de remplacement. La méthode ELISA est recommandée aux fins du diagnostic et de la classification du FXIII parce qu'elle permet la mesure directe des FXIII-A et B en utilisant des anticorps spécifiques et la surveillance thérapeutique de la déficience en FXIII [Fadoo *et al.*, 2013; Kessel *et al.*, 2013; Kohler *et al.*, 2011; Muszbek *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2007].

Le développement des anticorps non neutralisants est rarement observé et l'effet clinique de la présence de ces anticorps n'est pas connu. Chez certains auteurs, la méthode ELISA ou la technique dite « hybridation sur tache » (*dot blot*) sont nécessaires pour détecter ces anticorps [Kessel *et al.*, 2013; Kohler *et al.*, 2011; Muszbek *et al.*, 2011].

5.1.3 Valeur thérapeutique

La valeur thérapeutique des nouvelles analyses concerne le choix du traitement de remplacement selon les résultats des tests et de la sous-unité du FXIII responsable du déficit. En effet, l'efficacité du traitement dépend de la présence ou non des anticorps anti-FXIII non neutralisants.

5.2 Validité clinique

Aucune étude portant sur la validité clinique de la détection des sous-unités A et B du FXIII ou des anticorps non neutralisants anti-FXIII n'a été repérée. Il est à noter que le déficit

congénital en FXIII est une maladie extrêmement rare. Selon le *Canadian Hemophilia Registry*⁴¹, ce déficit a été diagnostiqué en 2013 chez 54 Canadiens, dont 31 ont des formes graves. Environ 300 cas sont décrits dans le monde selon le *Registre international du déficit en FXIII*⁴².

5.3 Validité analytique (ou technique)

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

Très peu d'études ont publié des résultats sur la validité analytique de la méthode ELISA servant à la détection des sous-unités A ou B du FXIII. Aucune étude publiée sur la détection des anticorps anti-facteur XIII non neutralisants n'a été repérée.

Précision

Sous-unité A du FXIII

La monographie de la trousse TECHNOZYM®ELISA rapporte une variation inter-essai entre 3,7 et 4,2 % (2 échantillons plasmatiques et 4 essais) quant aux masses volumiques situées entre $7,45 \pm 0,28$ µg/ml et $1,16 \pm 0,06$ µg/ml, respectivement, pour la détection de la sous-unité A. La variation intra-essai est estimée entre 3,1 et 5,3 % (2 échantillons plasmatiques et 5 essais) quant aux masses volumiques situées entre $8,28 \pm 0,26$ µg/ml et $1,14 \pm 0,06$ µg/ml, respectivement [Technoclone, 2010a].

Une étude publiée sous forme de résumé a utilisé les mêmes trousse et indique également une bonne précision testée sur deux concentrations de plasma témoin : coefficient de variation (CV) inter-essai de 6,4 % et CV intra-essai de 4,6 % [Vetr *et al.*, 2010].

La méthode ELISA, élaborée par Katona et ses collaborateurs [2001], présente une bonne précision pour trois catégories de plasmas (20 mesures pour chacun) et une variabilité intra-essai de 5,9 % (plasma témoin à basse concentration fourni par la compagnie Dade Behring), de 5,98 % (plasma d'un patient qui a une déficience en FXIII) et de 3,11 % (plasma normal fourni par la compagnie Dade Behring). La précision quotidienne sur 16 mesures est de 7,15 % et de 9,98 % pour ce qui est des plasmas normaux et à basses concentrations (fournis par la compagnie Dade Behring).

⁴¹ Canadian Hemophilia Registry. Rare coagulation disorders. 2013. Disponible à : <http://fhs.mcmaster.ca/chr/pdf/13/CHRRareCoag130517.pdf>.

⁴² Factor XIII Registry Database. Introduction to FXIII deficiency [site Web]. Disponible à : [http://www.f13-database.de/\(i4n\)5451kccdtjngjc31n45\)/content.aspx?menu=1,39](http://www.f13-database.de/(i4n)5451kccdtjngjc31n45)/content.aspx?menu=1,39).

Sous-unité B du FXIII

La monographie de la trousse TECHNOZYM®ELISA rapporte une variation inter-essai entre 1,1 % et 7,3 % (2 échantillons plasmatiques et 3 essais) quant aux masses volumiques situées entre $14,04 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ et $2,01 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$, respectivement, pour la détection de la sous-unité B. Le CV intra-essai varie entre 2,2 % et 3,4 % (2 échantillons plasmatiques et 5 essais) quant aux masses volumiques situées entre $13,27 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$ et $1,93 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$, respectivement [Technolone, 2010b].

Vetr et ses collaborateurs [2010] ont utilisé ces mêmes trousse et ont rapporté des CV inter-essai de 6,4 % et des CV intra-essai de 4 % pour deux concentrations de plasma témoin.

Répétabilité

Murdock et ses collaborateurs [1992] ont conçu une procédure ELISA aux fins de détection des sous-unités FXIII-A et B. Les normes ont été établies à partir d'un pool de 20 plasmas normaux ayant des concentrations de sous-unités A et B de 100 U/dl (100 %). Les variations observées pour les mesures des sous-unités A et B ont été exprimées en moyenne de concentration plasmatique, contre une courbe standard en duplicata. Toutefois, les auteurs de cette étude n'ont pas clairement décrit si les résultats tels que fournis représentent une moyenne des valeurs obtenues ou la variation observée.

Variation intra-essai (plasma normal et anormal, mesuré 10 fois) :

- Sous-unité A du FXIII :
 - Plasma normal (moyenne) : $110,7 \text{ U/dl} \pm 3,3$
 - Plasma anormal (moyenne) : $50,6 \text{ U/dl} \pm 3,4$
- Sous-unité B du FXIII :
 - Plasma normal (moyenne) : $109,9 \text{ U/dl} \pm 1,3$
 - Plasma anormal (moyenne) : $34,3 \text{ U/dl} \pm 1,5$

Variation inter-essai (plasma normal mesuré 4 fois, en 10 analyses distinctes) :

- Sous-unité A du FXIII :
 - Plasma normal (moyenne) : $104,1 \text{ U/dl} \pm 3,9$
- Sous-unité B du FXIII :
 - Plasma normal (moyenne) : $104,8 \text{ U/dl} \pm 2,9$

Reproductibilité

Pour Katona et ses collaborateurs [2000], la reproductibilité intralot de la méthode ELISA sur 20 plasmas dilués avec des concentrations de FXIII normales (moyenne : $19,4 \pm 0,38 \text{ mg/l}$) et basses (moyenne : $1,94 \pm 0,064 \text{ mg/l}$) est bonne : les coefficients de variation obtenus sont de 2,0 % et 3,3 %, respectivement. La variation interjournalière pour 10 échantillons de plasma avec des concentrations normales de FXIII (moyenne de $19,4 \pm 1,06 \text{ mg/l}$) était de 5,5 % et de 8,7 % pour 9 échantillons plasmatiques avec des concentrations basses (moyenne : $2,38 \pm 0,21 \text{ mg/l}$).

Linéarité

Les résultats des deux essais Technozym FXIII ELISA utilisés pour les mesures du FXIII-A et B sont linéaires sur un large intervalle de concentrations.

Monographie de la trousse TECHNOZYM®ELISA Technoclone [2010] :

- Sous-unité A : 1-20 µg/ml (9,5 % à 195 %) pour une dilution de plasma à 1 : 1 000.
- Sous-unité B : 2-40 µg/ml pour une dilution de plasma à 1 : 1 000.

Vetr et ses collaborateurs [2010] :

- Sous-unité A : 1-20 µg/ml (9,5 % à 195 % de la concentration normale) $R^2 = 0,998$;
- Sous-unité B : 2-40 µg/ml, $R^2 = 0,997$.

Limite de détection

Sous-unité A du FXIII

La limite inférieure de détection est de 0,35 µg/ml pour une dilution de plasma à 1:1000. Cela correspond à 3,3 % de la concentration moyenne normale de FXIII-A plasmatique. La sensibilité peut être augmentée jusqu'à 0,033 % en utilisant une dilution de plasma de 1:10 pour les échantillons avec des concentrations extrêmement faibles [Technoclone, 2010a].

La limite inférieure de détection est de 0,35 µg/ml, indépendamment de la dilution plasmatique. Elle est de 0,4 à 40 µg/ml pour une dilution de plasma recommandée de 1 000 fois et aussi faible que 4 ng/ml pour une dilution de plasma de 10 fois correspondante à une limite de détection de concentration de FXIII-A de 0,04 % chez les sujets sains [Katona *et al.*, 2001].

Sous-unité B du FXIII

La limite inférieure de détection est de 0,9 µg/ml pour une dilution de plasma à 1:1000. La sensibilité peut être augmentée jusqu'à 0,009 µg/ml en utilisant une dilution de 1:10 de plasma pour les échantillons avec des concentrations extrêmement faibles [Technoclone, 2010b].

Spécificité analytique

Katona et ses collaborateurs [2000] ont analysé la spécificité analytique de la méthode ELISA par : 1) l'étude de la réaction croisée avec les sous-unités libres de FXIII; 2) l'influence de la présence de sous-unités de FXIII libre; et 3) l'influence de la liaison du FXIII au fibrinogène. Aucune réaction avec le FXIII-A₂ cellulaire ou avec le FXIII-B libre n'a été observée même lorsque les sous-unités du FXIII étaient présentes en une concentration molaire quatre fois plus élevée que la limite de linéarité du tétramère FXIII-A₂B₂ qui est de 40 µg/l. L'ajout des sous-unités FXIII-A et B libres au tétramère FXIII-A₂B₂, même en une concentration molaire de 80 µg/l n'a pas eu d'influence sur la concentration du FXIII plasmatique mesurée (résultats non rapportés).

Pour tester si la liaison du fibrinogène avec le FXIII plasmatique influe sur la disponibilité des épitopes respectifs qui réagissent avec les anticorps anti-FXIII-A et B utilisés, l'analyse a été réalisée avec le FXIII plasmatique purifié en présence ou en l'absence de fibrinogène. La présence de 2 g/l de fibrinogène purifié n'a eu aucune influence sur l'absorbance mesurée à diverses concentrations de FXIII (de 1 à 20 mg/l).

Dans une autre série d'expériences, des concentrations de FXIII ont été déterminées à partir du plasma d'un patient présentant un déficit grave en FXIII (0,061 mg/l) contenant une quantité normale de fibrinogène auquel est ajouté du FXIII purifié (1,5 mg/l et 15,0 mg/l) dans deux échantillons distincts. Comme le FXIII plasmatique, en raison de sa faible constante de dissociation (K_{d10} à 8 M), est pleinement associé au fibrinogène, il était

important d'exclure l'influence possible du fibrinogène sur le dosage. Les concentrations de FXIII obtenues (1,48 mg/l et 15,0 mg/l, respectivement) indiquent une récupération du FXIII ajouté de 94,7 % (1,42 mg/l) et de 100 % (15,0 mg/l). Par ailleurs, ni le fibrinogène ni d'autres composants du plasma n'interfèrent avec le FXIII lié aux anticorps monoclonaux utilisés dans cette méthode. Les auteurs concluent que même des traces de FXIII (0,061 mg/l ou 61 µl ou 0,29 %) dans le plasma pourraient être mesurées de façon fiable.

Le fabricant de la trousse TECHNOZYM®ELISA (Technolone) rapporte que les résultats du FXIII-A ou du FXIII-B ne sont pas influencés par les concentrations plasmatiques du fibrinogène ou par la présence de l'une ou de l'autre des sous-unités, selon le type de dosage.

Yorifuji et ses collaborateurs [1988] ont testé la méthode ELISA pour le FXIII-A et B et le complexe FXIII_A₂B₂ en utilisant des anticorps polyclonaux anti-A de type IgG (un anticorps de capture et un anticorps marqueur) pour l'analyse de FXIII-A₂, et un anticorps polyclonal anti-B (IgG) pour l'analyse de la protéine B totale (libre et liée au complexe). Il n'y a pas eu de réaction croisée avec ces anticorps : l'anticorps anti-A n'a pas réagi avec le FXIII-B et cela n'a pas été le cas non plus pour ce qui est de l'anticorps anti-B avec le FXIII-A. Le fibrinogène à haute concentration (lorsque le plasma est dilué 400 fois) interfère avec l'association de FXIII-A et l'anticorps, mais n'a pas d'effet sur l'association du FXIII-B avec son anticorps. Ainsi, les échantillons plasmatiques requièrent une dilution (concentration de fibrinogène d'environ 75 à 100 µg/ml).

Katona et ses collaborateurs [2001] ont utilisé deux anticorps monoclonaux biotinylés avec la peroxydase de raifort dirigés contre des épitopes différents sur le FXIII-A (3B2H12 ; anti-FXIII-A-1 et 3A6H7 ; anti-FXIII-A-2). Les auteurs voulaient démontrer que des résultats identiques étaient obtenus avec le FXIII-A lié au complexe FXIII_A₂B₂ et le FXIII-A non lié. L'absorbance obtenue lors de la combinaison des concentrations saturantes des deux anticorps a montré un effet additif, avec un indice d'additivité en ELISA de 82 %. La méthode de régression de Deming a été utilisée pour comparer des résultats de FXIII-A en premier lieu avec ceux du complexe FXIII_A₂B₂ et en second lieu avec l'activité du FXIII. La première comparaison à partir du plasma de 35 sujets sains et de 179 patients a montré une bonne corrélation ($r = 0,965$) avec une concentration moyenne de FXIII-A de 52 % proche de celle du complexe FXIII_A₂B₂ (51 %). La seconde comparaison (FXIII-A par rapport à l'activité du FXIII) à partir de plasmas de 166 patients révèle une corrélation de $r = 0,870$. Le FXIII-A n'était pas influencé par l'addition de FXIII-B. La formation d'un complexe tétramérique A₂B₂ n'influence donc pas l'accessibilité des anticorps anti-FXIII-A-1 et anti-FXIII-A-2 aux épitopes respectifs et la liaison du FXIII au fibrinogène n'interfère pas avec le dosage. Les auteurs concluent donc que la méthode ELISA présente une bonne reproductibilité et une haute sensibilité [Katona *et al.*, 2001].

Stabilité du FXIII-A

Après stockage des échantillons plasmatiques, le FXIII est protégé contre les dommages causés par les étapes de gel et de dégel et conserve son antigénicité et son activité pendant au moins 6 mois à -20°C et -70°C (98,5 % et 106 %, respectivement) [Kárpáti *et al.*, 2010]. La récupération du FXIII-A après un stockage des échantillons plasmatiques de 6 mois à -20°C était de 99,2 % [Katona *et al.*, 2001].

Corrélation

Corrélation entre les mesures des concentrations de FXIII (mg/l) par ELISA avec les mesures de l'activité du FXIII (%) par spectrophotométrie UV chez 60 sujets sains : $r = 0,935$ [Katona *et al.*, 2000].

5.4 Recommandations d'autres organismes

Au Royaume-Uni, le *British Committee for Standards in Haematology* recommande les méthodes immunologiques (tests immunoturbidimétrique ou ELISA) pour la détection des FXIII-A et B, la confirmation diagnostique et la classification du déficit en FXIII tout en précisant que cette étape est jugée importante notamment si un traitement avec la protéine recombinante du FXIII-A est prévu. Le Comité mentionne que le test de solubilité du caillot pour le déficit en FXIII présente une faible sensibilité et peut ne pas être fiable [Mackie *et al.*, 2012]. Ce guide pratique n'aborde pas le suivi thérapeutique et ni la problématique des anticorps non neutralisants.

6 RÉPERCUSSIONS DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines : n'ont pas été analysés.

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 (sociaux, juridiques, politiques)

N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les résultats de la nouvelle analyse permettront de classer le déficit congénital en FXIII et d'instaurer rapidement un traitement substitutif en FXIII-A disponible, s'il s'agit d'un déficit en FXIII-A qui représente la forme clinique la plus fréquente et la plus grave.

Le développement des anticorps non neutralisants chez des patients traités avec le FXIII recombinant est rare; par conséquent, l'effet clinique de la présence de ce type d'anticorps n'est pas connu.

7.2 Validité clinique

Aucune étude sur la validité clinique de ces analyses n'a été repérée.

7.3 Validité analytique

Les données analysées issues des monographies des troussees utilisées par le requérant et de quelques études de validation suggèrent une bonne performance analytique.

7.4 Recommandation d'autres organismes

Utilité clinique reconnue de la détection des sous-unités A et B du FXIII par méthode ELISA avec recommandation de la *British Committee for Standards in Haematology* du Royaume-Uni. Aucune recommandation concernant les anticorps non neutralisants n'a été repérée.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Détection de la sous-unité A et B du facteur XIII et détection d'un anti-facteur XIII non neutralisant, par la méthode ELISA

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 mise en place d'un mécanisme de contrôle de la qualité externe pour la détection de l'anti-facteur XIII dans un contexte de volume insuffisant
- ☐ 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

Notes

- Le mécanisme de contrôle de la qualité externe est essentiel étant donné le faible volume attendu.
- La trousse d'analyse n'est pas homologuée au Canada.
- L'expertise du laboratoire du demandeur justifie que l'analyse soit faite au Québec.

RÉFÉRENCES

- Alhenc-Gelas M. Le facteur XIII, polymorphismes génétiques et conséquences fonctionnelles. *Hématologie* 2000;6(2):131-5.
- Aniara. ZYMUTEST Factor XIII-A. West Chester, OH : Aniara; 2009. Disponible à : <http://www.aniara.com/pdf/INS-ARK034A.pdf>.
- Biomnis. AC anti-facteur. Lyon, France : Biomnis; 2012. Disponible à : http://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/AC_ANTI-FACTEUR.pdf.
- Biswas A, Ivaskevicius V, Thomas A, Oldenburg J. Coagulation factor XIII deficiency. Diagnosis, prevalence and management of inherited and acquired forms. *Hamostaseologie* 2014;34(2):160-6.
- Fadoo Z, Merchant Q, Rehman KA. New developments in the management of congenital Factor XIII deficiency. *J Blood Med* 2013;4:65-73.
- Hsu P, Zantek ND, Meijer P, Hayward CP, Brody J, Zhang X, et al. Factor XIII assays and associated problems for laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: An analysis of International Proficiency testing results. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(2):232-8.
- Inbal A, Oldenburg J, Carcao M, Rosholm A, Tehranchi R, Nugent D. Recombinant factor XIII: A safe and novel treatment for congenital factor XIII deficiency. *Blood* 2012;119(22):5111-7.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: A UK NEQAS study. *J Thromb Haemost* 2003;1(12):2603-8.
- Kappel A et Ehm M. Immunoassays for diagnosis of coagulation disorders. *Hamostaseologie* 2010;30(4):194-201.
- Karimi M, Bereczky Z, Cohan N, Muszbek L. Factor XIII deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(4):426-38.
- Kárpáti L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vámosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 2000;46(12):1946-55.
- Katona E, Ajzner E, Toth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001;258(1):127-35.
- Katona E, Haramura G, Kárpáti L, Fachet J, Muszbek L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A₂B₂). *Thromb Haemost* 2000;83:268-73.
- Kessel R, Hu C, Shore-Lesserson L, Rand J, Manwani D. A child with acquired factor XIII deficiency: Case report and literature review. *Haemophilia* 2013;19(6):814-26.
- Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RAS, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011;9(7):1404-6.

- Lovejoy AE, Reynolds TC, Visich JE, Butine MD, Young G, Belvedere MA, et al. Safety and pharmacokinetics of recombinant factor XIII-A2 administration in patients with congenital factor XIII deficiency. *Blood* 2006;108(1):57-62.
- Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2013;35(1):1-13.
- Murdock PJ, Owens DL, Chitolie A, Hutton RA, Lee CA. Development and evaluation of ELISAs for factor XIIIa and XIIIb subunits in plasma. *Thromb Res* 1992;67(1):73-9.
- Muszbek L, Bagoly Z, Cairoc A, Peyvandi F. Novel aspects of factor XIII deficiency. *Curr Opin Hematol* 2011;18(5):366-72.
- Muszbek L, Ariëns RA, Ichinose A. Factor XIII: Recommended terms and abbreviations. *J Thromb Haemost* 2007;5(1):181-3.
- Raut S, Merton RE, Rigsby P, Muszbek L, Seitz R, Ariëns RA, et al. A collaborative study to establish the 1st International Standard for factor XIII plasma. *J Thromb Haemost* 2007;5(9):1923-9.
- Schroeder V et Kohler HP. Factor XIII deficiency: An update. *Semin Thromb Hemost* 2013;39(6):632-41.
- Schroeder V, Durrer D, Meili E, Schubiger G, Kohler HP. Congenital factor XIII deficiency in Switzerland: From the worldwide first case in 1960 to its molecular characterisation in 2005. *Swiss Med Wkly* 2007;137(19-20):272-8.
- Tahlan A et Ahluwalia J. Factor XIII: Congenital deficiency factor XIII, acquired deficiency, factor XIII A-subunit, and factor XIII B-subunit. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):278-81.
- Technoclone. Monographie des trousses Technozym® FXIII-A SUB ELISA (TEC 5360110). Vienne, Autriche : Technoclone; 2010a. Disponible à : <http://www.diapharma.com/downloads/7192011101110.pdf>.
- Technoclone. Monographie des trousses Technozym® FXIII-B SUB ELISA (TEC 5360120). Vienne, Autriche : Technoclone; 2010b. Disponible à : <http://www.diapharma.com/downloads/7192011101333.pdf>
- Vetr H, Geiter S, Tschokert E, Katona E, Muszbek L. Evaluation of quantification of FXIII antigen and its subunits by ELISA. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2010;37:A120 [abstract P151].
- Wada H, Souri M, Matsumoto R, Sugihara T, Ichinose A. Alloantibodies against the B subunit of plasma factor XIII developed in its congenital deficiency. *Thromb Haemost* 2013;109(4):661-8.
- Yorifuji H, Anderson K, Lynch GW, Van de Water L, McDonagh J. B protein of factor XIII: Differentiation between free B and complexed B. *Blood* 1988;72(5):1645-50.

SÉQUENÇAGE DU FACTEUR VII (RÉFÉRENCE 2014.01.003B)

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** : 1^{er} mars 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 30 juin 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 du gène du facteur VII (F7) par séquençage de Sanger.
- 2.2 **Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques**
Le séquençage par la méthode de Sanger est une technique de base employée en biologie moléculaire : voir Kircher et Kelso [2010] pour consulter la description complète.
- 2.3 **Société ou développeur** : protocole fourni par le demandeur
- 2.4 **Licence** : sans objet.
- 2.5 **Brevet, le cas échéant** : sans objet.
- 2.6 **Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)** : sans objet.
- 2.7 **Valeur pondérée** : 515,0

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

- 3.1 **Patients ciblés**
 - 1) Les apparentés d'un cas démontré de déficience en F7 (DF7), afin d'évaluer leur risque de saignement spontané;

- 2) Les sujets qui ont tendance à saigner anormalement, à avoir un temps de prothrombine élevé et un dosage fonctionnel démontrant une DF7. Pour la majorité de ces cas, un traitement de remplacement du F7 sera offert et aucune analyse moléculaire ne sera effectuée, sauf chez les sujets en âge de procréer (naturellement ou par le biais des techniques de procréation assistée).

3.2 Description de la maladie visée

La DF7 est une maladie hémorragique héréditaire rare due à la diminution de l'expression ou de la fonction du FVII de la coagulation. Sa prévalence est estimée à environ 1/500 000 et est probablement sous-évaluée en raison des cas qui ont peu ou pas de symptômes [Perry, 2002]. L'expression clinique des symptômes hémorragiques est donc très variable, allant d'hémorragies intracérébrales mortelles aux ecchymoses faciles. Plusieurs faits importants sont à considérer : 1) la gravité des symptômes ne corrèle pas nécessairement avec l'activité coagulante résiduelle du FVII muté; 2) les femmes sont surreprésentées parmi les cas symptomatiques; 3) un saignement abondant durant une chirurgie constitue souvent un critère diagnostique chez un cas préalablement asymptomatique. La DF7 est transmise selon le mode autosomique récessif et est attribuable à des mutations du gène *F7*. La consanguinité parentale constitue un important facteur de risque. Les patients homozygotes ou double hétérozygote présentent souvent un syndrome hémorragique; les sujets hétérozygotes sont pour la plupart asymptomatiques [Herrmann *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 1997; Tuddenham *et al.*, 1995]. Le traitement de la DF7 est de type substitutif et repose sur l'administration de FVII plasmatique ou recombinant, mais les indications restent difficiles à poser en préopératoire chez des sujets peu ou pas symptomatiques. La DF7 demeure, dans l'ensemble, une maladie pour laquelle le pronostic est bon. Néanmoins, la morbidité liée aux formes les plus graves chez les cas ne bénéficiant pas d'une prophylaxie substitutive est très élevée, notamment en raison d'un saignement dans le parenchyme cérébral.

Les diagnostics différentiels sont : l'insuffisance hépatique, l'hypovitaminose K, la DF7 acquise à la suite d'une sepsie ou la présence d'autoanticorps.

Tableau 1 Classification des cas de déficience en facteur VII en fonction de la gravité des symptômes (adapté de Lapecorella et Mariani, 2008)

FORMES	CARACTÉRISTIQUES
Grave	Hémorragies mortelles du SNC et du SGI débutant vers l'âge de 6 mois OU hémarthroses associées à d'autres types de saignements
Modérée	≥ 3 symptômes : saignement postopératoire, ménorragie, hématome musculaire, épistaxis, hématurie, ecchymoses faciles, gingivorragie (sauf SNC, SGI et hémarthroses)
Bénigne	1 ou 2 symptômes : voir ci-dessus (sauf SNC, SGI et hémarthroses)

Abréviations : SNC : système nerveux central; SGI : système gastro-intestinal.

3.3 Nombre de patients visés

Selon les informations fournies par le demandeur, environ quatre à cinq familles par année sont visées. L'an passé, une vingtaine de cas ont été séquencés, mais il s'agirait d'une limite supérieure⁴³.

⁴³ Communication téléphonique personnelle avec le D^r Georges-Étienne Rivard du CHU Sainte-Justine (12 mai 2014).

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Conseil génétique, hématologie, pédiatrie, gynécologie et médecine interne.

3.5 Modalités d'administration du test

La détermination du statut du gène *F7* par séquençage se réalise à partir d'un échantillon sanguin, d'une biopsie chorale ou de cellules amniotiques en culture. Étant donné la grande hétérogénéité phénotypique de la DF7, avec notamment des sujets asymptomatiques, le conseil génétique dépendra de la gravité des symptômes à l'intérieur d'une famille.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le gène *F7* est situé sur le chromosome 13q34, contient 9 exons, et code pour une sérine protéase de 50 kDa dont la structure et l'activation sont très homologues à d'autres facteurs (*F9*, *F10* et protéine C) [O'Hara *et al.*, 1987; Hagen *et al.*, 1986]. Les régions codantes, les points de jonction exon/intron et le promoteur du gène *F7* ont fait l'objet de nombreuses études moléculaires par séquençage, méthode très efficace qui a permis de mettre en évidence plus de 250 mutations différentes. Parmi celles-ci, 70 % à 80 % sont de type faux-sens [McVey *et al.*, 2001]. Les autres cas concernent assez fréquemment les sites d'épissage et incluent des mutations non-sens ou de petites délétions [Pinotti *et al.*, 2006; Bernardi *et al.*, 1993]. De grands réarrangements géniques ont aussi été mis en évidence, mais il semble que ce type de mutations soit peu recherché, donc certainement sous-estimé [Giansily-Blaizot *et al.*, 2007].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le diagnostic moléculaire de la DF7 est utile notamment lorsque les données fonctionnelles sont incertaines, lorsque le patron de transmission est absent ou lorsqu'un diagnostic/dépistage prénatal est envisagé.

4.4 Coût de la technologie et des options

Selon les informations fournies par le demandeur, le coût du matériel et des réactifs nécessaires à l'amplification et au séquençage représente 80 % de la valeur pondérée.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence et validité clinique

5.1.1 Remplacement par un autre test

Actuellement, le laboratoire demandeur est la seule ressource disponible au Québec. Les échantillons sont fréquemment envoyés à l'extérieur de la province (*Centre for Blood Research*, Vancouver ou à l'*Italian National Blood Centre, National Institute of Health*, Rome).

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

La caractérisation génétique des mutations du *F7* se fait seulement dans certains cas, et en complémentarité avec l'évaluation clinique et les tests fonctionnels.

Les défauts de la coagulation peuvent simplement être classés selon les manifestations cliniques : graves, modérées ou légères (tableau 1), selon l'activité coagulante (FVII:C) et des essais enzymatiques ou encore au moyen des techniques de biologie moléculaire. Le diagnostic de la DF7 est relativement simple, car il s'agit du seul syndrome hémorragique héréditaire qui se caractérise par un temps de prothrombine prolongé, isolé. Chez ces patients, contrairement aux hémophiles de type A ou B, il existe une faible corrélation entre l'activité coagulante observée en laboratoire et la gravité des saignements, ce qui se traduit par une grande variabilité clinique. Toutefois, les nouveau-nés et les jeunes enfants qui ont un faible niveau de FVII:C sont à haut risque de saignements graves [Mariani *et al.*, 2005].

Les essais fonctionnels du facteur VII comportent certains problèmes analytiques liés aux sources multiples de thromboplastine (humaine comparativement à bovine) et à la présence de FVII exogène dans les substrats [Takamiya *et al.*, 2007]. L'utilisation d'un plasma témoin standardisé comme référence et de thromboplastine recombinante comme substrat contribue à diminuer la variabilité interlaboratoire, surtout entre une activité FVII:C basse et très basse [Zantek *et al.*, 2013; Takamiya *et al.*, 2007]. L'utilisation d'un test immunoenzymatique permet de mesurer le niveau sérique de FVII produit (noté FVII:Ag). Le test FVII:Ag est utile pour déterminer les formes inactives de FVII produites par certaines mutations, lesquelles présentent un niveau antigénique normal et une activité FVII:C réduite. On classe en deux types les DF7, soit le type I avec FVII:C et FVII:Ag ↓ et le type II avec FVII:C ↓ et FVII:Ag =. Généralement, seuls les cas de DF7 présentant des taux de FVII:C < 20 % sont symptomatiques [Bernardi *et al.*, 2009]. Selon Girolami et ses collaborateurs [2012], l'analyse moléculaire devrait être considérée comme complémentaire à l'analyse fonctionnelle. Elle permet d'apporter des informations supplémentaires notamment en établissant le domaine protéique touché (catalytique, liaison au facteur tissulaire, etc.), le type de mutation (non-sens, faux-sens, épissage, etc.) et son effet probable (protéine modifiée, tronquée, aberrante ou absente). Pour certains auteurs, les informations moléculaires ne semblent pas nécessaires à la prise en charge adéquate d'un proposant [Girolami *et al.*, 2012] alors que pour d'autres, elles sont essentielles à la compréhension globale de la DF7 et à l'élaboration de protocoles thérapeutiques standardisés [Salcioglu *et al.*, 2012].

La variabilité clinique et le patron mutationnel influencent les soins et les traitements. L'analyse génotypique de 717 cas de DF7 figurant au *Greifswald Registry of FVII Deficiency*⁴⁴ a permis de mettre en évidence 131 mutations différentes chez 73 porteurs homozygotes (HMZ), 145 doubles hétérozygotes (dHTZ) et 499 hétérozygotes (HTZ). Parmi les porteurs de mutations bialléliques, 71 % et 50 % des homozygotes et hétérozygotes, respectivement, étaient symptomatiques. La prévalence des différents symptômes est similaire pour les cas HMZ et dHTZ [Herrmann *et al.*, 2009] (tableau 2). Les données issues du *Rare Bleeding Disorder Registry* apportent des informations complémentaires notamment en ce qui concerne la prise en charge thérapeutique des événements spontanés et les traitements prophylactiques préchirurgicaux les plus souvent utilisés, et ce, en fonction du génotype [Acharya *et al.*, 2004] (tableau 2). L'efficacité clinique et l'innocuité de différents régimes prophylactiques (facteur VII recombinant activé, plasma frais congelé et F7 concentré) ont été vérifiées auprès de 38 cas de DF7 d'origine congénitale du *Seven Treatment Evaluation Registry*. Bien que le statut moléculaire de 20 patients était connu (14 doubles hétérozygotes et 6 homozygotes), aucune analyse n'a été réalisée en fonction de ce dernier

⁴⁴ *Greifswald Registry of FVII Deficiency* est un registre international mis en place en 1994 [Herrmann *et al.*, 2009].

[Napolitano *et al.*, 2013]. L'étude montre qu'une certaine partie des cas de DF7 nécessite une prophylaxie afin d'éviter la survenue de saignements majeurs, et ce, indépendamment du statut du gène *F7* [Napolitano *et al.*, 2013].

Tableau 2 Caractéristiques cliniques et génotypiques des patients atteints de déficit du facteur VII

ÉTUDES	GÉNOTYPE (N)	FVII:C % [ÉTENDUE]	SYMPTÔMES											TRAITEMENTS ET PROPHYLAXIE*					
			%	DISTRIBUTION (%)										%	TYPES				
				Ic	Gi	Ha	Ht	Ex	Gv	Ec	Hu	Mn	PFC		CCPa	cryoP	F7C	AEAC	
Herrmann 2009 N = 717	HMZ (73)	5 [0-31]	71	2	17	13	15	58	38	37	10	73	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	
	dHTZ (145)	6 [0-40]	50	3	14	22	21	61	31	36	7	63							
	HTZ (499)	46 [12-67]	19	0	0	4	21	50	13	35	5	19							
Acharya 2004 N =137	HMZ (49)	8 [1-18]	54	2	16	21		60			3	n. r.	73	35	14	-	14	10	
	HTZ (88)	35 [21-69]	36	4	11	7		76			2	n. r.	44	26	-	5	5	8	

Abréviations : AEAC : acide ε-aminocaproïque ; CCPa : concentré de complexe prothrombique activé ; cryoP : cryoprécipités ; dHTZ : double hétérozygote ; Ec : ecchymoses ; Ex : épistaxis ; F7C : F7 concentré ; Gv : hémorragie gingivale, Gi : hémorragie gastro-intestinale ; Ha : hémarthrose, HMZ : homozygote ; Ht : hématome ; HTZ : hétérozygote ; Hu : hématurie ; Ic : hémorragie intra crânienne ; Mn : ménorragie ; N : nombre de patients ; n. d. : non disponible ; n. r. : non rapporté ; PFC : plasma frais congelé.

*Prophylaxie périopératoire

Bernardi et ses collaborateurs [2009]

Les différences sur le plan des patrons mutationnels (tableau 3) expliquent en partie les différences phénotypiques (risque hémorragique, types et gravité des symptômes, âge d'apparition, pourcentage d'activité coagulante) entre DF7 et DF9. Un faible niveau de FVII maintient l'hémostase mieux qu'une réduction équivalente en facteur IX (FIX). Toutefois, de faibles quantités de FVII, contrairement au FIX, sont requises afin de prévenir la survenue d'hémorragies fatales, tel comme l'indique la faible prévalence de mutations nulles du gène *F7* et leur association à des symptômes mortels. Cela constitue des différences cliniques notables entre les deux maladies lorsque les niveaux d'activité sont faibles [Bernardi *et al.*, 2009].

Tableau 3 Différences phénotypiques entre les déficits de facteurs VII et IX

ÉTUDE	N ^{BRE} DE CAS (âge)	ACTIVITÉ:C* n ^{bre} de cas (%)	AVEC SYMPTÔMES n ^{bre} de cas (%)	GÉNOTYPE			ANALYSES
				n ^{bre} de cas	STATUT	MUTATIONS	
Bernardi 2009	DF7 109 H (29 ± 17)	G : 33 (30) M : 38 (35) L : 38 (35)	30 (91) 30 (79) 16 (42)	74	41 HMZ 33 dHTZ	Faux-sens 78 % Épissage 17 % Nulles† 5 %	DF7 comparativement à DF9 Mutations nulles : 5 vs 13 %; $p < 0,001$ 1 ^{er} saignement : 2 vs 5 ans; $p < 0,001$ Risque de saignement majeur : F7:C (≤ 1-20) = F9:C (5-20 %); $p = 0,96$
	DF9 296 (32 ± 18)	G : 114 (39) M : 120 (44) L : 62 (21)	110 (97) 104 (87) 45 (73)	177	177 HTZ	Faux-sens 85 % Épissage 2 % Nulles† 13 %	

Abréviations : DF7 : déficit en facteur VII; DF9 : déficit en facteur IX; dHTZ : double hétérozygote; G : déficit grave; H : homme; HMZ : homozygote; HTZ : hétérozygote; L : déficit léger; M : déficit modéré; nbre : nombre.

*L'activité :C indique le niveau de déficit, soit : grave (activité ≤ 1 %) ; modéré (activité entre > 1 % et 5 %) ; ou léger (activité entre > 5 % et 20 %).

†Mutations nulles : non-sens, indels ou changement de cadre de lecture.

L'analyse moléculaire du gène *F7* sert à caractériser certains phénotypes cliniques observés parmi certains groupes ethniques isolés ou à forte concentration de mariages consanguins.

Les études publiées par Elmahmoudi et ses collaborateurs [2012] et Borhany et ses collègues [2013] avaient comme principal objectif de détecter les mutations du gène *F7* chez dix patients d'origine tunisienne et pakistanaise, respectivement, et d'étudier les phénotypes associés (tableau 4).

Tableau 4 Caractéristiques phénotypiques et génotypiques chez des patients d'origine tunisienne et pakistanaise

ÉTUDE	N ^{BRE} DE CAS	FVII:C % [étendue]	SYMPTÔMES (%)									MUTATIONS	AUTRES
			Gi	Ha	Ex	Gv	Ec	Ht	Hu	Mn	As		
Borhany 2013	10 6 H/4 F 5 ans [2-24]	med 2 [2-37]	20	30	80	70	60	40	10	25	10	Nombre = 9, 5 nouvelles 7 HMZ : FS (7) 1 dHTZ : FS (2) 1 HTZ : promoteur	Forme grave requérant une intervention urgente (40 %) Famille consanguine (60 %)
Elmahmoudi 2012	10 6 H/4 F 14-64 ans	moy 13 med 5 [2-40]	10	10	70	50	?	nd	nd	100	10	Nombre = 5, 1 nouvelle 1 HMZ : FS (1) 4 HTZ : FS (2), Épis (2)	5/10 ont reçu un CCP pour traiter des épisodes de saignements

Abréviations : As : asymptomatique; CCP : concentré de complexe prothrombique; dHTZ : double hétérozygote; Ec : ecchymoses ; Épis : épissage; Ex : épistaxis ; F : féminin; FS : faux-sens; Gi : gastro-intestinal; H : homme; Ha : hémarthrose ; HMZ : homozygote; Ht : hématome ; HTZ : hétérozygote; Hu : hématurie ; med : médiane; Mn : ménorragie ; moy : moyenne; nd : non déterminé.

Certaines coagulopathies comportant une déficience de multiples facteurs ont été décrites parmi des populations présentant un haut niveau de consanguinité. Ainsi, l'analyse moléculaire devient un outil essentiel afin d'éviter les diagnostics erronés chez les proposants de même que les résultats faux-négatifs en dépistage prénatal [Menegatti *et al.*, 2004].

Un risque thromboembolique existe chez les porteurs de mutations du gène *F7* et ce risque varie selon les caractéristiques cliniques.

Giansily-Blaizot et ses collaborateurs indiquent que plus de 30 événements thromboemboliques (ETE) ont été décrits chez des patients atteints de DF7, soit chez des patients « asymptomatiques », soit chez des patients atteints de diathèse hémorragique. Ce fait porte à croire qu'une faible FVII:C ne protège pas contre les ETE [Giansily-Blaizot *et al.*, 2012]. Bien que le sujet soit encore débattu, il est généralement admis que l'incidence des ETE est rare et surtout associée : 1) aux interventions chirurgicales; 2) aux traitements de remplacement avec F7 activé; ou 3) à la présence de certains variants (p. ex. R304Q, A294V) [Girolami *et al.*, 2010; Marty *et al.*, 2008]. Donc, il semble tout à fait approprié de prévoir une prophylaxie antithrombotique péri-opératoire chez les patients DF7 qui répondent à ces critères. Toutefois, un consensus thérapeutique n'est pas encore établi [Giansily-Blaizot *et al.*, 2012].

5.2 Validité analytique (ou technique)

En l'absence d'un pedigree familial complet nécessaire à l'analyse du patron de transmission de la maladie, le séquençage classique de type Sanger pourrait rater la détection d'un

réarrangement génomique.

Selon Giansily-Blaizot et ses collaborateurs, les réarrangements génomiques mettant en cause de larges fragments pourraient expliquer une certaine partie des mutations causales de la DF7 [Giansily-Blaizot *et al.*, 2007]. Toutefois, ce genre de mutation n'est pas détectable par les techniques traditionnelles de PCR et de séquençage, ce qui pourrait mener à un diagnostic erroné. Les auteurs ont repéré, à l'aide d'une méthode de PCR multiplex semi-quantitative, deux cas où il y avait réarrangements parmi les 43 cas de DF7 testés (2,3 %).

Les données moléculaires doivent être mises en perspective avec les symptômes cliniques et l'analyse phénotypique afin d'éviter les résultats faux-positifs ou faux-négatifs.

Garangiola et ses collaborateurs décrivent un cas de dépistage prénatal, d'une famille atteinte de DF7 grave, pour lequel une erreur d'amplification du gène *F7* a conduit à une mauvaise interprétation des résultats de séquençage. Après l'investigation, les auteurs ont conclu que l'erreur provenait de l'utilisation d'un oligonucléotide apparié à une région riche en séquences répétitives [Garangiola *et al.*, 2003].

5.3 Recommandations d'autres organismes

Étant donné la faible corrélation entre l'activité coagulante du gène *F7* et le risque de saignement, le diagnostic moléculaire devrait être réservé à la résolution des cas incertains ou à ceux dont le patron de transmission n'est pas clair. Le diagnostic génétique prénatal devrait être proposé uniquement lorsqu'il y a présence d'antécédents familiaux de saignements graves. Ces énoncés sont tirés de la page Web du *Rare Bleeding Disorders*⁴⁵, conçue en collaboration avec l'*Indiana Hemophilia & Thrombosis Center*, et le *Rare Coagulation Disorders Subcommittee* de la *National Hemophilia Foundation Medical and Scientific Advisory Council*.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

Peu d'effets observés, étant donné la rareté des cas.

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

Le dépistage des apparentés, y compris le diagnostic moléculaire, pourrait permettre une évaluation plus rigoureuse du risque hémorragique préopératoire. L'exposition périopératoire du patient aux produits sanguins ou aux facteurs de coagulation recombinants se traduit par une augmentation des coûts directs de ces produits et des risques d'événements secondaires (maladies liées aux transfusions, réactions allergiques, etc.) [Girolami *et al.*, 2012; Kinkel *et al.*, 2010].

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

N'ont pas été évalués.

⁴⁵ Rare Coagulation Disorders Resource Room. Factor VII Deficiency Laboratory Evaluation [site Web]. Disponible à : <http://www.rarecoagulationdisorders.org/diseases/factor-vii-deficiency/laboratory-evaluation-3> (consulté le 17 juin 2014).

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La caractérisation génétique des mutations du gène *F7* se fait en complémentarité avec l'évaluation clinique et les résultats issus des tests fonctionnels seulement dans les cas incertains, surtout les jeunes enfants, lorsque le patron de transmission est absent ou aux fins du diagnostic prénatal.

7.2 Validité clinique

La DF7 est une maladie rare et peu connue. Le séquençage classique a été utilisé dans plusieurs études afin de détecter plus de 250 mutations différentes dont l'expression clinique est influencée par la diversité ethnique. De multiples efforts à l'échelle internationale sont réalisés afin de répertorier les données phénotypiques et génotypiques de tous les cas de DF7.

7.3 Validité analytique

En l'absence d'un pedigree familial complet nécessaire à l'analyse du patron de transmission de la maladie, le séquençage classique de type Sanger pourrait rater le repérage d'un réarrangement génomique.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Le séquençage est recommandé chez les cas mentionnés à la section 7.1.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Séquençage du facteur VII

Statut de la technologie diagnostique

- ☒ Établie mais non validée pour cette analyse
- ☐ Innovatrice
- ☐ Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- ☐ Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

Recommandation de l'INESSS

- ☒ Avis de recommandation d'introduction après validation par le laboratoire
- ☐ 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

En raison de la rareté de l'analyse qui rend le contrôle de la qualité difficile, le séquençage du facteur VII pourrait être fait à l'extérieur de la province. Toutefois, l'expertise du laboratoire du demandeur justifie qu'il soit réalisé au Québec.

RÉFÉRENCES

- Acharya SS, Coughlin A, DiMichele DM, North American Rare Bleeding D. Rare bleeding disorder registry: Deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII fibrinogen and dysfibrinogenemias. *J Thromb Haemost* 2004;2(2):248-56.
- Bernardi F, Dolce A, Pinotti M, Shapiro AD, Santagostino E, Peyvandi F, et al. Major differences in bleeding symptoms between factor VII deficiency and hemophilia B. *J Thromb Haemost* 2009;7(5):774-9.
- Bernardi F, Patracchini P, Gemmati D, Ferrati M, Arcieri P, Papacchini M, et al. Molecular analysis of factor VII deficiency in Italy: A frequent mutation (FVII Lazio) in a repeated intronic region. *Hum Genet* 1993;92(5):446-50.
- Borhany M, Boijout H, Pellequer JL, Shamsi T, Moulis G, Aguilar-Martinez P, et al. Genotype and phenotype relationships in 10 Pakistani unrelated patients with inherited factor VII deficiency. *Haemophilia* 2013;19(6):893-7.
- Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Banner DW, Tuddenham EG. Inherited factor VII deficiency: Molecular genetics and pathophysiology. *Thromb Haemost* 1997;78(1):151-60.
- Elmahmoudi H, Ben-Lakhal F, Elborji W, Jilizi A, Zahra K, Sassi R, et al. Identification of genetic defects underlying FVII deficiency in 10 patients belonging to eight unrelated families of the North provinces from Tunisia. *Diagn Pathol* 2012;7:92.
- Garagiola I, Palla R, Peyvandi F. Pitfalls in molecular diagnosis in a family with severe factor VII (FVII) deficiency—Misdiagnosis by direct sequence analysis using a PCR product. *Prenat Diagn* 2003;23(9):731-4.
- Giansily-Blaizot M, Marty S, Chen SW, Pellequer JL, Schved JF. Is the coexistence of thromboembolic events and Factor VII deficiency fortuitous? *Thromb Res* 2012;130(Suppl 1):S47-9.
- Giansily-Blaizot M, Thorel D, Khau Van Kien P, Behar C, Romey MC, Mugneret F, et al. Characterisation of a large complex intragenic re-arrangement in the FVII gene (F7) avoiding misdiagnosis in inherited factor VII deficiency. *Br J Haematol* 2007;138(3):359-65.
- Girolami A, Treleani M, Scarparo P, Bonamigo E, Lombardi AM. Considerations on a tentative classification of FVII deficiency suited for practical clinical purposes. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18(6):654-7.
- Girolami A, Tezza F, Scandellari R, Vettore S, Girolami B. Associated prothrombotic conditions are probably responsible for the occurrence of thrombosis in almost all patients with congenital FVII deficiency. Critical review of the literature. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30(2):172-8.
- Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Saari GC, Woodbury RG, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(8):2412-6.
- Herrmann FH, Wulff K, Auerswald G, Schulman S, Astermark J, Batorova A, et al. Factor VII deficiency: Clinical manifestation of 717 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 7 gene. *Haemophilia* 2009;15(1):267-80.

- Kircher M et Kelso J. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays* 2010;32(6):524-36.
- Kirkel D, Lin TW, Fu SW, Dlott JS, Sahud MA, McCaffrey T, Rickles FR. Asymptomatic factor VII deficiency: Gene analysis and structure-function relationships. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21(1):91-4.
- Lapcorella M et Mariani G. Factor VII deficiency: Defining the clinical picture and optimizing therapeutic options. *Haemophilia* 2008;14(6):1170-5.
- Mariani G, Herrmann FH, Dolce A, Batorova A, Etro D, Peyvandi F, et al. Clinical phenotypes and factor VII genotype in congenital factor VII deficiency. *Thromb Haemost* 2005;93(3):481-7.
- Marty S, Barro C, Chatelain B, Fimbel B, Tribout B, Reynaud J, et al. The paradoxical association between inherited factor VII deficiency and venous thrombosis. *Haemophilia* 2008;14(3):564-70.
- McVey JH, Boswell E, Mumford AD, Kemball-Cook G, Tuddenham EG. Factor VII deficiency and the FVII mutation database. *Hum Mutat* 2001;17(1):3-17.
- Menegatti M, Karimi M, Garagiola I, Mannucci P, Peyvandi F. A rare inherited coagulation disorder: combined homozygous factor VII and factor X deficiency. *Am J Hematol* 2004;77(1):90-1.
- Napolitano M, Giansily-Blaizot M, Dolce A, Schved JF, Auerswald G, Ingerslev J, et al. Prophylaxis in congenital factor VII deficiency: Indications, efficacy and safety. Results from the Seven Treatment Evaluation Registry (STER). *Haematologica* 2013;98(4):538-44.
- O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen FS, Murray MJ. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5158-62.
- Perry DJ. Factor VII Deficiency. *Br J Haematol* 2002;118(3):689-700.
- Pinotti M, Rizzotto L, Pinton P, Ferraresi P, Chuansumrit A, Charoenkwan P, et al. Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII. *J Thromb Haemost* 2006;4(6):1308-14.
- Salcioglu Z, Akcay A, Sen HS, Aydogan G, Akici F, Tugcu D, et al. Factor VII deficiency: A single-center experience. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18(6):588-93.
- Takamiya O, Ishikawa S, Ohnuma O, Suehisa H, Iijima K, Kayamori Y, et al. Japanese collaborative study to assess inter-laboratory variation in factor VII activity assays. *J Thromb Haemost* 2007;5(8):1686-92.
- Tuddenham EG, Pemberton S, Cooper DN. Inherited factor VII deficiency: Genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost* 1995;74(1):313-21.
- Zantek ND, Hsu P, Refaai MA, Ledford-Kraemer M, Meijer P, Van Cott EM. Factor VII assay performance: An analysis of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association proficiency testing results. *Int J Lab Hematol* 2013;35(3):314-21.

PANEL DE GÈNES – SYNDROME DE NOONAN (RÉFÉRENCE – 2014.01.004)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHUS

1.2 Date de transmission de la demande d'examen au MSSS : 26 janvier 2014

1.3 Date de réception de la demande à l'INESSS : 1^{er} mars 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juin 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 panel de gènes selon une approche de haut débit (nouvelle génération (NGS) ou séquençage massivement parallèle).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le séquençage de nouvelle génération permet d'obtenir rapidement et à moindre coût la séquence de plusieurs gènes simultanément, d'exomes ou de génomes entiers. Le demandeur prévoit effectuer le séquençage des exons et des séquences adjacentes aux sites d'épissage de 14 gènes associés au syndrome de Noonan et à certains syndromes apparentés selon cette approche. Les gènes *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NF1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* et *SPRED1* ont été sélectionnés suivant la révision des preuves scientifiques sur leur pertinence clinique.

Le séquençage est effectué en trois étapes : la préparation de l'échantillon/production de la banque de gènes (librairie), le séquençage et l'analyse des résultats. Brièvement, par suite de la fragmentation de l'ADN et de l'ajout d'oligonucléotides adaptateurs qui permettront le séquençage, un enrichissement des régions d'intérêt est effectué par capture d'hybrides suivi d'une PCR en utilisant une trousse sur mesure SeqCap Ez de Nimblegen. Les oligonucléotides contenus dans la trousse sont choisis et synthétisés selon les spécifications du demandeur (annexe A). Les fragments d'ADN sont ensuite séquencés selon un principe de base similaire à l'approche de Sanger : la séquence des nucléotides est déterminée au cours de la synthèse cyclique d'un brin complémentaire à la matrice. Cette réaction utilise des nucléotides fluorescents pour permettre leur repérage et est effectuée sur la plateforme MiSeq d'Illumina. Contrairement au séquençage classique, le NGS effectue et déchiffre des millions de réactions simultanément. Finalement, les séquences obtenues sont assemblées et alignées sur une séquence de référence. Les variations sont décelées et

annotées de façon automatisée et manuelle. L'analyse bio-informatique automatisée est effectuée à l'aide de logiciels basés sur le programme par *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) et le *Genome Analysis Toolkit* (GATK) (*Broad Institute*) et selon leurs recommandations [Van der Auwera *et al.*, 2013; McKenna *et al.*, 2010]. Les variants sont ensuite confirmés par séquençage selon la méthode de Sanger (l'analyse est effectuée sur le Genetic Analyzer 3500, Life Technologies) et tel que recommandé par l'*American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). La qualité minimale acceptée lors du séquençage est de Q40, avec un minimum de 20 séquences par base. Les variants sont évalués à l'aide des bases de données ClinVar, HGMD, LOVD, dbSNP et Exome Server Project et rapportés selon les recommandations de l'ACMG [Rehm *et al.*, 2013].

2.3 Société ou développeur

Illumina a conçu la plateforme de séquençage, alors que Nimblegen a mis au point la trousse d'enrichissement des régions d'intérêt.

2.4 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les produits et technologies utilisés pour effectuer cette analyse n'ont pas fait l'objet d'une homologation par Santé Canada ou la FDA. La FDA a approuvé l'utilisation de la plateforme MiSeqDx d'Illumina pour usage clinique à la fin de 2013.

2.5 Valeur pondérée : 858,81

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

3.1 Patients ciblés

L'analyse cible les personnes présentant des signes cliniques compatibles avec le syndrome de Noonan ou d'autres syndromes apparentés tels que le syndrome cardio-facio-cutané, le syndrome de Costello, le syndrome LEOPARD, le syndrome de Watson ou le syndrome de Legius.

3.2 Description de la maladie visée

Le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique congénitale dont la prévalence se situe entre 1 cas sur 1 000 et 1 cas sur 2 500 naissances [Sharland *et al.*, 1992; Mendez et Opitz, 1985; Noonan et Ehmke, 1963]. Environ 60 % des cas sont d'origine sporadique [Rohrer, 2009]. Les personnes atteintes possèdent des traits physionomiques distinctifs, une petite stature malgré une taille normale à la naissance et des défauts cardiaques congénitaux chez jusqu'à 90 % des patients [Kaski et Limongelli, 2014]. Notons parmi les autres caractéristiques des défauts de coagulation variés, des dysplasies lymphatiques, des anomalies oculaires, des difficultés d'alimentation durant la petite enfance, une déformation typique du sternum en bréchet, associant *pectus carinatum* supérieur et *pectus excavatum* inférieur et de la colonne vertébrale et des retards de développement de gravité variable. Jusqu'à un tiers des patients présentent une déficience intellectuelle légère. Les anomalies cardiovasculaires les plus souvent associées sont une dysplasie de la valve pulmonaire liée à une sténose du tronc pulmonaire commun (dans 50 % à 60 % des cas) et une cardiomyopathie hypertrophique (chez 20 % des cas) qui peut être présente à la naissance ou qui peut apparaître au cours de l'enfance. Environ 9 % des patients vont décéder de ces anomalies entre l'âge de quelques mois et 61 ans [Shaw *et al.*, 2007]. La

présence de néoplasies myéloprolifératives et de leucémie myélomonoocytaire juvénile (JMML) a été rapportée chez ces patients [Aoki *et al.*, 2008; Kratz *et al.*, 2005; Tartaglia et Gelb, 2005].

Le SN fait partie d'un groupe de maladies récemment nommé « RASopathies ». Ce syndrome, tout comme le syndrome cardio-facio-cutané (CFC), le syndrome de Costello (SC), la neurofibromatose de type 1 (NF1) et le syndrome LEOPARD (SL), est causé par des mutations dans différents gènes en cause dans la voie de signalisation de RAS/MAPK (annexe B). Cette voie de signalisation, étudiée de façon extensive dans les contextes d'oncogenèse, joue un rôle dans la transduction de signaux extracellulaires (tels que les facteurs de croissance et les cytokines) en réponses biochimiques et transcriptionnelles contrôlant la prolifération cellulaire, la différenciation et la sénescence [Ferrero *et al.*, 2012; Matozaki *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2007]. Son rôle central dans de multiples processus cellulaires mène à la diversité des caractéristiques phénotypiques observées dans le SN et les syndromes apparentés. Il contribue également aux recouvrements observés entre les différents syndromes (tableau 1) [Tartaglia et Gelb, 2010].

Tableau 1 Syndrome de Noonan et syndromes apparentés (« RASopathies »)

MALADIE	OMIM*	PRÉVALENCE†	CARACTERISTIQUES PHÉNOTYPIQUES [‡]
Syndrome de Noonan	163950 609942 610733 611553 613224 613706	1/1 000 – 1/2 500	▪ Traits craniofaciaux dysmorphiques distinctifs ▪ Défaits cardiaques congénitaux ▪ Petite stature ▪ Anomalies ophtalmiques ▪ Défaits de coagulation ▪ Fonctions neurocognitives normales ou légèrement déficientes ▪ Cryptorchidie ▪ Prédisposition au cancer
Syndrome de Noonan avec cheveux anagènes fragiles	607721	1/1 000 000	▪ Forme variante du SN ▪ Phénotype similaire au SN ▪ Cheveux cassants
Syndrome de Costello	218040	< 250 cas rapportés	▪ Traits craniofaciaux similaires au SN mais pouvant être plus prononcés ▪ Défaits cardiaques congénitaux ▪ Troubles alimentaires très graves ▪ Petite stature ▪ Anomalies ophtalmiques ▪ Lésions cutanées ▪ Fonctions neurocognitives déficientes ▪ Hypotonie ▪ Prédisposition au cancer
Syndrome LEOPARD	151100	< 200 cas rapportés	▪ Phénotype similaire au SN ▪ Apparition de lentigo cutané multiple ▪ Prédisposition au cancer inconnue
Malformation capillaire - malformation artérioveineuse	608354	inconnue	▪ Malformations capillaires pouvant être associées à des malformations artérioveineuses ▪ Prédisposition au cancer incertaine

Syndrome cardio-facio-cutané	115150	Plus de 100 cas rapportés	▪ Traits craniofaciaux similaires au SN mais pouvant être plus prononcés ▪ Défaits cardiaques congénitaux ▪ Troubles alimentaires graves ▪ Petite stature ▪ Anomalies ophtalmiques ▪ Lésions cutanées ▪ Difficultés alimentaires en bas âge ▪ Fonctions neurocognitives déficientes de légères à graves ▪ Hypotonie ▪ Prédisposition au cancer incertaine
Syndrome de Legius	611431	< 200 cas rapportés	▪ Macules couleur café au lait ▪ Macroencéphalie ▪ Fonctions neurocognitives normales ou légèrement déficientes ▪ Éphélides intertrigineuses ▪ Aucune prédisposition au cancer
Syndrome de Watson	193520	Inconnue	▪ Sténose pulmonaire ▪ Macules couleur café au lait ▪ Fonctions neurocognitives déficientes ▪ Petite stature ▪ Macroencéphalie ▪ Nodules de Lisch

Abréviation : OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*.

*www.omim.org

†www.orphanet.net, genetics home reference (<http://ghr.nlm.nih.gov>)

^lRauen, 2013.

Dans le SN comme dans la plupart des cas d'autres RASopathies, les mutations causales sont présentes sous forme hétérozygote et mènent à l'activation de la voie de signalisation RAS/MAPK, mais à un niveau moindre que les mutations somatiques associées à l'oncogenèse. La récurrence familiale est consistante et présente un mode de transmission autosomale dominant. Toutefois, les mutations *de novo* sont plus fréquentes (environ 60 % des cas) [Hafner et Groesser, 2013; Shaw *et al.*, 2007].

L'étiologie génétique peut être démontrée chez 70 % à 90 % des personnes atteintes [Bhambhani et Muenke, 2014; Lepri *et al.*, 2014]. Environ 50 % des cas de SN portent une mutation faux-sens dans le gène *PTPN11*, de 10 % à 15 %, dans le gène *SOS1*, et de 3 à 17 %, dans le gène *RAF1*. Le gène *KRAS* est également muté chez moins de 2 % à 5 % des personnes touchées. D'autres gènes associés au SN sont mutés dans moins de 1 % des cas (*NRAS*, *BRAF* et *MAP2K1*).

Le diagnostic différentiel comprend des syndromes caractérisés par des dysmorphologies faciales, une petite stature et des défauts cardiaques, tels que le syndrome de Williams et le syndrome d'Aarskog de même que le syndrome de Turner, le syndrome de Watson, l'exposition *in utero* à l'alcool ou à la primidone et d'autres RASopathies comme le syndrome de Costello, le syndrome cardio-facio-cutané, le syndrome de Noonan s'accompagnant d'une chevelure anagène fragile et le syndrome LEOPARD [Van der Burgt, 2007].

3.3 Nombre de patients visés

120 patients par année sont ciblés.

L'analyse sera effectuée chez les enfants et les adultes. Elle pourrait éventuellement être offerte en dépistage prénatal en fonction des volumes et des désignations d'autres analyses de panel par NGS.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Pédiatrie, génétique et conseil génétique.

3.5 Modalités d'administration du test

Ce sont exclusivement les généticiens médicaux qui demandent ce type de test. Les demandes d'analyses proviennent de grands centres tels que le CHU Sainte-Justine, l'Hôpital de Montréal pour enfants, le CHUS et le CHUQ.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

L'approche diagnostique recommandée est le séquençage séquentiel de type Sanger de gènes candidats sélectionnés en fonction du phénotype observé et de la prévalence des mutations observées. Cette approche nécessite donc une évaluation clinique précise pour limiter les délais et les coûts associés [Romano *et al.*, 2010].

Depuis la mise au point des technologies de séquençage NGS, plusieurs fournisseurs à l'extérieur du Québec offrent le séquençage de panels de gènes par NGS. Les panels sont généralement constitués de gènes associés au SN et aux syndromes apparentés. À titre d'exemples, *Gene Dx* offre le séquençage des gènes *BRAF*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *PTPN11*, *RAF1*, *CBL*, *SOS1*, *SHOC2* et *Blueprint Genetics*, le *Partners HealthCare Center for Personalized Genetic Medicine (PCPGM)* de la *Harvard Medical School*, le *Children's Hospital of Philadelphia* et le *Emory Genetics Laboratory* offrent un panel contenant *SPRED1* en plus des gènes précédents. Actuellement, les demandes d'analyses du demandeur sont dirigées vers ces fournisseurs.

À ce jour, le Répertoire québécois des analyses biomédicales ne comprend aucun séquençage de gènes associés au SN de façon individuelle ou sous forme de panel. En 2012-2013, 116 demandes d'analyses ont été expédiées aux États-Unis pour un coût total de 187 000 \$.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

L'étiologie génétique du SN est hétérogène. De plus, lorsque mutés, les gènes associés au SN mènent à une hétérogénéité phénotypique qui complexifie le diagnostic.

L'approche proposée par le demandeur permet le séquençage simultané de tous les gènes associés au SN. Le séquençage de panel de gènes par NGS élimine la nécessité de faire des séquençages successifs, ce qui résulte en un diagnostic et une prise en charge plus rapide et à moindre coûts. La cause génétique peut être confirmée dans 75 % à 90 % des cas.

L'analyse relative au SN arrive au 5^e rang des analyses hors Québec les plus coûteuses, selon les données du ministère et l'information présentée à la Table sectorielle des Réseaux

universitaires intégrés de santé (RUIS) en génétique (données fournies par le demandeur). Le demandeur évalue la valeur pondérée de l'analyse à 858,81. Le coût annuel de production des 120 analyses prévues serait de 103 057 \$.

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 par un autre test

Ne remplace aucun test figurant dans le Répertoire québécois des analyses biomédicales. Cette analyse remplacerait les envois hors Québec.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Le diagnostic du SN est basé sur les caractéristiques cliniques des patients. L'analyse génétique est recommandée s'il y a suspicion de SN dans le but de confirmer le diagnostic et l'étiologie génétique et d'assurer le diagnostic différentiel. L'information obtenue permettra d'assurer une prise en charge appropriée du patient, de déterminer un pronostic et de rendre disponible des options de reproduction aux couples, en particulier aux personnes atteintes du syndrome de Noonan [Roberts *et al.*, 2013; Romano *et al.*, 2010].

Des groupes d'experts, dont Romano et ses collègues [2010], ont émis des recommandations de suivi. Des différences significatives quant aux risques de complications ont été rapportées en fonction du syndrome diagnostiqué, et le suivi/traitement varie en fonction de ce dernier et des caractéristiques cliniques propres à chaque patient. La prise en charge peut inclure, entre autres, le suivi des problèmes alimentaires éprouvés dans la petite enfance, l'évaluation de la fonction cardiaque et le suivi de la croissance et du développement moteur. Un examen oculaire et auditif complet doit être pratiqué durant les premières années de scolarisation et des études de coagulation doivent être menées avant toute intervention chirurgicale. Certains syndromes sont également associés à un risque légèrement supérieur à celui de la population normale de plusieurs cancers [Aoki et Matsubara, 2013; Cizmarova *et al.*, 2013; Van der Burgt, 2007].

Plusieurs études de concordance phénotypique-génétique ont permis d'associer certains gènes ou mutations à la prédisposition à certains traits ou risques, malgré une hétérogénéité phénotypique importante. Par exemple, un suivi associé à un risque accru de lésions cancéreuses peut être indiqué chez les patients porteurs de mutations dans le gène *HRAS*. L'apparition de tumeurs variées, bénignes et malignes, a été rapportée chez 15 % de ces patients [Gripp *et al.*, 2006]. Les cardiomyopathies hypertrophiques sont surreprésentées dans les cas de SN qui ont des mutations dans le gène *RAF1* (75 % à 90 % par rapport à 20 % dans la cohorte générale de patients atteints de SN) [Tartaglia et Gelb, 2010; Verloes et Cavé, 2010]. Un suivi plus étroit peut donc également être souhaitable chez ces patients.

En bénéficiant de soins adaptés, la majorité des enfants atteints de SN mènent une vie normale à l'âge adulte. Les signes et les symptômes s'estompent avec l'âge et la plupart des adultes atteints ne nécessitent aucun traitement médical particulier [Van der Burgt, 2007; Tartaglia et Gelb, 2005; Van der Burgt *et al.*, 1994; Noonan, 1963]. Toutefois, les adultes porteurs d'un SN pourraient présenter un risque élevé de mort subite [Binder *et al.*, 2012]. Des études prospectives supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les risques associés au SN chez l'adulte.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour les patients atteints SN ou de l'un des syndromes apparentés. Dans une perspective de traitement en oncologie, plusieurs molécules inhibitrices de différentes protéines effectrices de la voie de signalisation RAS/MAPK ont été mises au point. Certaines sont approuvées par la FDA et Santé Canada alors que d'autres sont en développement et en cours d'essais cliniques [Burgess, 2013; Sebolt-Leopold, 2008]. Rauen et ses collaborateurs [2011] et Chen et ses collaborateurs [2010] ont suggéré que des agents inhibiteurs de la voie RAS tels que le farnésyltransférase ou les inhibiteurs de BRAF et de MEK pourraient présenter des possibilités de traitement pour les RASopathies.

Deux essais cliniques ont été publiés jusqu'à présent sur l'utilisation d'inhibiteurs de la voie RAS/MAPK dans des contextes de RASopathies. La première étude examinait l'effet d'un traitement de 12 semaines au simvastatin, inhibiteur de l'activité de RAS, sur les fonctions cognitives de 62 enfants atteints de neurofibromatose et âgés de 8 à 16 ans. Les auteurs concluent à l'absence d'amélioration, selon leurs critères [Krab *et al.*, 2008].

La deuxième étude examinait l'effet d'un traitement de 3 mois à la lovastatine dans une cohorte de 24 enfants atteints de neurofibromatose et âgés entre 10 et 17 ans. L'objectif primaire de l'étude était d'évaluer la sécurité et la toxicité. Les résultats secondaires ont démontré des améliorations significatives de la mémoire verbale et non verbale, de l'attention et de l'efficacité visuelle [Acosta *et al.*, 2011].

Un essai clinique de phase II par Novartis est actuellement en cours de recrutement. Le but de l'étude est de déterminer si MEK162 (un inhibiteur de MEK) est en mesure d'antagoniser l'activation de MEK chez les personnes souffrant du SN avec une cardiomyopathie hypertrophique (essai NCT01556568)⁴⁶. La régression de l'hypertrophie sera évaluée après six mois de traitement.

5.2 Validité clinique

Le séquençage semi-automatisé de Sanger est utilisé depuis plusieurs années et est considéré comme le test de référence. Toutefois, le NGS permet maintenant une analyse simultanée de plusieurs gènes, de l'exome ou même de l'ensemble du génome à l'aide d'une approche à haut débit et à faible coût. Pour ces raisons, le NGS est en voie d'être adopté dans un contexte clinique. Dans cette foulée, la FDA a approuvé l'utilisation de la plateforme MiSeqDx d'Illumina pour usage clinique à la fin de 2013.

L'utilisation de l'approche NGS dans les maladies d'origine multigénique a permis de détecter plusieurs variations décrites comme pathogéniques et confirmées par la suite par séquençage classique [Lepri *et al.*, 2014; Umbarger *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Sikkema-Raddatz *et al.*, 2013]. Le séquençage simultané de plusieurs gènes tel qu'il est effectué par NGS serait difficile, sinon irréalisable, dans un contexte de diagnostic, selon l'approche classique de Sanger.

Le séquençage selon la méthode de Sanger est nécessaire pour investiguer les régions où la profondeur de lecture est inadéquate et pour valider les variants observés. Toutefois, l'introduction du NGS dans un contexte clinique est souhaitable considérant que les bénéfices relatifs à cette technique sont supérieurs aux risques associés (mémoire de

⁴⁶ ClinicalTrials.gov. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of MEK162 in Noonan syndrome hypertrophic cardiomyopathy [site Web]. Disponible à : <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01556568>.

la FDA pour l'introduction de MiSeqDx, ACMG [Rehm *et al.*, 2013; Sikkema-Raddatz *et al.*, 2013].

L'association de *NF1* à la neurofibromatose de type 1, l'identification de *PTPN11* comme premier gène lié au SN et les recoupements de caractéristiques phénotypiques du SN avec plusieurs autres syndromes apparentés ont mené à la recherche des autres gènes codant pour les protéines de la voie RAS/MAPK dans le SN et les autres RASopathies. Ces études et, plus récemment, quelques rares études de séquençage d'exome par NGS, ont mis en évidence un nombre limité de gènes responsables du SN et des syndromes apparentés.

Validité clinique des gènes faisant partie du panel

PTPN11

La contribution du gène *PTPN11*, situé sur le chromosome 12q24, à l'étiologie du SN a été mise en évidence par des travaux de Tartaglia et ses collègues [2001] dans le cadre d'une étude de gènes candidats positionnels. Le gène, de 15 exons répartis sur 85 kb, code pour SHP2, une protéine tyrosine phosphatase de 593 acides aminés contenant deux domaines d'homologie Src en tandem (SH2) situés en N-terminal par rapport au domaine catalytique PTPase. Cette protéine régule la voie de RAS de façon positive.

Des études subséquentes sur des cohortes de sujets non apparentés et des familles ont permis d'évaluer qu'environ 50 % des patients souffrant du SN portent une mutation dans ce gène. Le mode de transmission est autosomal dominant. Les plus de 47 mutations recensées sont presque exclusivement des faux-sens qui modifient la fonction de SH2. Les résidus touchés se situent dans le domaine N-terminal ou le domaine PTP comprenant l'interface avec SH2. La mutation prédominante est N308D. Des études structurales ont permis de proposer que certaines mutations causeraient un gain de fonction résultant en une activité excessive de SHP2 [Yoon *et al.*, 2013; Zenker *et al.*, 2004; Musante *et al.*, 2003; Digilio *et al.*, 2002; Kosaki *et al.*, 2002; Legius *et al.*, 2002; Tartaglia *et al.*, 2002; Maheshwari *et al.*, 2002; Tartaglia *et al.*, 2001].

Environ dix cas de duplication de la région 12q24 comprenant *PTPN11* ont été rapportés chez des patients atteints du SN [Chen *et al.*, 2014; Graham *et al.*, 2009].

Onze mutations distinctes de celles associées au SN ont été reliées au syndrome LEOPARD dans environ 90 % des cas, y compris des cas familiaux et sporadiques [Martinez-Quintana et Rodriguez-González, 2012]. Les mutations p.Tyr259Cys et p.Thr468Met sont prédominantes [Yoshida *et al.*, 2004; Zenker *et al.*, 2004; Sarkozy *et al.*, 2003; Digilio *et al.*, 2002; Legius *et al.*, 2002]. Le mécanisme par lequel les mutations causeraient la maladie n'est pas élucidé, mais les mutations du SL affectent typiquement les résidus dans le domaine PTP qui résultent, *in vitro*, dans des essais de transfection transitoire, en une réduction de l'activité catalytique et en une réduction de l'activation RAS/ERK [Qiu *et al.*, 2014; Verloes et Cavé, 2010].

Des mutations dans le gène *PTPN11* ont été également associées à plusieurs types de cancers, dont la leucémie myélomonocytaire juvénile, la leucémie myéloïde aigüe et les rétinoblastomes [Cheng *et al.*, 2013; Blackford *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Jongmans, 2005; Kratz *et al.*, 2005; Bentires-Alj *et al.*, 2004].

SOS1

Le gène *SOS1* code pour un facteur d'échange de GTP (guanosine triphosphate), ou GEF, (appelé en anglais *GTP exchange factor*) de 1 333 acides aminés (150 kD). Cette protéine à

multiples domaines permet l'activation de RAS en facilitant les échanges GDP-GTP. Son gène se situe sur le chromosome 2p22.1 et est constitué de 23 exons codants répartis sur 135 kb.

Roberts [2007], Tartaglia [2007], Zenker [2007] et leurs collaborateurs ont rapporté une association entre le gène *SOS1* et le SN à l'aide de cohortes de patients atteints du syndrome de Noonan. Les études subséquentes ont confirmé que la vaste majorité des mutations détectées sont des faux-sens répartis dans plusieurs domaines. La plupart des régions touchées contribueraient structurellement au maintien de la protéine dans une forme active qui stimulerait l'activation de RAS et de ERK. La prévalence de mutations dans *SOS1* a été évaluée à environ 20 % à 28 % dans la population atteinte du SN.

D'un point de vue phénotypique, les patients atteints du SN et porteurs de mutations dans *SOS1* présenteraient des anomalies ou des caractéristiques ectodermes distinctes et fréquentes comme une kératose pilaire et des cheveux bouclés. En plus d'être associées au SN, des mutations dans ce gène ont également été associées à la fibrose gingivale.

RAF1

Le gène *RAF1*, de 34 kb et 16 exons codants, est situé sur le chromosome 3p25, et code pour une protéine qui fait partie de la famille des sérine-thréonine kinases. La protéine agit en tant qu'un effecteur de RAS en phosphorylant les kinases MEK1 et MEK2.

Par une approche de gènes candidats, Pandit et ses collaborateurs [2007] et Razzaque et ses collègues [2007] ont séquencé *RAF1* chez 237 et 30 patients, respectivement, présentant un SN ou un SL et dont l'étiologie génétique n'avait pu être établie par le séquençage de *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS* et *HRAS*. Ces études ont permis l'association entre des mutations activatrices faux-sens dans le gène de *RAF1* et le SN avec une prévalence d'environ 5 % à 15 %. Des mutations dans *RAF1* ont également été rapportées chez 33 % des patients atteints du SL.

Trois régions de la protéine sont touchées par des mutations : 70 % des mutations se retrouvent dans la séquence de reconnaissance 14-3-3 en N-terminal (ou région conservée 2) et comprenant la Ser 259, 15 % des mutations affectent des résidus du domaine kinase (Asp486 et Thr491) et 15 % touchent 2 résidus adjacents (Ser612 et Leu613) en C-terminal. Les mutations influant sur la phosphorylation de la sérine en position 259 causeraient un gain de fonction, alors que celles ayant une incidence sur la boucle activatrice de la kinase la réduiraient.

La mutation de résidus dans la région CR2 a été liée à une prévalence accrue de cardiomyopathies hypertrophiques (95 % contre 18 % dans l'ensemble de la population touchée par le SN) [Kobayashi *et al.*, 2010; Pandit *et al.*, 2007; Razzaque *et al.*, 2007]. Des mutations dans le gène *RAF1* ont également été associées à l'adénocarcinome du poumon, au cancer colorectal, au mélanome et au cancer du poumon non à petites cellules.

KRAS

Le gène *KRAS* est situé sur le chromosome 12p12 et y occupe 45 kb. Il est constitué de 4 exons codant pour une protéine de la famille des GTPases. Deux isoformes sont produites par épissage alternatif. La protéine est activée par les GEF, y compris *SOS1*, et transduit le signal en aval vers divers effecteurs dont les MAPK et PI3PK/AKT.

La présence de plus de dix mutations faux-sens hétérozygotes différentes et *de novo* a été mise en évidence chez des patients présentant un SN, un CFC ou un SC par plusieurs groupes [Nava *et al.*, 2007; Zenker *et al.*, 2007; Carta *et al.*, 2006; Niihori *et al.*, 2006;

Schubbert *et al.*, 2006]. Toutefois, ces mutations affectent un faible pourcentage de patients atteints du SN et du CFC (moins de 2 % à 5 %). Les études initiales suggèrent que les patients présentant un SN et portant une mutation dans *KRAS* seraient plus gravement affectés [Carta *et al.*, 2006]. Dans deux rapports de cas, Brasil et ses collègues [2012] et Stark et ses collaborateurs [2012] ont signalé la présence de rares cas familiaux de CFC portant des mutations dans *KRAS*.

Il est estimé que dans 17 % à 25 % des tumeurs humaines, le gène de *KRAS* porte une mutation activatrice [Kranenburg, 2005]. Parmi les cancers associés à ce gène, notons les adénocarcinomes du poumon et les carcinomes du pancréas et colorectaux [Rajagopalan *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Sidransky *et al.*, 1992; Almoguera *et al.*, 1988; Smit *et al.*, 1988; Rodenhuis *et al.*, 1987].

NRAS

Le gène *NRAS*, situé sur le chromosome 1p13 et constitué de 4 exons, a été associé au SN dans une étude de gène candidat par Cirstea et ses collaborateurs [2010]. Une cohorte de 917 sujets présentant un phénotype apparenté au SN et sans étiologie génétique, a été investiguée dans le but de trouver des mutations dans *NRAS*. Deux mutations faux-sens hétérozygotes ont été répertoriées chez quatre sujets non apparentés (c.149C>T et c.179G>A, résultant en p.Thr50Ile et p.Gly60Glu, respectivement). Trois cas étaient sporadiques, alors que le quatrième était porteur d'une mutation héréditaire ségrégant avec le phénotype au sein de la famille. Les travaux de Kraoua et ses collègues [2012] ont mis en évidence une mutation (c.179G>A) chez 2 patients d'une cohorte de 125 personnes ayant un phénotype apparenté au SN et chez lesquelles aucune mutation causale dans les gènes *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *MEK1*, *MEK2*, *RAF1*, *BRAF* et *SHOC2* n'avait été décelée. Ces études confirment la faible prévalence de mutations du gène *NRAS* dans le SN.

Des mutations somatiques dans le gène *NRAS* sont également associées, entre autres, au cancer folliculaire de la thyroïde, à certains cas de leucémies myéloïdes aiguës, au cancer colorectal et au syndrome lymphoprolifératif autoimmun [Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Bezieau *et al.*, 2001].

BRAF

Le gène *BRAF* est constitué de 18 exons codants répartis sur 190 kb du chromosome 7q34. La protéine produite est un membre de la famille des sérine-thréonine kinases qui, lorsqu'activée par RAS, phosphoryle et active MEK1 et MEK2 [Martinez-Quintana et Rodriguez-González, 2012].

L'association de ce gène avec le SN, le SL et le CFC a été observée dans le cadre d'études de l'étiologie génétique de ces syndromes selon une approche de gène candidat. Niihori et ses collaborateurs [2006] ont séquencé *BRAF* chez 40 patients non apparentés atteints de CFC et y ont observé 8 mutations faux-sens différentes chez 16 patients. Dans un groupe de patients atteint du CFC, Rodriguez-Viciano et ses collaborateurs [2006] ont trouvé 11 mutations sporadiques chez 18 des 23 patients CFC (78 %), alors que Schulz et ses collègues [2008] ont repéré 12 mutations différentes dans une cohorte de 24 patients (47 %) aux prises avec un CFC.

Plus rarement (dans moins de 2 % des cas), des mutations dans *BRAF* ont été rapportées chez des patients présentant les critères diagnostiques du SN ou du SL [Sarkozy *et al.*, 2009; Nystrom *et al.*, 2008; Razzaque *et al.*, 2007]. Plus de 40 mutations ont été décrites dans *BRAF*, toutes des faux-sens; elles sont situées dans 2 régions : le domaine riche en cystéine

et le domaine protéine kinase (exons 11, 12, 14 et 15). Des mutations somatiques dans *BRAF* ont également été associées au cancer colorectal, au mélanome, à l'adénocarcinome du poumon, et au cancer du poumon non à petites cellules [Namba *et al.*, 2003; Brose *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2002; Rajagopalan *et al.*, 2002].

SHOC2

SHOC2 est un gène situé sur le chromosome 10q25 et constitué de 5 exons codants répartis sur 7 kb. La protéine encodée par *SHOC2* est constituée essentiellement d'un domaine d'interaction protéique (répétitions de leucine). Elle semble avoir un rôle d'échafaudage permettant la liaison de RAS avec les protéines effectrices en aval dont RAF1.

Cordeddu et ses collègues [2009] ont associé le gène *SHOC2* au SN s'accompagnant de cheveux anagènes fragiles. Une approche de séquençage de gènes candidats repérés par suite d'une étude de l'interactome⁴⁷ humain, a permis de détecter, chez 96 personnes présentant un phénotype de SN, une mutation faux-sens à la position c.4A>G du gène (p.Ser2Gly). Le séquençage de 410 sujets additionnels a permis de détecter la mutation chez 21 cas supplémentaires.

La mutation p.Ser2Gly est la seule mutation qui a été décrite dans ce gène. Elle mène à une myristoylation⁴⁸ en N-terminal aberrante qui résulte en un ciblage constitutif de la protéine vers la membrane cellulaire. Il en résulte une activation soutenue de la voie MAPK par RAF1.

CBL

CBL est un gène de 16 exons codants, situé sur le chromosome 11q23, et couvrant 93 Kb. La protéine produite par ce gène est une E3 ubiquitine ligase qui régule négativement la signalisation en aval des récepteurs tyrosine kinases en ciblant ses substrats pour la dégradation par le protéasome [Martinelli *et al.*, 2010].

Deux études indépendantes effectuées respectivement avec une cohorte non apparentée et des cas familiaux ont initialement rapporté une association entre un phénotype apparenté au SN et la présence de mutations faux-sens hétérozygotes dans le gène *CBL* [Martinelli *et al.*, 2010; Niemeyer *et al.*, 2010]. Martinelli et ses collaborateurs ont rapporté, dans une cohorte de 365 sujets présentant des traits associés au SN, 2 cas sporadiques et 2 cas héréditaires. Ils ont observé une hétérogénéité phénotypique, c'est-à-dire que certaines personnes présentaient une concordance avec le phénotype du SN, alors que d'autres présentaient seulement certains traits.

Les mutations faux-sens détectées dans *CBL* sont concentrées dans deux domaines : le domaine RING (*Really Interesting New Gene*) finger et le domaine de liaison entre ce domaine et le domaine de liaison à la tyrosine kinase en N-terminal. Les mutations rapportées entraîneraient une perte de fonction et allongeraient la durée de vie des RTK [Verloes et Cavé, 2010].

La présence de mutations somatiques homozygotes dans *CBL* est également rapportée dans les leucémies myéloïdes, plus particulièrement les JMML. Ces mutations sont principalement des petites délétions permettant de conserver le même cadre de lecture, des modifications du site d'épissage ou des faux-sens [Niemeyer *et al.*, 2010; Pérez, 2010].

⁴⁷ Interactome : réseau constitué de l'ensemble des protéines qui interagissent directement ou non dans cette voie de signalisation.

⁴⁸ Myristoylation : fait partie des modifications post-traductionnelles que subissent certaines protéines. Elle aurait un rôle dans certaines interactions protéine-protéine, dans la stabilité de la protéine et dans certaines interactions de la protéine avec la membrane.

HRAS

Le gène *HRAS* est constitué de 4 exons codants situés sur le chromosome 11p15. Ce gène fait partie de la famille des oncogènes *RAS*. Il code pour une protéine possédant une activité GTPase qui est en cause dans la transduction du signal des récepteurs membranaires vers des effecteurs intracellulaires.

Une approche de gène candidat a permis à Aoki et ses collaborateurs [2005] d'associer des mutations du gène *HRAS* au syndrome de Costello. Ils ont détecté 4 mutations hétérozygotes différentes chez 12 des 13 sujets de leur cohorte présentant un syndrome de Costello. Certaines de ces mutations avaient été préalablement repérées dans diverses tumeurs [Bos, 1989].

Plusieurs autres études subséquentes ont rapporté qu'environ 87 % des cas de SC portent des mutations dans ce gène. Des mutations ont également été décrites dans des cas de CFC [Gremer *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2008; Gripp *et al.*, 2007; Zampino *et al.*, 2007; Gripp *et al.*, 2006; Kerr *et al.*, 2006; Rauen *et al.*, 2006; Sol-Church *et al.*, 2006;]. Plusieurs mutations hétérozygotes faux-sens ont été décrites. Toutefois, plus de 90 % affectent les résidus de glycine en position 12 ou 13 et mènent à un gain de fonction [Gripp et Lin, 2012; Estep *et al.*, 2006]. Il s'agit généralement de mutations *de novo* quoique quelques cas de mutations héréditaires aient été rapportées [Gripp et Lin, 2012].

Des mutations dans *HRAS* ont été répertoriées dans une variété de cancers, y compris le cancer de la vessie, le cancer folliculaire de la thyroïde et le carcinome à cellules squameuses orales [Groesser *et al.*, 2012; Di Micco *et al.*, 2006; Vasko *et al.*, 2003].

MAP2K1 et MAP2K2 (MEK 1 et MEK2)

MAP2K1 et *MAP2K2* sont situés respectivement sur les chromosomes 15q22 et 19p13. *MAP2K1* est constitué de 11 exons répartis sur 103 kb contre 7 exons répartis sur 11 kb pour *MAP2K2*. Les protéines codées par ces gènes, MEK1 et MEK2, sont des MAP kinases effectrices de RAF.

L'association entre ces gènes et le CFC a été initialement rapportée par Rodriguez-Viciano et ses collègues [2006] dans une cohorte de 23 patients ayant reçu un diagnostic de CFC et par Niihori et ses collaborateurs [2006] dans une cohorte de 43 sujets ayant un phénotype de CFC. Leurs études et d'autres subséquentes ont évalué la prévalence des mutations faux-sens activatrices à environ 20 % à 25 % dans la population des patients atteints de CFC. Rarement, *MAP2K1* a été associé au SN. Les mutations sont regroupées principalement dans deux régions du gène : la région de régulation négative (*negative regulatory region*, ou NRR) et dans le domaine kinase [Armour and Allanson, 2008; Nystrom *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2008; Gripp *et al.*, 2007; Narumi *et al.*, 2007]. La plupart des mutations étudiées semblent mener à une augmentation de l'activité MEK [revue par Bromberg-White *et al.*, 2012].

Le CFC est une maladie jugée sporadique. Toutefois, Rauen et ses collègues [2010] et Linden et Price [2011] ont, de façon indépendante, fait état de deux familles présentant des mutations hétérozygotes à transmission autosomale dominante du gène *MAP2K2*.

Des mutations dans ce gène ont été rapportées dans différents cancers humains tels que le mélanome et le cancer du poumon non à petites cellules [Pao et Girard, 2011 et revue par Bromberg-White *et al.*, 2012].

NF1

NF1 est un gène de 127 kb situé sur le chromosome 17q11 qui possède 15 exons codants et produit la neurofibromine, protéine qui régule plusieurs voies de signalisation et catalyse l'inactivation des protéines RAS. Il a été le premier à associer des mutations de la voie RAS/MAPK et un syndrome développemental (neurofibromatose de type 1). Des mutations héréditaires et *de novo* ont été rapportées dans de nombreuses études [revues par Pasmant *et al.*, 2012].

Des mutations dans *NF1* ont également été associées au syndrome de Watson, syndrome à transmission autosomale dominante. Tassabehji et ses collègues [1993] ont rapporté une délétion de 42 paires de bases (pb) dans l'exon 28 dans une famille dont 3 membres étaient atteints. La mutation résulte en une perte de fonction de la protéine.

Des mutations dans ce gène sont également associées à plusieurs types de cancers dont le rhabdomyosarcome, les tumeurs carcinoïdes, certains types de gliomes, le cancer du sein et la JMML [revue par Patil et Chamberlain, 2012].

RIT1

Gène de 6 exons situé sur le chromosome 1q22, *RIT1* code pour une protéine de la famille des GTPases (RAS) [Hynds *et al.*, 2003].

Une seule étude a rapporté la présence de mutations dans ce gène chez des personnes présentant un phénotype apparenté au syndrome de Noonan. Dans le cadre de cette étude, Aoki et Matsubara [2013] ont décelé des mutations pouvant être causales chez 14 sujets souffrant du SN par séquençage de l'exome. D'autres mutations ont ensuite été détectées par suite du séquençage ciblé de *RIT1* chez 166 sujets additionnels. De ce nombre, 17 (9 %) portaient 9 mutations faux-sens dans *RIT1*.

Des mutations dans ce gène ont également été associées, dans une faible proportion, à l'adénocarcinome du poumon et à des néoplasmes myéloïdes [Berger *et al.*, 2014; Gómez-Seguí *et al.*, 2013].

SPRED1

Gène de 7 exons codants répartis sur plus de 98 kb sur le chromosome 15q14, *SPRED1* code pour une protéine qui régule négativement la cascade MAP kinase en déphosphorylant RAF [Nonami *et al.*, 2004].

L'association entre ce gène et le syndrome de Legius a été décrite par Brems et ses collègues [2007] chez les membres de cinq familles et chez 86 autres sujets non apparentés chez lesquels aucune mutation n'avait été détectée dans *NF1*. Les auteurs rapportent la présence de 11 mutations hétérozygotes. Leurs études révèlent que les mutations mènent à une perte de fonction qui empêcherait *SPRED1* d'inhiber la signalisation RAF/MEK.

L'association entre ce gène et le syndrome de Legius a, par la suite, été confirmée dans d'autres études de cas familiaux et sporadiques [entre autres Denayer *et al.*, 2011, Laycock-van Spyk *et al.*, 2011; Spencer *et al.*, 2011; Pasmant *et al.*, 2009].

Jusqu'à présent, plus de 100 mutations différentes ont été recensées dans la banque de données « *Leiden Open Variation Database* » et celle du département de pathologie de l'Université de l'Utah⁴⁹. Les mutations, toutes associées au syndrome de Legius, sont

⁴⁹ Mendelian genes [site Web], disponible à : https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian_genes/home et Mutation databases [site Web], disponible à : <http://www.arup.utah.edu/database/> (consultés le 24 avril 2014).

variées : faux-sens, changement de cadre de lecture, non-sens, variation du nombre de copies, mutations touchant l'épissage, délétions et mutations affectant le codon d'initiation.

Résumé des études de prévalence des mutations associées au SN

Plusieurs publications ont rapporté la contribution de chacun des gènes présentés ci-dessus au SN. Romano et ses collaborateurs ont compilé, en 2010, les résultats des diverses études des mutations associées au SN et comprenant plus de 20 patients (tableaux 3, 4 et 5).

Tableau 3 Résumé des études de mutations chez les patients présentant un SN antérieurement à 2010

GÈNE	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE D'ÉTUDES	NOMBRE DE PORTEURS DE MUTATIONS (% DE LA COHORTE)	% DE L'ENSEMBLE DES CAS	COMMENTAIRE
<i>PTPN11</i>	877	13	359 (40,9)	40,9	
<i>KRAS</i>	616	6	15 (2,4)	1,4	
<i>SOS1</i>	311	5	60 (19,3)	11,1	<i>PTPN11</i> et <i>KRAS</i> négatifs
<i>RAF1</i>	304	4	31 (10,2)	4,7	<i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> et <i>SOS1</i> négatifs
<i>BRAF</i>	334	3	6 (1,8)	0,8	<i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>SOS1</i> et <i>RAF1</i> négatifs
<i>SHOC2</i>	96	1	4 (4,2)	1,7	<i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> et <i>BRAF</i> négatifs
<i>NRAS</i>	733	1	4 (0,5)	0,2	<i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> , et <i>BRAF</i> négatifs

Adapté de Romano *et al.*, 2010.

Comme suite à la publication de Romano et ses collaborateurs, quelques autres études ont répliqué leurs résultats dans des cohortes additionnelles et en testant des gènes additionnels.

Tableau 4 Résumé des études de mutations effectuées chez les patients présentant un SN publiées après 2010

ÉTUDE	N ^{BRE} DE PATIENTS	% DE PORTEURS DE MUTATIONS							COMMENTAIRE
		<i>PTPN11</i>	<i>KRAS</i>	<i>SOS1</i>	<i>RAF1</i>	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>SHOC2</i>	
Ezquieta 2012	643	26,7	0	2,2	1,4	0,8	NE	NE	182 membres de famille
Smpokou 2012	35	37	NE	23	NE	3	NE	NE	
Lee 2011	59	39	5,1	20	6,8	1,7	Aucun cas	Aucun cas	
Denayer 2011	115	NE	NE	NE	NE	NE	2,6	0	Cohorte <i>PTPN11</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> et <i>KRAS</i> négative

Abréviations : NE : non évalué

Validité clinique du séquençage de panel de gènes par NGS

Une seule étude visant à examiner la validité clinique d'une approche de séquençage de panel de gènes par NGS a été répertoriée. Récemment, Lepri et ses collaborateurs [2014] ont effectué le séquençage en masse de 80 patients pour les gènes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *SHOC2*, *MAP2K1*, *MAP2K2* et *CBL*. Des mutations ont été repérées dans 6 gènes et 38 mutations ont été répertoriées : *PTPN11* (22/38 = 58 %), *SOS1* (9/38 = 23 %), *BRAF* (2/38 = 5 %), *MAP2K2* (2/38 = 5 %), *RAF1* (2/38 = 5 %), *CBL* (1/38 = 3 %). La fréquence relative des mutations observées était celle attendue en fonction de la littérature et un séquençage de Sanger de tous les variants observés a confirmé toutes les mutations.

Tableau 5 Gènes associés au SN et aux autres syndromes apparentés

MALADIE	OMIM	GÈNES ASSOCIÉS
Syndrome de Noonan	163950 609942 610733 611553 613224 613706	<i>PTPN11</i> <i>KRAS</i> <i>SOS1</i> <i>RAF1</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>MAP2K2</i> <i>RIT1</i>
Syndrome de Noonan avec cheveux anagènes fragiles	607721	<i>SHOC2</i>
Syndrome CBL	613563	<i>CBL</i>
Syndrome Costello	218040	<i>HRAS</i>
Syndrome LEOPARD	151100	<i>PTPN11</i> <i>RAF</i> <i>BRAF</i>
Malformation capillaire - malformation artérioveineuse	608354	<i>RASA1</i>
Syndrome cardio-facio-cutané	115150	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>MAP2K1/2</i>
Syndrome de Legius	611431	<i>SPRED1</i>
Neurofibromatose de type 1	166200	<i>NF1</i>
Syndrome de Watson	193520	<i>NF1</i>

Abréviations : CBL: Syndrome Noonan-like avec leucémie myélomonocytaire juvénile; OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*.

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)

L'utilité et la validité de chacune des plateformes de NGS ont été rapportées au cours des dernières années dans le contexte de différentes maladies, et ce, dans de nombreuses publications. De façon résumée et comparativement à la méthode de Sanger, la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité de la plateforme MiSeq est de près de 100 % dans les régions ayant une couverture appropriée. Le tableau 7 présente quelques études de validation récentes.

Tableau 7 Résumé de quelques études comparatives de plateformes NGS récentes

	TYPE (NOMBRE) D'ÉCHANTILLON	TYPE D'ANALYSE	CRITÈRES ÉVALUÉS	COMMENTAIRE
Tan, 2014	ADN génomique humain (25)	Panel pour maladie polykystique des reins héréditaire	Sensibilité IC de 99,2 % à 95 % IC de 96,8 % à 99,9 % Spécificité IC de 99,9 % à 95 % IC de 99,7 % à 100 %	Le panel était constitué de deux gènes. Les coûts et le temps-réponse étaient réduits de 70 % par rapport à la méthode de Sanger.
Li, 2013	ADN génomique humain (15)	Panel pour maladie cardiaque héréditaire	Sensibilité et spécificité 100 % (MiSeq) 99,1 % (PGM) Valeur prédictive positive 95,9 % (MiSeq) 95,5 % (PGM) Couverture 97,9 % (MiSeq) 96,8 % (PGM)	Les régions à haut contenu en GC présentaient une couverture insuffisante.
Koshimizu, 2013	ADN génomique humain (38)	Panel pour autisme	Sensibilité (7 échantillons) 100 % (MiSeq) 85,7 % (PGM) Couverture à 10X 93,7 % (PGM) 96,8 % (MiSeq) Couverture à 20X	Taux de faux-positifs est plus élevé avec le PGM

	TYPE (NOMBRE) D'ÉCHANTILLON	TYPE D'ANALYSE	CRITÈRES ÉVALUÉS	COMMENTAIRE
			85,9 % (PGM) 93,2 % (MiSeq) Contrôle de la qualité Q30 (MiSeq) Q20 à Q25 (PGM)	
Sikkema-Raddatz, 2013	ADN génomique humain (84)	Panel pour cardiomyopathies héréditaires	Sensibilité 100 % (MiSeq) Reproductibilité 100 % (MiSeq) Couverture à 30X 99 % (MiSeq)	
Quail, 2012	Quatre génomes bactériens (contenu en GC de 19,3 à 67,7 %)	Génome entier	Taux d'erreurs : < 0,4 % (MiSeq) 1,8 % (PGM) 13 % (Pacific Biosciences)	Le PGM détecte plus de variants. Le MiSeq possède un taux de faux-positifs inférieur aux autres. Les séquences d'AT riches sont mieux couvertes par le PGM.

Abréviations : ADN : acide désoxyribonucléique; AT : adénine-thymine; IC : intervalle de confiance; GC : guanine-cytosine; PGM : *Ion Torrent Personal Genome Machine*.

Une recherche documentaire sur l'utilisation d'une approche de séquençage de panel de gènes par NGS à des fins diagnostiques pour le SN ne révèle qu'une étude par Lepri et ses collaborateurs, publiée en 2014.

Lepri et ses collaborateurs [2014] ont évalué la validité analytique de l'approche par NGS. Leur étude est divisée en deux étapes :

- 1) une étape de validation au cours de laquelle un nombre restreint d'échantillons dont le génotype a été préalablement déterminé par séquençage de type Sanger (6 positifs et 4 négatifs) est séquençé par NGS;
- 2) une étape de caractérisation génétique de 80 patients qui ont reçu un diagnostic de SN par NGS.

La préparation de la banque de gènes et l'amplification des séquences ciblées (244 amplicons) ont été effectuées à l'aide de la trousse TruSeq Custom Amplicon (Illumina, San Diego, CA). L'analyse a été réalisée sur la plateforme MiSeq (Illumina, San Diego, CA). L'analyse bio-informatique a été accomplie par Miseq Reporter software et le *Genome Analysis Toolkit* (GATK). Lorsqu'un variant était observé, il était séquençé selon l'approche de Sanger.

Concordance

Les auteurs rapportent une concordance de 100 %.

Sensibilité et spécificité

Les auteurs rapportent une spécificité et une sensibilité de 100 % avec une profondeur de lecture minimale de 30 et un Q score minimal de 30. La couverture des régions ciblées était de 98 %.

Repétabilité

La répétabilité analytique évaluée sur les 120 exons de 80 patients (3 répétitions indépendantes) est de 100 %.

La validation du CHUS

Les technologies et chimies utilisées pour le séquençage du panel comprennent la capture des séquences d'intérêt par le système SeqCap EZ de Nimblegen, le séquençage sur la plateforme Miseq d'Illumina et une analyse bio-informatique comportant des étapes automatisées et manuelles, à l'aide d'outils basés sur les programmes *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) et *Genome Analysis Toolkit* (GATK). Cette approche technique a été validée à l'aide d'un sujet de référence CEPH⁵⁰ (NA12878) obtenu du *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Les exons et les points de jonction de 96 gènes ont été séquencés en deux essais indépendants. Les variations obtenues ont été comparées à celles rapportées précédemment par le NIST⁵¹. Lors de l'analyse bio-informatique des séquences, les paramètres minimaux quant aux variations étaient de qualité supérieure à Q30 (1 erreur sur 1 000) et la couverture était égale ou supérieure à 20X.

Couverture

La couverture médiane du séquençage des 96 gènes était de 90X avec < 0,3 % des séquences montrant une couverture inférieure à 20X. Les gènes du panel de Noonan ont été séquencés chez 20 sujets, ce qui a permis aux demandeurs de déterminer que 3 exons (les exons 1 de *BRAF*, *NF1* et *PTPN11*) doivent être séquencés selon l'approche de Sanger; la couverture de ces exons étant inadéquate par NGS.

Sensibilité

L'approche suivie par le demandeur lui a permis de détecter les 373 variants attendus dans le spécimen NA12878, y compris 14 indels. Ils rapportent donc une sensibilité de 100 % (IC à 95 % : 99-100 %).

L'analyse de 197 variations (comprenant 18 indels) du gène *GAA* présentes chez 20 sujets dont 19 avaient préalablement eu un séquençage par NGS (par le *Laboratory for molecular medicine-Partners Healthcare* et le *Connective Tissue Gene Test Lab*) a également permis d'évaluer une sensibilité de 100 % (IC à 95 % : 98-100 %).

Spécificité

La spécificité a été évaluée à l'aide du spécimen NA12878. Sur 208 variations observées, 4 faux-positifs ont été repérés, ce qui représente une spécificité de 98 % (IC à 95 % : 95-99 %). Parmi les faux-positifs, 1 variant sur 4 était un indel.

Contrôle de la qualité externe

Actuellement, aucune épreuve de contrôle de la qualité externe n'existe pour les approches par NGS. Toutefois, le demandeur est en voie de mettre sur pied un programme d'échange d'échantillons avec l'*Emory Genetics Laboratory* jusqu'à la mise sur pied d'une épreuve par le *College of American Pathologists* (CAP).

Pour le séquençage de type Sanger, ils participent aux épreuves de séquençage et d'interprétation du CAP.

⁵⁰ CEPH : Centre d'étude du polymorphisme humain.

⁵¹ National Institute of Standards and Technology (NIST). Want to better understand the accuracy of your human genome sequencing? [site Web]. Disponible à : <http://www.nist.gov/mml/bbd/ppgenomeinabottle2.cfm>.

Tableau 8 Tableau synoptique

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 : aucune n'a été recensée.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

La complexité de la technologie et de l'interprétation des résultats requière la contribution d'un personnel spécialisé doté d'une formation professionnelle initiale et continue, et appropriée. De plus, l'interprétation des variants repérés nécessite des ressources bio-informatiques et humaines significatives. Entre autres, les logiciels et banques de données de travail doivent fréquemment être mis à jour devant l'évolution rapide des découvertes et connaissances scientifiques.

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

L'utilisation de séquençage de panel de gènes par NGS est une option moins coûteuse que les envois à l'extérieur du Québec effectués actuellement. Toutefois, en fonction du volume d'analyses et de la répartition des diverses analyses de ce type, certains tests, tels que ceux relatifs au dépistage prénatal, seront toujours susceptibles d'être expédiés hors Québec pour respecter le temps-réponse nécessaire.

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

Le séquençage de nouvelle génération est une technologie encore récente et d'évolution rapide. Il en est de même pour les connaissances qui lui sont associées. Les résultats obtenus peuvent influencer les décisions cliniques et personnelles. Toutefois, l'interprétation de ces résultats est parfois variable ou incertaine [Marshall, 2013; Evans et Rothschild, 2012; Makrythanasis et Antonarakis, 2012].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Le syndrome de Noonan possède une hétérogénéité phénotypique et étiologique. La détection de mutations précises chez le patient permet d'assurer un diagnostic et une prise en charge appropriés. Des options de reproduction peuvent également être considérées

suivant la détermination de mutations familiales.

7.2 Validité clinique

La cause génétique du syndrome de Noonan peut être décelée chez environ 70 % à 90 % des patients. Plusieurs gènes associés ont été validés de façon relativement extensive dans plusieurs cohortes de cas sporadiques ou familiaux.

7.3 Validité analytique

L'approche de séquençage par NGS est une option intéressante pour le séquençage de type Sanger grâce à son rendement élevé et à son faible coût. Sa sensibilité et sa spécificité s'élèvent à près de 100 %. L'ACMG recommande toutefois que les variants repérés soient confirmés au moyen d'une autre approche technique.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Pour l'instant, aucune recommandation sur l'utilisation de cette approche pour investiguer les cas de syndrome de Noonan n'a été mise de l'avant. Toutefois, un certain nombre d'experts et d'organismes nationaux et internationaux (ACMG, CAP, CCMG, CDC, CMGS, etc.) ont fait certaines recommandations portant sur la méthodologie et les considérations lors de l'implantation du séquençage de nouvelle génération dans le milieu clinique, l'assurance qualité liée à l'utilisation de cette technologie et la mise en place de critères d'interprétation.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Panel de gènes - Syndrome de Noonan

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 des données de validation locale 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

Notes

- Il s'agit d'une analyse pertinente.
- Il y a un intérêt et un besoin de la faire au Québec au lieu de l'envoyer à l'extérieur de la province.

RÉFÉRENCES

- Acosta MT, Kardel PG, Walsh KS, Rosenbaum KN, Gioia GA, Packer RJ. Lovastatin as treatment for neurocognitive deficits in neurofibromatosis type 1: Phase I study. *Pediatr Neurol* 2011;45(4):241-5.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53(4):549-54.
- Aoki Y et Matsubara Y. Ras/MAPK syndromes and childhood hemato-oncological diseases. *Int J Hematol* 2013;97(1):30-6.
- Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: Novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 2008;29(8):992-1006.
- Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, et al. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 2005;37(10):1038-40.
- Armour CM et Allanson JE. Further delineation of cardio-facio-cutaneous syndrome: Clinical features of 38 individuals with proven mutations. *J Med Genet* 2008;45(4):249-54.
- Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B, Naoki K, et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64(24):8816-20.
- Berger AH, Imielinski M, Duke F, Wala J, Kaplan N, Shi GX, et al. Oncogenic RIT1 mutations in lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2014; [Epub ahead of print].
- Bezieau S, Devilder M-C, Avet-Loiseau H, Mellerin M-P, Puthier D, Pennarun E, et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 2001;18(3):212-24.
- Bhambhani V et Muenke M. Noonan syndrome. *Am Fam Physician* 2014;89(1):37-43.
- Binder G, Grathwol S, Von Loeper K, Blumenstock G, Kaulitz R, et al. Health and quality of life in adults with Noonan Syndrome. *J Pediatr* 2012;161(3):501-5.
- Blackford A, Parmigiani G, Kensler TW, Wolfgang C, Jones S, Zhang X, et al. Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009;69(8):3681-8.
- Bos JL. RAS oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
- Brasil AS, Malaquias AC, Kim CA, Krieger JE, Jorge AA, Pereira AC, Bertola DR. KRAS gene mutations in Noonan syndrome familial cases cluster in the vicinity of the switch II region of the G-domain: Report of another family with metopic craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 2012;158A(5):1178-84.
- Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet* 2007;39(9):1120-6.
- Bromberg-White JL, Andersen NJ, Duesbery NS. MEK genomics in development and disease. *Brief Funct Genomics* 2012;11(4):300-10.

- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Guerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
- Burgess DJ. Anticancer drugs: Blocking RAS effects. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(6):422-3.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
- Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, et al. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 2006;79(1):129-35.
- Chen JL, Zhu X, Zhao TL, Wang J, Yang YF, Tan ZP. Rare copy number variations containing genes involved in RASopathies: Deletion of SHOC2 and duplication of PTPN11. *Mol Cytogenet* 2014;7:28.
- Chen PC, Wakimoto H, Conner D, Araki T, Yuan T, Roberts A, et al. Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated *Sos1* mutation. *J Clin Invest* 2010;120(12):4353-65.
- Cheng YP, Chiu HY, Hsiao TL, Hsiao CH, Lin CC, Liao YH. Scalp melanoma in a woman with LEOPARD syndrome: Possible implication of PTPN11 signaling in melanoma pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 2013;69(4):e186-7.
- Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, et al. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet* 2010;42(1):27-9.
- Cizmarova M, Kostalova L, Pribilincova Z, Lasabova Z, Hlavata A, Kovacs L, Ilencikova D. Rasopathies - dysmorphic syndromes with short stature and risk of malignancy. *Endocr Regul* 2013;47(4):217-22.
- Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 2009;41(9):1022-6.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
- Denayer E, Chmara M, Brems H, Kievit AM, van Bever Y, Van den Ouweland AM, et al. Legius syndrome in fourteen families. *Hum Mutat* 2011;32(1):E1985-98.
- Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, et al. Grouping of multiple-lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am J Hum Genet* 2002;71(2):389-94.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006;444(7119):638-42.
- Estep AL, Tidyman WE, Teitell MA, Cotter PD, Rauen KA. HRAS mutations in Costello syndrome: Detection of constitutional activating mutations in codon 12 and 13 and loss of wild-type allele in malignancy. *Am J Med Genet A* 2006;140(1):8-16.
- Evans JP et Rothschild BB. Return of results: Not that complicated? *Genet Med* 2012;14(4):358-60.

- Ezquieta B, Santomé JL, Carcavilla A, Guillén-Navarro E, Pérez-Aytés A, Sánchez del Pozo J, et al. Alterations in RAS-MAPK genes in 200 Spanish patients with Noonan and other neuro-cardio-facio-cutaneous syndromes. Genotype and cardiopathy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012;65(5):447-55.
- Ferrero GB, Picco G, Baldassarre G, Flex E, Isella C, Cantarella D, et al. Transcriptional hallmarks of Noonan syndrome and Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Hum Mutat* 2012;33(4):703-9.
- Gómez-Seguí I, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, Miyano S, et al. Novel recurrent mutations in the RAS-like GTP-binding gene RIT1 in myeloid malignancies. *Leukemia* 2013;27(9):1943-6.
- Graham JM Jr, Kramer N, Bejjani BA, Thiel CT, Carta C, Neri G, et al. Genomic duplication of PTPN11 is an uncommon cause of Noonan syndrome. *Am J Med Genet A* 2009;149A(10):2122-8.
- Gremer L, De Luca A, Merbitz-Zahradnik T, Dallapiccola B, Morlot S, Tartaglia M, et al. Duplication of Glu37 in the switch I region of HRAS impairs effector/GAP binding and underlies Costello syndrome by promoting enhanced growth factor-dependent MAPK and AKT activation. *Hum Mol Genet* 2010;19(5):790-802.
- Gripp KW et Lin AE. Costello syndrome: A Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genet Med* 2012;14(3):285-92.
- Gripp KW, Lin AE, Nicholson L, Allen W, Cramer A, Jones KL, et al. Further delineation of the phenotype resulting from BRAF or MEK1 germline mutations helps differentiate cardiofacio-cutaneous syndrome from Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;143A(13):1472-80.
- Gripp KW, Lin AE, Stabley DL, Nicholson L, Scott CI Jr, Doyle D, et al. HRAS mutation analysis in Costello syndrome: Genotype and phenotype correlation. *Am J Med Genet A* 2006;140(1):1-7.
- Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, Ruivenkamp C, Lopriore E, Zutt M, et al. Postzygotic HRAS and KRAS mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nat Genet* 2012;44(7):783-7.
- Hafner C et Groesser L. Mosaic RASopathies. *Cell Cycle* 2013;12(1):43-50.
- Hynds DL, Spencer ML, Andres DA, Snow DM. Rit promotes MEK-independent neurite branching in human neuroblastoma cells. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 10):1925-35.
- Jongmans M, Sistermans EA, Rikken A, Nillesen WM, Tamminga R, Patton M, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: New data and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 2005;134(2):165-70.
- Kaski JP et Limongelli G. Cardiomyopathy in children: Importance of aetiology in prognosis. *Lancet* 2014;383(9199):781-2.
- Kerr B, Delrue MA, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I, et al. Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. *J Med Genet* 2006;43(5):401-5.

- Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, et al. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: Dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat* 2010;31(3):284-94.
- Kosaki K, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, et al. PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3529-33.
- Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, et al. Performance comparison of bench-top next generation sequencers using microdroplet PCR-based enrichment for targeted sequencing in patients with autism spectrum disorder. *PLoS One* 2013;8(9):e74167.
- Krab LC, de Goede-Bolder A, Aarsen FK, Pluijm SM, Bouman MJ, van der Geest JN, et al. Effect of simvastatin on cognitive functioning in children with neurofibromatosis type 1: A randomized controlled trial. *JAMA* 2008;300(3):287-94.
- Kranenburg O. The KRAS oncogene: Past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756(2):81-2.
- Kraoua L, Journal H, Bonnet P, Amiel J, Pouvreau N, Baumann C, et al. Constitutional NRAS mutations are rare among patients with Noonan syndrome or juvenile myelomonocytic leukemia. *Am J Med Genet A* 2012;158A(10):2407-11.
- Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergstrasser E, Emanuel PD, et al. The mutational spectrum of *PTPN11* in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease. *Blood* 2005;106(6):2183-5.
- Laycock-van Spyk S, Jim HP, Thomas L, Spurlock G, Fares L, Palmer-Smith S, et al. Identification of five novel SPRED1 germline mutations in Legius syndrome. *Clin Genet* 2011;80(1):93-96.
- Lee BH, Kim JM, Jin HY, Kim GH, Choi JH, Yoo HW. Spectrum of mutations in Noonan syndrome and their correlation with phenotypes. *J Pediatr* 2011;159(6):1029-35.
- Lee KH, Lee JS, Suh C, Kim SW, Kim SB, Lee JH, et al. Clinicopathologic significance of the K-ras gene codon 12 point mutation in stomach cancer: An analysis of 140 cases. *Cancer* 1995;75(12):2794-801.
- Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns JP. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J Med Genet* 2002;39(8):571-4.
- Lepri FR, Scavelli R, Digilio MC, Gnazzo M, Grotta S, Dentici ML, et al. Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. *BMC Med Genet* 2014;15:14.
- Li X, Buckton AJ, Wilkinson SL, John S, Walsh R, Novotny T, et al. Towards clinical molecular diagnosis of inherited cardiac conditions: A comparison of bench-top genome DNA sequencers. *PLoS One* 2013;8(7):e67744.
- Linden HC et Price SM. Cardiofaciocutaneous syndrome in a mother and two sons with a MEK2 mutation. *Clin Dysmorphol* 2011;20(2):86-8.
- Lo IF, Brewer C, Shannon N, Shorto J, Tang B, Black G, et al. Severe neonatal manifestations of Costello syndrome. *J Med Genet* 2008;45(3):167-71.

- Maheshwari M, Belmont J, Fernbach S, Ho T, Molinari L, Yakub I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome type I: Detection of recurrent mutations in exons 3 and 13. *Hum Mutat* 2002;20(4):298-304.
- Makrythanasis P et Antonarakis SE. High-throughput sequencing and rare genetic diseases. *Mol Syndromol* 2012;3(5):197-203.
- Marshall E. Biomedicine. NIH seeks better database for genetic diagnosis. *Science* 2013;342(6154):27.
- Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet* 2010;87(2):250-7.
- Martinez-Quintana E et Rodriguez-González F. LEOPARD syndrome: Clinical features and gene mutations. *Mol Syndromol* 2012;3(4):145-57.
- Matozaki T, Murata Y, Saito Y, Okazawa H, Ohnishi H. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: A proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci* 2009;100(10):1786-93.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20(9):1297-303.
- Mendez HM et Opitz JM. Noonan syndrome: A review. *Am J Med Genet* 1985;21(3):493-506.
- Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillessen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 2003;11(2):201-6.
- Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocr Metab* 2003;88(9):4393-7.
- Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Neri G, Cavé H, Verloes A, et al. Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: Overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;143A(8):799-807.
- Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: Genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 2007;44(12):763-71.
- Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 2010;42(9):794-800.
- Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 2006;38(3):294-6.
- Nonami A, Kato R, Taniguchi K, Yoshiga D, Taketomi T, Fukuyama S, et al. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2004;279(50):52543-51.

- Noonan JA et Ehmke DA. Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. *J Pediatr* 1963;63:468-70.
- Nystrom AM, Ekvall S, Berglund E, Björkqvist M, Braathen G, Duchen K, et al. Noonan and cardio-facio-cutaneous syndromes: Two clinically and genetically overlapping disorders. *J Med Genet* 2008;45(8):500-6.
- Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 2007;39(8):1007-12.
- Pao W et Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;12(2):175-80.
- Pasmant E, Vidaud M, Vidaud D, Wolkenstein P. Neurofibromatosis type 1: From genotype to phenotype. *J Med Genet* 2012;49(8):483-9.
- Pasmant E, Sabbagh A, Hanna N, Masliah-Planchon J, Jolly E, Goussard P, et al. SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype. *J Med Genet* 2009;46(7):425-30.
- Patil S et Chamberlain RS. Neoplasms associated with germline and somatic NF1 gene mutations. *Oncologist* 2012;17(1):101-16.
- Pérez B, Mechinaud F, Galambrun C, Ben Romdhane N, Isidor B, Philip N, et al. Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia *J Med Genet* 2010;47(10):686-91.
- Qiu W, Wang X, Romanov V, Hutchinson A, Lin A, Ruzanov M, et al. Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11). *BMC Struct Biol* 2014;14:10.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012;13:341.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler K W, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418(6901):934.
- Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:355-69.
- Rauen KA, Banerjee A, Bishop WR, Lauchle JO, McCormick F, McMahon M, et al. Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: Moving toward clinical trials in RASopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2011;157C(2):136-46.
- Rauen KA, Tidyman WE, Estep AL, Sampath S, Peltier HM, Bale SJ, Lacassie Y. Molecular and functional analysis of a novel MEK2 mutation in cardio-facio-cutaneous syndrome: Transmission through four generations. *Am J Med Genet A* 2010;152A(4):807-14.
- Rauen KA. Distinguishing Costello versus cardio-facio-cutaneous syndrome: BRAF mutations in patients with a Costello phenotype. *Am J Med Genet A* 2006;140(15):1681-3.
- Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39(8):1013-7.
- 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.

- Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome. *Lancet* 2013;381(9863):333-42.
- Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39(1):70-4.
- Rodenhuis S, van de Wetering ML, Mooi WJ, Evers SG, van Zandwijk N, Bos JL. Mutational activation of the K-RAS oncogene: A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *New Eng J Med* 1987;317(15):929-35.
- Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 2006;311(5765):1287-90.
- Rohrer T. Noonan syndrome: introduction and basic clinical features. *Horm Res* 2009;72(Suppl 2):3-7.
- Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan syndrome: Clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics* 2010;126(4):746-59.
- Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: Molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 2009;30(4):695-702.
- Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, et al. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet* 2003;40(9):704-8.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):295-308.
- Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2006;38(3):331-6.
- Schulz AL, Albrecht B, Arici C, van der Burgt I, Buske A, Gillessen-Kaesbach G, et al. Mutation and phenotypic spectrum in patients with cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome. *Clin Genet* 2008;73(1):62-70.
- Sebolt-Leopold JS. Advances in the development of cancer therapeutics directed against the RAS-mitogen-activated protein kinase pathway. *Clin Cancer Res* 2008;14(12):3651-6.
- Sharland M, Burch M, McKenna WM, Paton MA. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child* 1992;67(2):178-83.
- Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA. The natural history of Noonan syndrome: A long-term follow-up study. *Arch Dis Child* 2007;92(2):128-32.
- Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of RAS oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256(5053):102-5.
- Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 2013;34(7):1035-42.
- Silva FP, Almeida I, Morolli B, Brouwer-Mandema G, Wessels H, Vossen R, et al. Genome wide molecular analysis of minimally differentiated acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2009;94(11):1546-54.

- Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988;16(16):7773-82.
- Smpokou P, Tworog-Dube E, Kucherlapati RS, Roberts AE. Medical complications, clinical findings, and educational outcomes in adults with Noonan syndrome. *Am J Med Genet A* 2012;158A(12):3106-11.
- Sol-Church K, Stabley DL, Nicholson L, Gonzalez IL, Gripp KW. Paternal bias in parental origin of HRAS mutations in Costello syndrome. *Hum Mutat* 2006;27(8):736-41.
- Spencer E, Davis J, Mikhail F, Fu C, Vijzelaar R, Zackai EH, et al. Identification of SPRED1 deletions using RT-PCR, multiplex ligation-dependent probe amplification and quantitative PCR. *Am J Med Genet* 2011;155A(6):1352-9.
- Stark Z, Gillessen-Kaesbach G, Ryann MM, Cirstea IC, Gremer L, Ahmadian MR, et al. Two novel germline KRAS mutations: Expanding the molecular and clinical phenotype. *Clin Genet* 2012;81(6):590-4.
- Tan AY, Michael A, Liu G, Elemento O, Blumenfeld J, Donahue S, et al. Molecular diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using next-generation sequencing. *J Mol Diagn* 2014;16(2):216-28.
- Tartaglia M et Gelb BD. Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: Phenotypic spectrum and molecular mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1214:99-121.
- Tartaglia M et Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: Genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:45-68.
- Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39(1):75-9.
- Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: Molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002;70(6):1555-63.
- Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29:465-8.
- Tassabehji M, Strachan T, Sharland M, Colley A, Donnai D, Harris R, Thakker N. Tandem duplication within a neurofibromatosis type I (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome. *Am J Hum Genet* 1993;53(1):90-5.
- Umbarger MA, Kennedy CJ, Saunders P, Breton B, Chennagiri N, Emhoff J, et al. Next-generation carrier screening. *Genet Med* 2014;16(2):132-40.
- Van der Auwera GA, Carneiro M, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high-confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinform* 2013;43:11.10.1-33.
- Van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:4.
- Van der Burgt I, Berends E, Lommen E, van Beersum S, Hamel B, Mariman E. Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 1994;53(2):187-91.

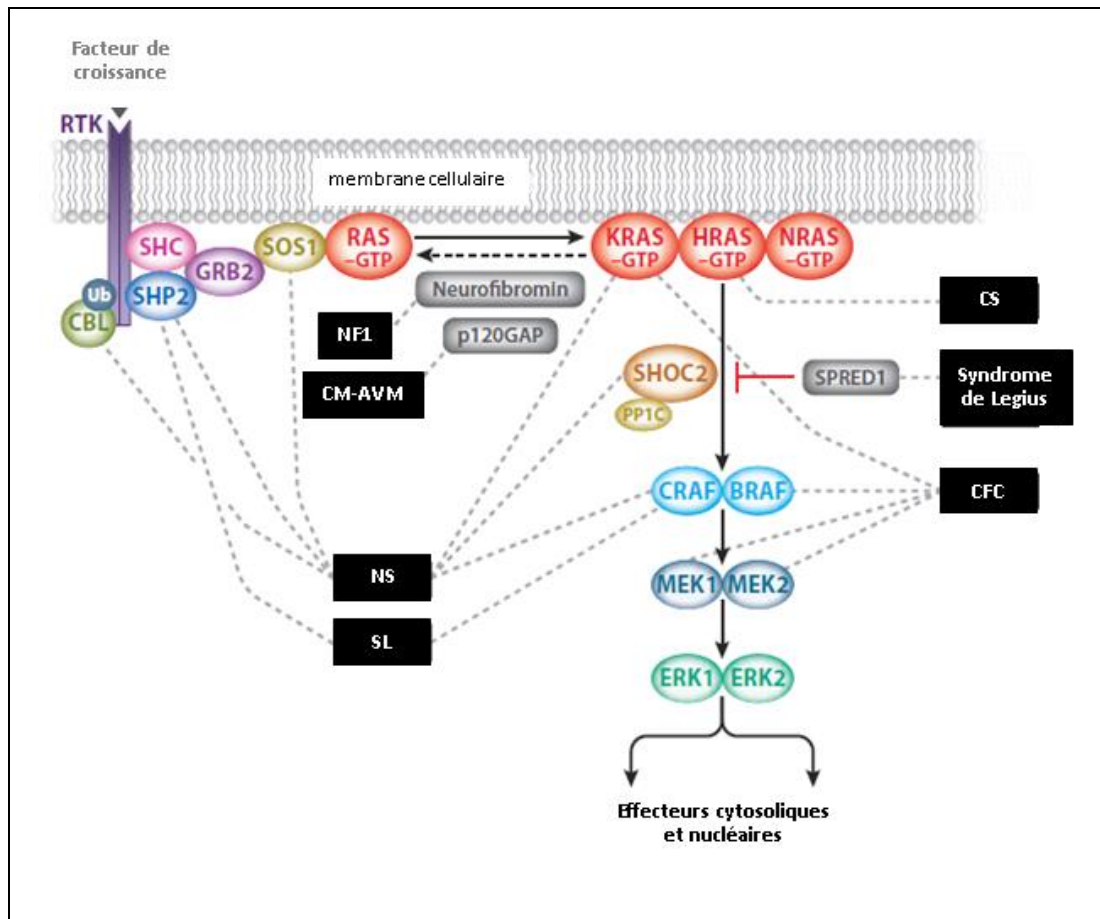
- Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, De Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2745-52.
- Verloes A et Cavé H. Le syndrome de Noonan. *Médecine Foetale et Échographie en Gynécologie* 2010;84:10-7.
- Yoon SR, Choi SK, Eboreime J, Gelb BD, Calabrese P, Arnheim N. Age-dependent germline mosaicism of the most common Noonan syndrome mutation shows the signature of germline selection. *Am J Hum Genet* 2013;92(6):917-26.
- Yoshida R, Hasegawa T, Hasegawa Y, Nagai T, Kinoshita E, Tanaka Y, et al. Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocr Metab* 2004;89(7):3359-64.
- Zampino G, Pantaleoni F, Carta C, Cobellis G, Vasta I, Neri C, et al. Diversity, parental germline origin, and phenotypic spectrum of de novo HRAS missense changes in Costello syndrome. *Hum Mutat* 2007;28(3):265-72.
- Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, et al. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. *J Med Genet* 2007;44(2):131-5.
- Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr* 2004;144(3):368-74.

Enrichissement des régions d'ADN génomique par SeqCAP EZ de Nimblegene (adapté de www.nimblegene.com)



ANNEXE B

Voie de signalisation RAS-MAPK (adapté de Rauen, 2013)



Cette voie de signalisation est impliquée dans les processus de différenciation cellulaire, de motilité, d'apoptose et de sénescence. Les RASopathies sont associées avec des mutations qui affectent les gènes des différents effecteurs de cette voie. En pointillé, notons les gènes touchés dans les différentes RASopathies.

Légende :

NS : syndrome de Noonan

CFC : syndrome cardio-facio-cutané

NF : neurofibromatose de type 1

CM-AVM : syndrome de malformation capillaire - malformation artério-veineuse

SC : syndrome de Costello

SL : syndrome LEOPARD

MESURE QUANTITATIVE DE L'ÉTHYLGLUCURONIDE (ET DE L'ÉTHYLSULFATE) PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE 2014.01.005)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHUM

1.2 Date de transmission de la demande d'examen au MSSS : 30 septembre 2013

1.3 Date de réception de la demande à l'INESSS : 1^{er} mars 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juin 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 (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry* ou LC-MS/MS).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

La technique comporte trois étapes :

- 1) la préparation de l'échantillon;
- 2) la chromatographie en phase liquide (LC);
- 3) l'analyse par spectrométrie de masse (MS).

La préparation de l'échantillon permet de purifier celui-ci en enlevant les protéines et d'autres substances avant de l'analyser. Elle peut se faire 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 de préparation des échantillons du requérant consiste à ajouter un acide organique aux spécimens urinaires avant de les analyser par LC-MS/MS.

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 liquides et solides varie en fonction du type de molécule à purifier.

La MS vise à déterminer la masse des molécules présentes dans l'échantillon d'intérêt. 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 :

- 1) d'une source d'ionisation pour modifier la charge des molécules et les faire passer en phase gazeuse (p. ex. : ionisation par électronébulisation (ESI), ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou autre).
- 2) 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 rapport m/z (purification). L'ion purifié est ensuite fragmenté dans une chambre de collision. Un deuxième analyseur mesure le rapport m/z des fragments [Adaway et Keevil, 2012; Grebe et Singh, 2011].

2.3 Société ou développeur

L'analyse est effectuée selon une méthode maison. La mesure quantitative de l'éthylglucuronide (EtG) et de l'éthylsulfate (EtS) se fait à partir d'un échantillon d'urine. La méthode du requérant⁵² pour la préparation des échantillons consiste à ajouter l'acide acétique (10 %) aux spécimens urinaires avant de les analyser par LC-MS/MS.

2.4 Licence : sans objet.

2.5 Brevet, le cas échéant : sans objet.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Sans objet. L'analyse est réalisée par le biais d'une méthode « maison ». Le requérant utilise un contrôle de la qualité interne (pool maison) et un contrôle de la qualité externe Arvecon (*Proficiency Testing Scheme of the Society of Toxicological and Forensic Chemistry*).

2.7 Valeur pondérée : 44,0

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

3.1 Patients ciblés

L'analyse cible les patients en attente d'une greffe de foie et les patients traités en clinique de toxicomanie.

3.2 Description de la maladie visée

Problème important, la consommation d'alcool peut provoquer une maladie hépatique grave qui nécessite une transplantation du foie. Ce problème a des répercussions pour le patient autant avant qu'après la transplantation [Allen *et al.*, 2013].

La revue de littérature d'Allen et ses collaborateurs [2013] rapporte que la cirrhose alcoolique constitue entre 20 % et 30 % des indications de transplantation hépatique.

⁵² Information d'après la procédure opératoire normalisée (PON) du requérant.

Ce ne sont pas tous les patients atteints d'une cirrhose alcoolique qui seront candidats à une transplantation hépatique, mais seulement ceux pour lesquels un traitement approprié et une abstinence prolongée n'ont pas réussi à améliorer la condition hépatique⁵³. En cas de transplantation, l'abstinence chez ces patients permettrait de stabiliser leur condition avant la transplantation et d'améliorer le pronostic après la greffe. Toutefois, ces patients récidivent assez fréquemment, malgré leur engagement à arrêter de consommer. Or, au Canada, la transplantation n'est pas envisagée dans le cas des patients qui ne respectent pas l'avis médical de cesser de consommer de l'alcool⁵⁴. Par ailleurs, il est mentionné dans une publication québécoise que la plupart des programmes de transplantation hépatique exigent une période d'abstinence d'alcool ou de drogues d'au moins six mois⁵⁵.

La présence d'alcool dans le sang, l'haleine ou l'urine est de courte durée, ce qui rend la surveillance de la consommation ardue. Des marqueurs de l'alcool résiduel, comme l'éthylglucuronide, ont une demi-vie plus longue que l'éthanol et peuvent permettre de valider la consommation dans une fenêtre de détection plus large. L'information fournie par ces marqueurs ne peut pas être obtenue de façon fiable par l'autodéclaration du patient lui-même [Allen *et al.*, 2013; Jatlow et O'Malley, 2010].

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur prévoit faire de 180 à 200 analyses par année.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Gastro-entérologie, chirurgie de transplantation, toxicologie et psychologie.

3.5 Modalités d'administration du test

La mesure peut être effectuée dans le sang, l'urine ou les cheveux [Albermann *et al.*, 2012; Concheiro *et al.*, 2009]. Le demandeur propose un test urinaire. Le prélèvement doit être fait par le patient sur place, et sous surveillance par le personnel en soins infirmiers afin de prévenir des tentatives d'adultération des échantillons.

L'analyse de l'EtG est influencée par la synthèse ou la dégradation microbienne. Par conséquent, la conservation des échantillons de façon adéquate est conseillée [Helander *et al.*, 2009]. Par ailleurs, étant donné que les concentrations de l'EtG et de l'EtS sont influencées par une dilution de l'urine par l'ingestion excessive de liquide avant l'échantillonnage, le dosage de la créatinine est suggéré afin de réaliser le monitoring de la dilution non physiologique [Helander *et al.*, 2010].

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

L'analyse doit être réalisée avec le dosage urinaire de créatinine et de glucose.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la consommation d'alcool. Notons, parmi celles-

⁵³ Fondation canadienne du foie. Explications sur les transplantations [site Web]. Disponible à : <http://www.liver.ca/fr/liver-disease/liver-transplants/how-do-transplants-work/> (consulté le 12 mai 2014).

⁵⁴ *Ibid.*

⁵⁵ La transplantation. L'Avant-Garde 2009;9(2). Disponible à : http://www.chumontreal.qc.ca/sites/default/files/documents/A_propos/PDF/ag_vol9_no2.pdf (consulté le 12 mai 2014).

ci, l'utilisation de biomarqueurs comme la transferrine déficiente en carbohydrate (CDT), l'éthylglucuronide et le phosphatidyléthanol (PEth), de même que l'autodéclaration par le patient [Allen *et al.*, 2013; Walsham et Sherwood, 2012].

La transferrine est une glycoprotéine synthétisée et sécrétée par le foie. La consommation d'alcool modérée ou importante (50 à 80 g/jour) diminue le contenu en carbohydrate de la transferrine. Son dosage, combiné à celui du GGT⁵⁶, augmente la sensibilité sans compromettre la spécificité [Allen *et al.*, 2013]. Le dosage de la CDT exclusivement pour le diagnostic des anomalies congénitales de la glycosylation a déjà reçu un avis favorable de l'INESSS et il a été ajouté au *Répertoire*.

Différentes méthodes analytiques peuvent être utilisées pour doser l'EtG (et l'EtS) : la chromatographie gazeuse ou liquide couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS⁵⁷, LC-MS⁵⁸) ou de masse en tandem ou multiple (LC-MS/MS⁵⁹, LC-MS^{n 60}, la chromatographie liquide couplée à une détection électrochimique pulsée (LC-PED⁶¹), la CZE⁶², la EIA⁶³ et les tests immunochimiques [Albermann *et al.*, 2012; Joya *et al.*, 2012; Staufer *et al.*, 2011]. Toutefois, la méthode LC-MS/MS semble être la méthode la plus souvent utilisée dans les études.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La plupart des marqueurs biologiques sanguins [Palmer, 2009] de la consommation d'alcool (gamma-glutamyl-transférase ou GGT, transferrine déficiente en carbohydrate ou CDT, aspartate aminotransférase ou AST, alanine aminotransférase ou ALT, volume globulaire moyen ou VGM) ne sont pas assez spécifiques et sensibles pour être utilisés seuls. Leur combinaison est recommandée pour améliorer la performance du diagnostic [Kharbouche *et al.*, 2009].

L'éthylglucuronide (EtG) est un métabolite⁶⁴ direct de l'éthanol. Il est propre à l'alcool et apparaît rapidement après une consommation, même très légère (10 g d'alcool, ou un verre) et il est détectable dans l'urine pendant plusieurs heures (35 à 130 heures) après la consommation [Concheiro *et al.*, 2009; Helander *et al.*, 2009]. Une durée similaire est observée pour l'éthylsulfate (EtS) [Helander *et al.*, 2009]. Toutefois, la durée de détection de l'EtG et de l'EtS présente une grande variabilité interindividuelle [Kummer *et al.*, 2013], même après l'ajustement des valeurs selon la dilution de l'urine et une durée estimée d'élimination complète de l'éthanol [Helander *et al.*, 2009].

La présence de l'EtG dans le sang ou l'urine est propre à la consommation d'alcool, mais il se peut que l'éthanol contenu dans les rince-bouches, par exemple, puisse laisser des traces repérables [Kharbouche *et al.*, 2009]. Une bonne définition du seuil de diagnostic est indispensable [Imbert *et al.*, 2012].

⁵⁶ Gamma-glutamyl-transférase.

⁵⁷ Chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

⁵⁸ Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse.

⁵⁹ Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem.

⁶⁰ Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse multiple.

⁶¹ Détection électrochimique pulsée (*Pulsed electrochemical detection*).

⁶² Électrophorèse capillaire automatisée (*capillary zone electrophoresis*).

⁶³ Immunoessai enzymatique (*Enzymatic immunoassay*).

⁶⁴ Une petite quantité (< 0,1 %) de l'éthanol ingéré se transforme en des formes conjuguées de l'acide glucuronide et du sulfate, soit respectivement l'éthylglucuronide (EtG) et l'éthylsulfate (EtS) [Helander *et al.*, 2009].

La LC-MS/MS est une méthode permettant de quantifier l'EtG (et l'EtS) de façon plus spécifique que les essais immunologiques puisqu'elle évite les réactions croisées entre les métabolites pouvant provenir d'autres sources, notamment de la médication chez les patients ayant une maladie hépatique.

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 par un autre test : sans objet.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Mortalité et morbidité

L'analyse sert à documenter et à faire le suivi de la consommation d'alcool (ou de l'abstinence). Aucune donnée probante n'a été répertoriée quant au lien entre ce suivi et les taux de mortalité et de morbidité, bien que la sélection des candidats à la transplantation qui ne consomment pas d'alcool permettrait d'améliorer les paramètres de santé des transplantés [Staufer *et al.*, 2011] ou d'augmenter leur taux de survie à long terme [Erim *et al.*, 2007].

Modifications du traitement en raison des résultats du test

L'abstinence d'alcool est un des critères importants pour accéder à une greffe du foie. Elle peut réduire les complications graves de la maladie hépatique et même, dans certains cas, faire en sorte que la transplantation ne soit plus nécessaire [Erim *et al.*, 2007]. Le patient en attente d'une greffe du foie qui obtient un résultat positif, c'est-à-dire indiquant une consommation d'alcool, pourra s'attendre à ce que son nom ne progresse plus (*standby*) sur la liste d'attente ou soit retiré de la liste pour la transplantation [Erim *et al.*, 2007]. Aucune donnée probante n'est toutefois disponible.

Chez les patients en clinique de toxicomanie, l'analyse sert à documenter la consommation d'alcool afin d'assurer un suivi objectif et, au besoin, d'ajuster les services (psychosociaux) ou les traitements offerts (médication). Aucune donnée probante n'est toutefois disponible pour démontrer les répercussions de cette surveillance sur le succès des programmes en toxicologie.

5.1.3 Valeur thérapeutique

La sélection optimale des candidats à la transplantation et une détection des récidives de consommation d'alcool après une transplantation sont nécessaires afin d'améliorer les paramètres de santé à long terme [Staufer *et al.*, 2011]. Or, le suivi de la consommation d'alcool chez les patients peut être effectué au moyen d'une méthode analytique permettant une évaluation de façon objective et vérifiable [Lande et Marin, 2013], contrairement à un questionnaire autodéclaré dont les renseignements ne sont pas toujours fiables ni exacts [Wetterling *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2013; Dahl *et al.*, 2011; Webzell *et al.*, 2011].

Il n'y a pas de consensus relatif à une valeur seuil (de positivité) pour prendre une décision clinique [Helander *et al.*, 2010]. Toutefois, les valeurs les plus souvent utilisées pour l'EtG et l'EtS sont 0,5 µg/ml et 0,1 µg/ml, respectivement.

5.2 Validité diagnostique

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

Sensibilité, spécificité, VPP, VPN et exactitude

Les données relatives à la sensibilité, à la spécificité, à la valeur prédictive positive, à la valeur prédictive négative et à l'exactitude sont présentées au tableau 1. Les résultats de deux études [Stewart *et al.*, 2013; Helander *et al.*, 2010] indiquent que la méthode LC-MS/MS détecte l'EtG avec une sensibilité d'au moins 70 % et une spécificité d'au moins 93 %. La VPP est d'au moins 81 % et la VPN, d'au moins 85 %. L'exactitude varie de 86 % à 99 %.

Autres analyses

Selon l'étude de Kummer et ses collaborateurs [2013], il y aurait une faible corrélation entre le nombre de consommations d'alcool par jour avant l'échantillonnage et les concentrations d'EtG détectées ($r = 0,448$, $p < 0,02$) et d'EtS ($r = 0,406$, $p < 0,04$). Dans l'étude de Stewart et ses collaborateurs [2013], une régression logistique a été effectuée en tenant compte de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique et de la gravité de la maladie hépatique. Aucune corrélation ($p > 0,25$) n'a été trouvée entre ces variables et la positivité des analyses de l'EtG et de l'EtS (trois jours après une consommation d'alcool).

Tableau 1 Sensibilité et spécificité diagnostiques, VPP, VPN et exactitude des analyses de l'EtG et de l'EtS dans les échantillons urinaires

ÉTUDE (PAYS)	MARQUEUR ET MÉTHODE	VALEUR SEUIL (µg/ml)	N	SE (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)	RC	EXACTITUDE
Helander <i>et al.</i> , 2010 (Suède)	EtG LC-MS/MS vs LC-MS/MS (EPS)¥	0,5							0,1 µg/ml : 86,2 % (350/406) 0,3 µg/ml : 95,7 % (369/414) 0,5 µg/ml : 98,1 % (417/425) 0,75 µg/ml : 99,3 % (410/413) 1 µg/ml : 95,8 % (411/429)
	EtG LC-MS (EPS) vs LC-MS/MS (EPS)¥	0,5							0,1 µg/ml : 90,2 % (387/429) 0,3 µg/ml : 94,4 % (405/429) 0,5 µg/ml : 97,0 % (416/429) 0,75 µg/ml : 94,6 % (406/429) 1 µg/ml : 96,3 % (413/429)
	EtG LC-MS vs LC-MS/MS (EPS)¥	0,5							0,1 µg/ml : 85,5 % (367/429) 0,3 µg/ml : 94,2 % (404/429) 0,5 µg/ml : 97,7 % (419/429) 0,75 µg/ml : 95,3 % (409/429) 1 µg/ml : 96,7 % (415/429)
Piano <i>et al.</i> , 2014 (Italie)	EtG EIA homogène	0,5	121	89,2	98,9	97,1	95,4	414,5 [61,1, > 999,9], $p < 0,0001$ ‡ 493,8 [51,3, > 999,9], $p < 0,0001$ §	95,9 %
Staufer <i>et al.</i> , 2011 (Allemagne)	EtG EIA LC-MS/MS (pour confirmation)	0,5	141	89,3	98,9	89,3	98,9	761,1 [145,9, 3970,5] $p < 0,0001$ †	
Stewart <i>et al.</i> , 2013 (États-Unis)	EtG (3 jours*) LC-MS/MS	0,1	120	76	93	81	91		91,7 % (110/120)
	EtG (7 jours*) LC-MS/MS		120	70	99	97	85		

ÉTUDE (PAYS)	MARQUEUR ET MÉTHODE	VALEUR SEUIL (µg/ml)	N	SE (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)	RC	EXACTITUDE
	EtS (3 jours*) LC-MS/MS	0,025	120	82	86	70	93		91,7 % (110/120)
	EtS (7 jours*) LC-MS/MS		120	73	89	80	85		

Abréviations : EIA : immunoessai enzymatique; EPS : extraction en phase solide; GH : greffe hépatique; N : nombre d'échantillons; RC : rapport de cote; Se : sensibilité; Sp : spécificité; VPP : valeur prédictive positive; VPN : valeur prédictive négative.

*Nombre de jours après une consommation d'alcool.

†Estimation du risque de consommation d'alcool, analyse univariée.

‡Facteur de prédiction de la consommation d'alcool, analyse univariée.

§Estimation du risque de consommation d'alcool, analyse multivariée.

¶L'exactitude a été calculée manuellement en utilisant la méthode LC-MS/MS (EPS) comme méthode de référence. Les échantillons urinaires proviennent d'études cliniques, d'expériences de consommation d'alcool et d'échantillons d'un pool de routine du laboratoire.

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

Le tableau 3 présente les données relatives à la sensibilité analytique, en matière de limite de détection.

Répétabilité, reproductibilité

Le tableau 4 fournit les données relatives à la répétabilité et à la reproductibilité.

Spécificité analytique, interférence, recouvrement et effet de matrice

Le tableau 5 fait état des données relatives à la spécificité analytique. La méthode LC-MS/MS ne présente aucune ou peu d'interférence pour des concentrations supérieures à la valeur seuil de 0,5 µg/ml. Le taux de recouvrement est supérieur à 75 %, sauf dans l'étude de Concheiro et ses collaborateurs [2009] qui présente un recouvrement de 55 % à une concentration d'EtG de 5 µg/ml.

Tableau 2 Études de validation de la mesure de l'éthylglucuronide (EtG) ou de l'éthylsulfate (EtS) dans les échantillons urinaires

ÉTUDE (PAYS)	MARQUEUR	NOMBRE DE SPÉCIMENS	VOLUME (µl)*	ANALYSE PAR CL-MS/MS OU MÉTHODE VARIANTE						
				MÉTHODE DE PRÉPARATION	CONTRÔLE INTERNE	IONISATION ET DÉTECTION	LOD (µg/ml)	LLOQ (µg/ml)	LINÉARITÉ (µg/ml)	COEFFICIENT DE LINÉARITÉ
Albermann <i>et al.</i> , 2012 (Allemagne)	EtG	6	10	PP	EtG-D ₅	ESI mode ion négatif, MRM (LC-MS/MS)	0,005	0,019	0,025-2	$R = 0,9989$
	EtS	6	10		EtS-D ₅		0,005	0,015	0,025-2	$R^2 = 0,9982$
Beyer <i>et al.</i> , 2011 (Australie)	EtG et EtS	6 replicats pour ch. des 7 conc.	10	DID	-	APCI, mode MRM (LC-MS/MS)	-	0,1	0,1-10	$r^2 > 0,99$
Concheiro <i>et al.</i> , 2009 (Espagne)	EtG	5	10	Acide formique (0,1 %)	EtG-D ₅	ESI mode ion négatif, SRM (LC-MS/MS)	0,1	0,25	0,25-100	$r^2 = 0,9983$
Helander <i>et al.</i> , 2010 (Suède)	EtG et EtS	-	-	EPS ou DID	EtG-D ₅ EtS-D ₅	ESI mode ion négatif, SRM (LC/MS/MS)	Pour EtG EPS : < 0,001 DID : 0,003	EtG : 0,5 EtS : 0,1	EtG : 0,1-100	-
	EtG et EtS	-	10	EPS ou DID	EtG-D ₅ EtS-D ₅	ESI, mode SIM (LC-MS)	Pour EtG EPS : 0,03 DID : 0,10	-	EtG : 0,1-100 EtS : 0,05-50	-
Kummer <i>et al.</i> , 2013 (Belgique)	EtG et EtS Seuil† : 0,1 µg/ml (les 2 métabolites)	27	5	PP	EtG-D ₅ EtS-D ₅	ESI mode ion négatif, MRM (UPLC-MS/MS)	0,1	-	0,1-10	-
Zheng et Helander, 2008 (Suède)	EtG Seuil† : 0,5 µg ml	-	10	EPS	EtG-D ₅	ESI (LC-MS)	< 0,1	-	0,1-100	-

Abréviations : APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique (*atmospheric pressure chemical ionization*); APCI-MS : spectrométrie de masse-ionisation chimique à pression atmosphérique (*atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*); ch. : chacune; conc. : concentration; DID : dilution et injection directe; ELL : extraction liquide-liquide; EPS : extraction en phase solide ; ESI : ionisation par électrospray (*electrospray ionization*); FPIA : immunoessai par polarisation de fluorescence; IMS : *positive- and negative-ion mode switching*; LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse; LC/ESI-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem; LLOQ : limite inférieure de la quantification (*lower limit of quantification*); µg/ml : microgramme par millilitre; MRM : suivi de réactions multiples (*multiple reaction monitoring*); PP : précipitation de protéines; pg : picogramme; SIM : détection d'ions déterminés (*selected-ion monitoring*); SRM : suivi de réaction sélectionné (*selected reaction monitoring*); UPLC-MS/MS : chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

*Volume injecté au système de chromatographie liquide.

†Valeur seuil (*cut-off*).

Tableau 3 Répétabilité et reproductibilité de la LC-MS/MS lors de la mesure de l'éthylglucuronide (EtG) ou de l'éthylsulfate (EtS)

ÉTUDE	MARQUEUR (MÉTHODE)	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE* (µg/ml)	INTRA-ESSAI		INTER-ESSAI		INTRA-DAY		INTER-DAY	
				SCORE Z	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	BIAIS (%)	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	CV (%)	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	CV (%)	ÉCART-TYPE RELATIF (%)
Albermann <i>et al.</i> , 2012	EtG (LC-MS/MS)	2†	0,1			-7,13			4,5		4,61
		2†	0,35			9,51			3,78		3,78
		2†	1,5			4,44			2,26		3,80
	EtS (LC-MS/MS)	2†	0,1			0,93			3,15		7,31
		2†	0,35			2,68			2,42		2,81
		2†	1,5			3,44			1,84		3,55
Beyer <i>et al.</i> , 2011	EtG (LC-MS/MS)	8 jours consécutifs	0,1			-8,2			7,2		
			0,6			6,4			6,5		
			4,5			8,1			6,9		
			9,0			0,8			4,3		
			50			2,0			6,0		
	EtS (LC-MS/MS)	8 jours consécutifs	0,1			0,7			7,0		
			0,6			-11,3			6,0		
			4,5			6,9			5,9		
			9,0			-5,0			3,2		
			50			-0,4			5,8		
Concheiro <i>et al.</i> , 2009	EtG (LC-MS/MS) Transition SRM 221,2 > 221,2/221,2 > 74,7	5 (<i>intra-day</i>) 6 (<i>inter-day</i>)§	0,25					5,5			11,6
		5 (<i>intra-day</i>) 6 (<i>inter-day</i>)§	2,5					5,2			2,6
		5 (<i>intra-day</i>) 6 (<i>inter-day</i>)§	100					2,1			5,4

ÉTUDE	MARQUEUR (MÉTHODE)	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE* (µg/ml)	INTRA-ESSAI		INTER-ESSAI		INTRA-DAY		INTER-DAY	
				SCORE Z	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	BIAIS (%)	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	CV (%)	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	CV (%)	ÉCART-TYPE RELATIF (%)
	EtG (LC-MS/MS) Transition SRM 221,2 > 221,2/221,2 > 84,8	5 (<i>intra-day</i>) 6 (<i>inter-day</i>)§	0,25					13,2			9,1
		5 (<i>intra-day</i>) 6 (<i>inter-day</i>)§	2,5					6,3			5,9
		5 (<i>intra-day</i>) 6 (<i>inter-day</i>)§	100					1,2			4,4
Kummer <i>et al.</i> , 2013	EtG (UPLC-MS/MS)	8 jours différents	0,100			3,70	6,64				
			0,300			-0,74	6,41				
			0,878			-4,18	3,63				
			3,020			-1,41	3,60				
			4,000			-1,00	2,38				
			7,500			0,26	2,29				
	EtS (UPLC-MS/MS)	8 jours différents	0,100			-4,65	3,59				
			0,300			6,02	4,08				
			0,920			-12,53	2,22				
			1,750			-4,45	3,10				
			4,000			-0,01	3,32				
			7,500			-4,95	2,39				
	EtG (UPLC-MS/MS)	4 (<i>proficiency test**</i>)	0,556	0,10							
			0,800	-0,46							
			0,832	0,23							
			1,450	-0,22							

ÉTUDE	MARQUEUR (MÉTHODE)	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE* (µg/ml)	INTRA-ESSAI		INTER-ESSAI		INTRA-DAY		INTER-DAY	
				SCORE Z	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	BIAIS (%)	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	CV (%)	ÉCART- TYPE RELATIF (%)	CV (%)	ÉCART-TYPE RELATIF (%)
	EtS (UPLC-MS/MS)	4 (<i>proficiency test</i>)	0,885	0,57							
			0,899	-0,16							
			1,070	0,23							
			1,100	-0,86							
Zheng et Helander, 2008	EtG (LC-MS)	15‡	0,5			4,9					
		15‡	1			4,1					
		15‡	5			5,4					

Abréviations : CV : coefficient de variation; sem : semaine; HPLC-DAD : chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes; *intra-day*: intrajournalier (au cours d'une même journée); *inter-day* : d'une journée à l'autre.

* Une conversion des unités présentées dans les études est faite aux fins d'uniformité.

** Épreuves de compétence.

† Chacune des concentrations ont été analysées en duplicata pendant huit jours consécutifs.

‡ Les analyses ont été faites en triplicata pendant cinq jours distincts.

§ Pour la mesure *intra-day*, cinq réplicats ont été analysés la même journée, alors que pour la mesure *inter-day*, six échantillons ont été analysés, à cinq jours différents.

Tableau 4 Recouvrement et interférences

ÉTUDE	N	MARQUEUR	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	RECOUVREMENT (%)	EFFET DE MATRICE (%)	INTERFÉRENCES
Albermann <i>et al.</i> , 2012	6	EtG	0,1	95	79	Aucune (n = 10)
	6		1,5	93	69	
	6	EtS	0,1	98	104	-
	6		1,5	92	94	
Beyer <i>et al.</i> , 2011	10	EtG	0,6	-	5,6 (RSD)	-
	10		4,5	-	5,6 (RSD)	
	10		9,0	-	5,4 (RSD)	
	10	EtS	0,6	-	6,2(RSD)	-
	10		4,5	-	9,2 (RSD)	
	10		9,0	-	7,9 (RSD)	
Concheiro <i>et al.</i> , 2009	10	EtG	5	55	-	Aucune
Kummer <i>et al.</i> , 2013	6	EtG	0,3	81	84	-
	6		4	80	80	
	6		7,5	79	76	
	6	EtS	0,3	76	106	-
	6		4	81	95	
	6		7,5	80	88	
Zheng et Helander, 2008	-	EtG	0,5	81-86 (RA)	-	Présence de bruit de fond (pics d'interférence) pour les concentrations < 0,5 µg/ml, rendant difficile la mesure quantitative de l'EtG; la valeur seuil est de 0,5 µg/ml.
			5	77-81 (RA)	-	-

Abréviations : N : nombre de spécimens; RA : recouvrement absolu; RSD : écart-type relatif (*relative standard deviation*).

Corrélation entre le test et le comparateur

Le tableau 6 fournit les données relatives à la corrélation entre le test et le comparateur. Les coefficients présentent des valeurs supérieures à 0,95, ce qui indique une très bonne corrélation entre les méthodes étudiées.

Tableau 5 Corrélation entre la LC-MS/MS et une méthode comparative dans des échantillons urinaires

ÉTUDE	MÉTHODES	COEFFICIENT DE CORRÉLATION RÉGRESSION DE PASSING ET BABLOK	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS
Helander <i>et al.</i> , 2010	LC-MS/MS vs LC-MS/MS (EPS)	$r = 0,9594$	348 ($< 2 \mu\text{g/ml EtG}$)
	LC-MS (EPS) vs LC-MS/MS (EPS)	$r = 0,9662$	348 ($< 2 \mu\text{g/ml EtG}$)
	LC-MS vs LC-MS/MS (EPS)	$r = 0,9562$	348 ($< 2 \mu\text{g/ml EtG}$)
Zheng et Helander, 2008	LC-MS/MS vs LC-MS (EPS)	$r^2 = 0,959, p < 0,001$	481

Abréviations : EPS : extraction en phase solide; EIA : immunoessai enzymatique (*enzymatic immunoassay*).

Le graphique de Bland-Altman (*Bland-Altman plot*) montre que le biais moyen est de 0,03 [entre -0,19 et 0,26]. La plupart des points sont à l'intérieur de deux écarts-type. [Zheng et Helander, 2008].

Données du requérant

Le seuil de positivité est de 255 $\mu\text{mol d'EtG/mol}$ de créatinine, soit 0,5 $\mu\text{g/ml d'EtG}$, en considérant 8,85 mmol/l de créatinine.

La limite de détection de l'EtG est de 0,885 mmol/l et celle de l'EtS, 0,800 mmol/l, selon l'équipement du requérant⁶⁵.

5.4 Recommandations d'autres organismes

L'abstinence d'alcool est un critère d'accès à la transplantation hépatique chez les patients en liste d'attente. Il est donc recommandé d'assurer un suivi de la consommation d'alcool⁶⁶. L'analyse de l'EtG (et de l'EtS) urinaire est un moyen d'évaluer, de façon objective, l'abstinence d'alcool ou de documenter sa consommation.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

L'analyse s'effectue à l'aide de matériel et d'un appareil déjà en place dans plusieurs centres hospitaliers. Étant donné qu'elle s'accompagne d'autres tests analytiques, des ressources

⁶⁵ Information d'après la procédure opératoire normalisée (PON) du requérant.

⁶⁶ Fondation canadienne du foie. Explications sur les transplantations [site Web]. Disponible à : <http://www.liver.ca/fr/liver-disease/liver-transplants/how-do-transplants-work/> (consulté le 12 mai 2014).

supplémentaires sont à prévoir. La disponibilité du personnel qualifié est à prendre en considération.

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 (sociaux, juridiques, politiques)

Les résultats de la présente analyse peuvent aussi avoir des répercussions cliniques, légales ou sociales négatives sur la vie des personnes. Par exemple, la non-abstinence pourrait conduire à un refus d'accorder une transplantation hépatique ou constituer un bris d'une condition imposée par un tribunal dans le cas de la garde d'enfants.

La spécificité diagnostique du test est importante, compte tenu des enjeux et des répercussions possibles sur le maintien du traitement (greffe ou désintoxication) d'une personne dont l'analyse aurait eu un résultat faussement positif. Il faut être prudent lorsqu'un résultat positif d'EtG est utilisé comme preuve primaire ou unique de la consommation d'alcool dans le but de poser une action légale ou disciplinaire [Helander *et al.*, 2009; Kissack *et al.*, 2008]. En effet, des résultats faussement positifs peuvent être obtenus par un contact direct (rinçage-bouches, désinfectants) ou par l'exposition à des vapeurs d'éthanol (par inhalation) dont la source n'est pas toujours connue ni évitable [Arndt *et al.*, 2014; Hoiseith *et al.*, 2010].

D'autre part, la prévention contre la falsification des échantillons par l'adultération ou la dilution est recommandée. L'EtG est sensible à la dégradation microbienne (mais non l'EtS) si les échantillons ne sont pas conservés de façon appropriée, ce qui peut entraîner l'obtention de résultats faussement négatifs [Helander *et al.*, 2009]. Par conséquent, l'analyse de l'EtG nécessite l'utilisation complémentaire d'un autre test avec un biomarqueur différent comme la créatinine [Helander *et al.*, 2009] afin d'effectuer le monitoring de la dilution non physiologique [Helander *et al.*, 2010].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

L'analyse sert à sélectionner les candidats à la transplantation hépatique afin de vérifier leur abstinence d'alcool. Elle permettrait d'améliorer les paramètres de santé des patients ou leur taux de survie à long terme quoiqu'aucune donnée probante n'ait été répertoriée. L'analyse de l'EtG est plus fiable et plus sensible que l'utilisation du questionnaire autodéclaré ou du test d'alcool par l'haleine.

Chez les patients en clinique de toxicomanie, l'analyse sert à documenter la consommation d'alcool afin d'assurer un suivi objectif et vérifiable dans le but d'ajuster les services ou les traitements offerts. Aucune donnée probante n'est toutefois disponible pour démontrer les répercussions de ce monitoring sur le succès des programmes en toxicologie.

7.2 Validité diagnostique

Les paramètres de validité diagnostique montrent des valeurs d'au moins 70 %. L'analyse par LC-MS/MS a une spécificité d'au moins 93 %.

7.3 Validité analytique

L'analyse par LC-MS/MS est sensible, reproductible et relativement spécifique. Le taux de recouvrement est supérieur à 75 %.

7.4 Recommandations d'autres organismes

L'abstinence d'alcool est un critère d'accès à la transplantation hépatique chez les patients en liste d'attente. Il est donc recommandé d'assurer un suivi de la consommation d'alcool⁶⁷. L'analyse de l'EtG (et de l'EtS) urinaire est un moyen d'évaluer, de façon objective, l'abstinence d'alcool ou de documenter sa consommation.

⁶⁷ Fondation canadienne du foie. Explications sur les transplantations [site Web]. Disponible à : <http://www.liver.ca/fr/liver-disease/liver-transplants/how-do-transplants-work/> (consulté le 12 mai 2014).

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Mesure quantitative de l'éthylglucuronide (et de l'éthylsulfate) 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 exclusivement pour les patients en attente d'une transplantation hépatique
- ☐ 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

Notes

- Possibilité d'une explosion de la prescription si cette analyse est utilisée en clinique de toxicologie. L'indication doit être restreinte aux patients en attente d'une transplantation hépatique.
- Un consentement éclairé est nécessaire afin que les patients soient bien informés des conséquences d'un résultat positif.
- Il faut absolument établir un mécanisme de confirmation des cas positifs avec un autre laboratoire.

RÉFÉRENCES

- 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.
- Albermann ME, Musshoff F, Madea B. A high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine validated according to forensic guidelines. *J Chromatogr Sci* 2012;50(1):51-6.
- Allen JP, Wurst FM, Thon N, Litten RZ. Assessing the drinking status of liver transplant patients with alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2013;19(4):369-76.
- Arndt T, Schröfel S, Güssregen B, Stemmerich K. Inhalation but not transdermal resorption of hand sanitizer ethanol causes positive ethyl glucuronide findings in urine. *Forensic Sci Int* 2014;237:126-30.
- Beyer J, Vo TN, Gerostamoulos D, Drummer OH. Validated method for the determination of ethylglucuronide and ethylsulfate in human urine. *Anal Bioanal Chem* 2011;400(1):189-96.
- Concheiro M, Cruz A, Mon M, de Castro A, Quintela O, Lorenzo A, Lopez-Rivadulla M. Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *J Anal Toxicol* 2009;33(3):155-61.
- Dahl H, Hammarberg A, Franck J, Helander A. Urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate testing for recent drinking in alcohol-dependent outpatients treated with acamprosate or placebo. *Alcohol Alcohol* 2011;46(5):553-7.
- Erim Y, Bottcher M, Dahmen U, Beck O, Broelsch CE, Helander A. Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* 2007;13(5):757-61.
- Grebe SK et Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? *Clin Biochem Rev* 2011;32(1):5-31.
- Helander A, Kenan N, Beck O. Comparison of analytical approaches for liquid chromatography/mass spectrometry determination of the alcohol biomarker ethyl glucuronide in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24(12):1737-43.
- Helander A, Böttcher M, Fehr C, Dahmen N, Beck O. Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol* 2009;44(1):55-61.
- Hoiseth G, Karinen R, Christophersen A, Morland J. Practical use of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem cases as markers of antemortem alcohol ingestion. *Int J Legal Med* 2010;124(2):143-8.
- Imbert L, Gaulier JM, Dulaurent S, Lachatre G. Dosages urinaire et capillaire de l'éthylglucuronide. *Ann Biol Clin (Paris)* 2012;70(6):629-34.
- Jatlow P et O'Malley SS. Clinical (nonforensic) application of ethyl glucuronide measurement: Are we ready? *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34(6):968-75.

- Joya X, Friguls B, Ortigosa S, Papaseit E, Martinez SE, Manich A, et al. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: A review. *J Pharm Biomed Anal* 2012;69:209-22.
- Kharbouche H, Sporkert F, Staub C, Mangin P, Augsburg M. L'éthylglucuronide : un marqueur de la consommation d'alcool. *Praxis (Bern 1994)* 2009;98(22):1299-306.
- Kissack JC, Bishop J, Roper AL. Ethylglucuronide as a biomarker for ethanol detection. *Pharmacotherapy* 2008;28(6):769-81.
- Kummer N, Wille S, Di Fazio V, Lambert W, Samyn N. A fully validated method for the quantification of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by UPLC-ESI-MS/MS applied in a prospective alcohol self-monitoring study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;929:149-54.
- Lande RG et Marin B. A comparison of two alcohol biomarkers in clinical practice: Ethyl glucuronide versus ethyl sulfate. *J Addict Dis* 2013;32(3):288-92.
- Palmer RB. A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine. *Semin Diagn Pathol* 2009;26(1):18-27.
- Piano S, Marchioro L, Gola E, Rosi S, Morando F, Cavallin M, et al. Assessment of alcohol consumption in liver transplant candidates and recipients: The best combination among the tools available. *Liver Transpl* 2014;20(7):815-22.
- Stauffer K, Andresen H, Vettorazzi E, Tobias N, Nashan B, Sterneck M. Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre- and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption. *Hepatology* 2011;54(5):1640-9.
- Stewart SH, Koch DG, Burgess DM, Willner IR, Reuben A. Sensitivity and specificity of urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in liver disease patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37(1):150-5.
- Walsham NE et Sherwood RA. Ethyl glucuronide. *Ann Clin Biochem* 2012;49(Pt 2):110-7.
- Webzell I, Ball D, Bell J, Sherwood RA, Marsh A, O'Grady JG, Heaton ND. Substance use by liver transplant candidates: An anonymous urinalysis study. *Liver Transpl* 2011;17(10):1200-4.
- Wetterling T, Dibbelt L, Wetterling G, Goder R, Wurst F, Margraf M, Junghanns K. Ethyl glucuronide (EtG): Better than breathalyser or self-reports to detect covert short-term relapses into drinking. *Alcohol Alcohol* 2014;49(1):51-4.
- Zheng Y et Helander A. Solid-phase extraction procedure for ethyl glucuronide in urine. *J Anal Toxicol* 2008;32(9):778-81.

DOSAGE DE LA FLUCYTOSINE (5-FLUOROCYTOSINE) PAR HPLC-DAD (RÉFÉRENCE 2014.01.006)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeurs** : CHU Ste-Justine
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 1^{er} août 2013
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 1er mars 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 30 juin 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-DAD)

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

La flucytosine (5-fluorocytosine ou 4-amino-5-fluoro-2-pyrimidine ou 5-FC) est un agent antifongique utilisé notamment dans le traitement des infections fongiques invasives. Ce médicament peut causer des effets indésirables graves comme l'aplasie médullaire et l'hépatotoxicité. Son suivi thérapeutique pharmacologique⁶⁸ se fait habituellement par dosage à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum.

Les échantillons pour le dosage de la flucytosine par HPLC sont préparés par une précipitation de protéines avec de l'acide trichloroacétique [Ng *et al.*, 1996; Hulsewede, 1994; St-Germain *et al.*, 1989; Schwertschlag *et al.*, 1984; Miners *et al.*, 1980; Bury *et al.*, 1979].

La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) permet une séparation et une détection des molécules de flucytosine par rayon ultraviolet afin d'obtenir un profil chromatographique unique et distinct du 5-fluorouracil, un des métabolites qui lui est intimement lié [Torano *et al.*, 2001]. Les résultats obtenus sont quantitatifs.

⁶⁸ En anglais : *therapeutic drug monitoring*.

2.3 Société ou développeur

L'analyse est effectuée au moyen d'une méthode maison. Le dosage de la flucytosine se fait à partir du plasma ou du sérum de l'échantillon prélevé. Les principales étapes du protocole sont les suivantes⁶⁹ :

- La courbe d'étalonnage est préparée avec un plasma naïf aux concentrations variant de 6,25 à 100 µg/ml. Trois niveaux de contrôle de la qualité sont utilisés à des concentrations de 12,5, 25 et 50 µg/ml. Ces valeurs sont comparées avec des valeurs analytiques historiques et les résultats sont colligés selon une procédure reconnue par Agrément Canada.
- Le protocole de préparation des échantillons (par précipitation des protéines) s'applique aussi bien à la courbe d'étalonnage qu'aux contrôles de qualité et aux échantillons de patients.
- Dans un échantillon de plasma, sont ajoutés et mélangés successivement une solution de travail de l'étalon interne (5-méthylcytosine) et un agent précipitant (acide trichloroacétique). Les tubes sont centrifugés, puis un aliquote de 10 µl est injecté au système de HPLC-DAD en mode isocratique avec une détection à 266 nm.

Les valeurs seuils sont les suivantes :

- Inefficacité (et risque de résistance secondaire) : < 25 µg/ml
- Thérapeutique optimal : 30 à 80 µg/ml
- Risque de toxicité : > 100 µg/ml

D'autres auteurs rapportent des valeurs seuils différentes.

2.4 Licence : sans objet.

2.5 Brevet, le cas échéant : sans objet.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Sans objet. Le requérant emploie une méthode maison et des réactifs analytiques certifiés pour chaque lot de réactifs utilisé. En outre, il participe depuis 2009 au *International Interlaboratory Quality Control Program for Therapeutic Drug Monitoring of Antifungal Drugs*.

2.7 Valeur pondérée : 93,31

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

3.1 Patients ciblés

Les patients ciblés sont ceux qui reçoivent un traitement à long terme à la flucytosine (5-FC) pour traiter une infection invasive à *Candida*, à *Cryptococcus neoformans* ou une infection qui occasionne une chromoblastomycose ou une aspergillose.⁷⁰

⁶⁹ Selon les informations fournies par le demandeur.

⁷⁰ *Idem*.

3.2 Description de la maladie visée

Antifongique et pharmacocinétique

Les infections fongiques opportunistes systémiques sont devenues une cause importante de mortalité⁷¹ et de morbidité⁷² en raison de l'augmentation de patients immunodéprimés⁷³ traités à l'aide de médicaments immunosuppresseurs (cancer, greffes d'organes, VIH) [Perfect *et al.*, 2010; Eloy *et al.*, 1992] ou chez les patients hospitalisés à haut risque, y compris les nouveau-nés de petit poids et les prématurés [Kontoyiannis, 2012; Nailor et Chandrasekar, 2009]. Les agents antifongiques sont souvent utilisés pour traiter des infections fongiques invasives, des mycoses systémiques et des méningites cryptococcales [Ng *et al.*, 1996]. La flucytosine est utilisée dans le traitement systémique de *Candida albicans* [Hulsewede, 1994; Bury *et al.*, 1979], de *Cryptococcus neoformans* [Hulsewede, 1994; Bury *et al.*, 1979], de *Cladosporium trichoides* [Blair *et al.*, 1975] et de *Torulopsis glabrata* [Petersen *et al.*, 1994; Bury *et al.*, 1979], ainsi que des aspergilloses [Goodwin et Drew, 2008] et des chromomycoses [Warnock et Turner, 1981].

La flucytosine est un analogue fluoré synthétique de la cytosine et consistait en l'un des premiers composés antifongiques élaboré en 1957 [Loyse *et al.*, 2013; Smith et Andes, 2008; Pasqualotto *et al.*, 2007; Vermes *et al.*, 2000; Gerson, 1987]. La flucytosine elle-même n'a pas d'activité antifongique. Son action antimycotique est dérivée d'une conversion rapide, dans le cytosol des cellules fongiques, de la flucytosine en 5-fluorouracil, antimétabolite qui cause des erreurs de codage à l'ARN et inhibe la synthèse de l'ADN [Loyse *et al.*, 2013].

L'utilisation de la flucytosine en monothérapie est limitée à cause des risques d'émergence de résistance microbienne qui peut survenir fréquemment avec ce médicament [Fraisie *et al.*, 2011; Vermes *et al.*, 2000]. La flucytosine est généralement administrée en combinaison avec l'amphotéricine B, qui constitue le traitement de référence pour la plupart des infections fongiques systémiques [Eloy *et al.*, 1992], afin de traiter des infections graves à *Candida* et à *Cryptococci*. Le traitement à la flucytosine est efficace autant chez les adultes que chez les nouveau-nés et les prématurés [Vermes *et al.*, 2000].

L'absorption de la flucytosine est rapide chez les individus normaux, avec une biodisponibilité de 76 % à 89 % après son administration orale [Loyse *et al.*, 2013; Vermes *et al.*, 2000]. La flucytosine est une petite molécule hautement soluble dans l'eau qui pénètre bien dans des tissus, les liquides céphalorachidien, péritonéal et oculaire (corps vitré), ainsi que dans le liquide inflammatoire articulaire [Vermes *et al.*, 2000]. Seulement 2,9 % à 4 % du médicament se lie aux protéines. Le pic de concentration de la flucytosine survient 1 à 3 heures après son administration et sa demi-vie⁷⁴ est de 3 à 4 heures [Loyse *et al.*, 2013; Vermes *et al.*, 2000] ou de 3 à 6 heures [Drew *et al.*, 2013; Smith et Andes, 2008]. Son élimination est principalement rénale [Loyse *et al.*, 2013; Vermes *et al.*, 2000]; entre 80 % et 95 % de la flucytosine est excrétée inchangée dans l'urine. La clairance plasmatique de cet agent est étroitement liée à la clairance de la créatinine [Loyse *et al.*, 2013; Vermes *et al.*, 2000]. La flucytosine présente une grande variation pharmacocinétique intrapatient et

⁷¹ Le taux de mortalité associé à la méningite cryptococcique varie entre 10 % et 30 % [ASPC, 2010].

⁷² Aux États-Unis, les candidoses se classent au quatrième rang des infections nosocomiales transmises par le sang (9 %) [Drew *et al.*, 2013].

⁷³ Les immunodéprimés sont des personnes qui n'ont pas des réactions immunitaires normales (Dictionnaire de français Larousse [site Web], disponible à : <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais>).

⁷⁴ Chez les patients atteints d'insuffisance rénale avancée, la demi-vie peut être prolongée jusqu'à 85 heures [Loyse *et al.*, 2013; Vermes *et al.*, 2000] ou plus.

interpatient. Cette variation dépend de la fonction d'élimination rénale [Drew *et al.*, 2013; Andes *et al.*, 2009; Smith et Andes, 2008].

Les effets indésirables graves de la flucytosine sont l'aplasie médullaire⁷⁵, notamment la neutropénie, la leucocytopénie, la thrombocytopénie et la pancytopenie, et l'hépatotoxicité [Torano *et al.*, 2001; Vermes *et al.*, 2000]. Les autres effets indésirables sont d'ordre gastro-intestinal et comprennent de la diarrhée, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales [Loyse *et al.*, 2013; Soltani *et al.*, 2006; Vermes *et al.*, 2000]. L'aplasie médullaire et l'hépatotoxicité sont associées à des concentrations sériques élevées de flucytosine (> 100 µg/ml) de façon prolongée [Loyse *et al.*, 2013]. L'utilisation de la flucytosine durant la grossesse doit être prudemment analysée en ce qui a trait aux risques et aux bénéfices, étant donné son potentiel tératogène [Loyse *et al.*, 2013].

Accès restreint

La flucytosine⁷⁶ a été commercialisée aux États-Unis en 1976 et a été introduite sur le marché canadien en 1977. En août 1998, le produit a été retiré du marché et il n'est donc plus disponible sur le marché canadien. Il est parfois autorisé à travers le Programme d'accès spécial (PAS) de Santé Canada. Le PAS permet aux médecins qui traitent des patients atteints de maladies graves ou mortelles d'accéder à des médicaments qui ne sont pas disponibles sur le marché, lorsque les traitements habituels se sont révélés inefficaces, ne conviennent pas ou ne sont pas accessibles⁷⁷.

Suivi thérapeutique du médicament

Selon le requérant, le suivi des concentrations de flucytosine est recommandé afin d'assurer une concentration thérapeutique optimale pour : 1) obtenir une concentration maximale efficace (l'effet antifongique étant temps-dépendant); 2) prévenir l'apparition d'une résistance en raison de concentrations sous-thérapeutiques; et 3) éviter la survenue d'effets indésirables myélosuppressifs ou hépatotoxiques.

La population pédiatrique est d'une grande complexité sur le plan pharmacologique. La pharmacocinétique de la flucytosine n'a été que très peu étudiée [Jullien, 2011] ou est imprévisible [Soltani *et al.*, 2006] chez les enfants. Par conséquent, la posologie adéquate pour différentes tranches d'âge (c.-à-d. les nouveau-nés, les enfants, les adolescents) n'est pas connue. Un réajustement individualisé par l'intermédiaire de la mesure des concentrations plasmatiques s'avère fréquemment nécessaire [Jullien, 2011].

Étant donné que la 5-FC possède une demi-vie courte (3 à 6 heures), son monitoring s'effectue par la mesure de sa concentration maximale qui devrait se situer entre 30 et 80 µg/ml [Drew *et al.*, 2013; BSAC Working Party, 1991]. Les risques d'inefficacité (et de résistance secondaire) et de toxicité sont accrus respectivement pour des concentrations de flucytosine < 25 µg/ml et > 100 µg/ml [Begg *et al.*, 2001].

Étant donné que la dose reliée à l'hépatotoxicité a été rapportée, une analyse rapide de la concentration plasmatique du médicament dans les échantillons cliniques est indiquée, en particulier chez les patients atteints d'une insuffisance rénale [Hulsewede, 1994; Bury *et al.*, 1979; Diasio *et al.*, 1978; Blair *et al.*, 1975].

⁷⁵ En anglais, *bone marrow depression*. L'aplasie médullaire est une disparition complète ou partielle des cellules médullaires hématopoïétiques [Kernbaum, 2008].

⁷⁶ La flucytosine (capsules de 250 mg et de 500 mg), commercialisée sous la dénomination Ancotil (Hoffmann-La Roche) a été autorisée le 28 septembre 1976, aux États-Unis [communication électronique du 5 mai 2014 avec Santé Canada].

⁷⁷ Communication électronique du 5 mai 2014 avec Santé Canada.

Selon certaines revues de littérature [Lewis, 2010; Andes *et al.*, 2009], le suivi thérapeutique pharmacologique peut être bénéfique dans la pratique clinique relativement à un antifongique qui répond aux critères suivants :

- existence d'une relation claire entre les concentrations de médicament dans le sang et la toxicité ou l'efficacité du traitement;
- besoin de montrer une pharmacocinétique variable ou non prévisible (dose-exposition);
- présence d'une fenêtre thérapeutique étroite;
- présence d'un intervalle thérapeutique clinique défini;
- existence d'une méthode analytique validée pour le dosage de ce médicament.

Or, la flucytosine répond à tous ces critères [Lewis, 2010; Andes *et al.*, 2009].

3.3 Nombre de patients visés

De 10 à 20 analyses par année sont prévues. Celles-ci peuvent être effectuées périodiquement chez un même patient⁷⁸.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Biochimie médicale, microbiologie et hématologie.

3.5 Modalités d'administration du test

La mesure de la 5-FC plasmatique devrait s'effectuer de 3 à 5 jours après le début de son administration orale et environ 2 heures après sa prise (concentration maximale) [Perfect *et al.*, 2010; Goodwin et Drew, 2008; Begg *et al.*, 2001; BSAC Working Party, 1991]. Dans le cas d'une administration intraveineuse, le prélèvement sérique devrait être effectué 30 minutes plus tard [Begg *et al.*, 2001; BSAC Working Party, 1991]. Cette mesure devrait se répéter si les niveaux sont sous- ou supra-thérapeutiques ou si une toxicité hématologique⁷⁹ ou une détérioration de la fonction rénale surviennent [BSAC Working Party, 1991].

Les modalités relatives à la manipulation, à la conservation et à l'expédition des spécimens sont celles habituellement utilisées pour ce type d'échantillon. Aucune autre particularité n'a été notée.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : analyse « unique ».

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

L'analyse « 5-Fluorocytosine (5-FC) (dosage) » (code 40350) était dans le *Répertoire* de 2011-2012 (VP = 63,0), mais a été retirée dans la version 2013-2014 parce qu'il n'y a pas eu d'analyse au cours des 2 années précédentes⁸⁰. Le laboratoire désigné était l'Hôtel-Dieu de Québec⁸¹ qui offrait le dosage de la 5-FC par la méthode biologique (mesure du diamètre de la zone d'inhibition)⁸². Actuellement, le Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) offre également l'analyse avec cette même méthode [LSPQ, 2014].

⁷⁸ Information soumise par le requérant.

⁷⁹ Information soumise par le requérant.

⁸⁰ Entretien téléphonique du 16 avril 2012 avec le MSSS.

⁸¹ Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). Répertoire des procédures suprarégionales de biologie médicale [site Web]. Disponible à : <http://www.msss.gouv.qc.ca/repertoires/biomed/fiche.php?id=40350>.

⁸² Entretien téléphonique du 6 mai 2014 avec les professionnels de l'Hôtel-Dieu de Québec.

Contrairement aux autres, le laboratoire du requérant offre l'analyse par la méthode HPLC-DAD. Le nombre d'analyses effectuées⁸³ au cours des dernières années vont comme suit : 7 analyses en 2013, 1 analyse en 2012, aucune analyse en 2011 et 46 analyses en 2010.

Le dosage de la 5-FC peut être réalisé selon diverses méthodes : la méthode biologique (aussi appelée méthode microbiologique ou *bioassay*) [LSPQ, 2014; Torano *et al.*, 2001; Hulsewede, 1994; Miners *et al.*, 1980; Bury *et al.*, 1979], la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [Torano *et al.*, 2001; Hulsewede, 1994; Petersen *et al.*, 1994], la chromatographie gazeuse [Petersen *et al.*, 1994; Warnock et Turner, 1981], la chromatographie gaz-liquide [St-Germain *et al.*, 1989; Miners *et al.*, 1980], la spectrofluorométrie [Miners *et al.*, 1980], la fluorométrie [Warnock et Turner, 1981; Bury *et al.*, 1979] et la méthode enzymatique [Torano *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 1994].

La méthode biologique est la technique conventionnelle employée pour ce type d'analyse [Bury *et al.*, 1979; Diasio *et al.*, 1978]. Elle consiste à ensemencer, à l'aide d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* sensible à la flucytosine, une gélose sur laquelle sont perforés des puits contenant des aliquotes de sérum. Après une incubation de 24 heures, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré. Celui-ci est proportionnel à la concentration sérique de flucytosine [LSPQ, 2014].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La méthode HPLC est rapide et simple d'exécution [Schwertschlag *et al.*, 1984], ce qui permet de traiter un nombre élevé d'échantillons ou de produire des résultats requis de façon urgente [Hulsewede, 1994]. De plus, elle est précise étant donné que les résultats obtenus proviennent de valeurs d'absorption. Elle permet une traçabilité puisque les résultats sont affichés par ordinateur contrairement à la méthode biologique qui dépend de la précision de la mesure du diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne.

De plus, la HPLC est plus spécifique puisqu'il y a peu d'interférence avec un grand nombre d'autres médicaments ou leurs métabolites [Bury *et al.*, 1979], y compris la 5-fluorouracil et l'amphotéricine B [Schwertschlag *et al.*, 1984]. En effet, la méthode biologique exige la sélection d'une souche microbienne résistante aux différents agents antimicrobiens pouvant interférer avec le médicament dosé, en particulier lorsque celui-ci est donné en traitement combiné [Bury *et al.*, 1979]. Toutefois, la méthode biologique a comme principal avantage de ne nécessiter aucun équipement spécial [Hulsewede, 1994].

En bref, les avantages de la méthode HPLC sont [Diasio *et al.*, 1978] :

- un dosage de la concentration de flucytosine en 30 minutes ou moins;
- un dosage précis de la concentration de flucytosine, notamment pour les concentrations < 25 µg/ml ou > 100 µg/ml;
- très peu d'interférence avec les autres agents antimicrobiens, en particulier l'amphotéricine B;
- la facilité d'exécution de l'analyse qui peut être automatisée pour un usage de routine.

Par ailleurs, la HPLC-DAD permet de distinguer le 5-fluorouracil de la flucytosine avec une résolution adéquate, contrairement aux méthodes enzymatiques, biologiques ou aux autres HPLC couplées à une détection par spectrophotométrie de base, qui n'ont pas cette capacité [Torano *et al.*, 2001].

⁸³ Informations fournies par le demandeur. Jusqu'en mai, deux analyses ont été effectuées en 2014.

Comme désavantages de la chromatographie gazeuse, notons son faible recouvrement (30 % à 40 %) et la nécessité d'une dérivation⁸⁴ de la 5-FC [Petersen *et al.*, 1994; Diasio *et al.*, 1978]. Par ailleurs, un des désavantages majeurs que présente la méthode enzymatique est l'interférence avec la lipémie, la bilirubinémie et la créatinine sérique élevée [Petersen *et al.*, 1994].

4.4 Coût de la technologie et des options : n'ont pas été analysées.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : aucun.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Mortalité et morbidité

Le dosage optimal du médicament pourrait prévenir les conséquences pouvant être mortelles du traitement sous-optimal d'une infection fongique invasive ou les effets indésirables graves du traitement antifongique (aplasie médullaire ou hépatotoxicité). Aucune étude répertoriée n'a évalué ce paramètre, c'est-à-dire la relation entre le dosage de la flucytosine et la prévention de la mortalité.

L'ajustement de la dose de flucytosine permettrait aussi d'éviter la résistance microbienne qui compliquerait la prise en charge clinique globale du patient. Des données quantitatives sur la relation entre le dosage de la flucytosine et la prévention de la morbidité n'ont pas été répertoriées, bien que de nombreuses publications le mentionnent (revues systématiques, opinions d'experts).

Les données d'utilité clinique montrent indirectement que l'aplasie médullaire et l'hépatotoxicité sont associées à des concentrations sériques de flucytosine > 100 µg/ml. Une étude rétrospective révèle que seulement 20,5 % des patients ont eu des niveaux sanguins de flucytosine qui se situaient dans l'intervalle thérapeutique⁸⁵ [Pasqualotto *et al.*, 2007]. La proportion de patients dont le dosage montre une concentration de flucytosine inférieure à l'intervalle recommandé était de 40,5 %, tandis que chez 38,9 % des patients, la concentration était trop élevée. Parmi ces patients, 9,9 % étaient à risque élevé de toxicité (> 100 µg/ml). Une deuxième étude a obtenu des proportions similaires : 35,4 % des patients avaient des concentrations < 30 µg/ml et 30,6 % des patients avaient des concentrations > 81 µg/ml [Soltani *et al.*, 2006]. Ces données montrent qu'une proportion non négligeable de patients avaient des concentrations de flucytosine avoisinant le seuil de toxicité, d'où l'utilité clinique d'une surveillance du médicament.

Valeur thérapeutique

L'analyse de la flucytosine permet d'assurer un suivi thérapeutique pharmacologique adéquat dans le but d'optimiser le dosage du médicament chez les patients afin d'atteindre une réponse maximale au traitement tout en évitant une toxicité médicamenteuse et une résistance microbienne [Begg *et al.*, 2001; Diasio *et al.*, 1978]. Toutefois, une revue

⁸⁴ La dérivation est une technique utilisée en chimie pour transformer un composé en un produit de structure chimique similaire appelé « dérivé ».

⁸⁵ Les concentrations cibles de flucytosine chez les nouveau-nés (1 à 30 jours de vie) sont de 20-40 à 50-80 µg/ml et dans les autres tranches d'âge, s'élèvent de 30-40 à 70-80 µg/ml.

mentionne que le dosage sérique de la flucytosine aide à prédire la toxicité, mais non à assurer son efficacité [Nailor et Chandrasekar, 2009].

Dans la littérature, les valeurs relatives à la fenêtre thérapeutique (à la concentration maximale, environ 2 heures suivant la dose par voie orale) sont variées : 10 à 50 µg/ml [Smith et Andes, 2008], 20 à 50 µg/ml [Lewis, 2010; Andes *et al.*, 2009], 25 µg/ml à 100 µg/ml [Begg *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 1994; Schäfer-Korting, 1993], 30 à 80 µg/ml [Drew *et al.*, 2013; BSAC Working Party, 1991], 25 à 120 µg/ml [Miners *et al.*, 1980], 50 à 80 µg/ml [Summers *et al.*, 1997], 50 à 100 µg/ml [Song et Deresinski, 2005; Schwertschlag *et al.*, 1984]. Une revue mentionne une fenêtre thérapeutique de 30 à 80 µg/ml pour ce qui est des infections cryptococcales et de 40 à 60 µg/ml en ce qui a trait à la méningite à *Candida* [Goodwin et Drew, 2008].

Les concentrations cibles de flucytosine sont choisies de façon arbitraire, principalement sur la base des opinions d'experts. Il n'est pas possible de connaître les concentrations optimales en raison de la disponibilité limitée des données. La concentration sérique du pic de flucytosine ciblée est basée sur la tolérance du patient et sur une incidence acceptable de toxicité [Pasqualotto *et al.*, 2007; Summers *et al.*, 1997].

5.2 Validité clinique

Aucune évaluation directe de la validité clinique du dosage de la flucytosine n'a été repérée.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Les données portant sur la validité analytique de la HPLC et de la HPLC-DAD sont tirées des résultats de onze études de validation de méthode. Elles portent principalement sur des spécimens de plasma ou de sérum.

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		

Données de validité analytique du CHU Ste-Justine

La validation technique de la méthode repose sur l'utilisation d'échantillons du plasma humain naïf. Le laboratoire du demandeur participe depuis 2009 à un programme de contrôle de la qualité international⁸⁶ relatif au suivi thérapeutique des antifongiques (dont la flucytosine). À cet effet, les performances (évaluées par des pairs) locales liées au dosage de la flucytosine (concentrations cibles de 12,7 à 147 µg/ml) sont de 1,9 % et de 4,7 % de variation, respectivement, en matière d'exactitude et de précision, pour les années 2012 et 2013.

⁸⁶ International Interlaboratory Quality Control Program for Therapeutic Drug Monitoring of Antifungal Drugs, Association for Quality Assessment in TDM and Clinical Toxicology (mis sur pied au Pays-Bas).

Sensibilité analytique et linéarité des courbes de calibration

La sensibilité analytique (ou limite de détection) de la HPLC se situe entre 0,078 et 1 µg/ml. Les courbes de calibration présentent des coefficients de linéarité supérieurs à 0,99 (tableau 1).

Répétabilité et reproductibilité

Le tableau 2 fait état des données de répétabilité (précision) et de reproductibilité. La HPLC est précise ($CV^{87} \leq 5 \%$) et reproductible (CV de 1,2 % à 10 %), excepté dans l'étude de St-Germain et ses collaborateurs [1989] (CV jusqu'à 18,8 % pour une concentration de 6,25 µg/ml de flucytosine).

Spécificité analytique, interférence et recouvrement

Le taux de recouvrement varie de 76 % à 113 %. La majorité des études n'ont trouvé aucune interférence (tableau 3) avec plusieurs autres médicaments ou agents antifongiques (annexe A).

⁸⁷ CV : coefficient de variation.

Tableau 1 Études de validation du dosage de la flucytosine avec la HPLC et la HPLC-DAD

ÉTUDE	TYPE D'ÉCHANTILLON	NOMBRE DE SPÉCIMENS	VOLUME (µl)*	ANALYSE PAR HPLC						
				MÉTHODE DE PRÉPARATION	CONTRÔLE INTERNE	DÉTECTION (nm)	LOD (µg/ml)	LLOQ (µg/ml)	LINÉARITÉ (µg/ml)	COEFFICIENT DE LINÉARITÉ
Blair <i>et al.</i> , 1975	sérum, urine	-	5/5	-	-	280	-	-	1-10	Pente : 0,052 Intersection : 0,042
Bury <i>et al.</i> , 1979	plasma	-	1 000/100	PP	-	280	< 1	-	-	-
Diasio <i>et al.</i> , 1978	sérum	6	1 000/50	PP, ultrafiltration	-	254	1	-	10-200	0,998
Hulsewede, 1994	sérum	-	200/30	PP	5-fluorocytosine Acide 4-aminobenzoïque	280	-	5	10-120	-
Miners <i>et al.</i> , 1980	plasma	-	100/10	PP	5-méthylcytosine	276	-	-	5-200	0,998
Ng <i>et al.</i> , 1996	sérum	-	100/10-20	PP	autre agent antifongique	260	0,078	-	-	0,998
Petersen <i>et al.</i> , 1994	sérum	21	100/5	PP	5-méthylcytosine	285 (HPLC-DAD)	0,5	-	5-500	0,9996
Schwertschlag <i>et al.</i> , 1984	plasma	-	100/10	PP	5-iodocytosine	254	-	-	10-200	0,9987
St-Germain <i>et al.</i> , 1989	sérum	-	n. d.	PP	-	276	-	-	6,25-100	1,000
Torano <i>et al.</i> , 2001	plasma	6 (courbe de calibration : 2)	500/50	PP	5-méthylcytosine	266 (HPLC-DAD)	-	0,3	4,816-192,6	0,99989
Warnock et Turner, 1981	sérum	2	n. d./10	PP	-	254	1	-	6,25-100	0,9996

Abréviations : ELL : extraction liquide-liquide; EPS : extraction en phase solide ; LLOQ : limite inférieure de la quantification (*lower limit of quantification*); LOD : limite de la détection; µg/ml : microgramme par millilitre; MRM : suivi de réactions multiples (*multiple reaction monitoring*); nm : nanomètre; PP : précipitation de protéines.

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

Tableau 2 Répétabilité et reproductibilité de la HPLC et de la HPLC-DAD à doser la flucytosine

ÉTUDE	MÉTHODE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE* (µg/ml)	INTRA-ESSAI	INTER-ESSAI	INTRA-DAY	INTER-DAY
				CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
Blair <i>et al.</i> , 1975	HPLC	Courbe standard	10			2	8
Bury <i>et al.</i> , 1979	HPLC	10	40	1,3			
		4 (> 5 sem)	12				5,7
		4 (> 5 sem)	30				1,2
		4 (> 5 sem)	75				1,5
Diasio <i>et al.</i> , 1978	HPLC	10	25			0,677†	
		10	100			0,665†	
Hulsewede, 1994	HPLC	6	-	3§			
Miners <i>et al.</i> , 1980	HPLC	22 (inter-essai : 12 durant 1 mois)	10	3,7	6,88		
		22 (inter-essai : 12 durant 1 mois)	200	1,9	3,18		
Ng <i>et al.</i> , 1996	HPLC	-	-	3,97†			
Petersen <i>et al.</i> , 1994	HPLC-DAD	10	5				3,0
		10	30				3,0
		10	100				3,7
Schwertschlag <i>et al.</i> , 1984	HPLC	10 (<i>inter-day</i> : 10 jours séparés)	50	1,8			10
		10	150	2,3			
St-Germain <i>et al.</i> , 1989	HPLC	6 courbes standards (17 jours différents)	6,25				18,8
			12,5				14,0
			25				8,7
			50				5,8
			75				3,6
			100				2,5

ÉTUDE	MÉTHODE	NOMBRE DE SPÉCIMENS	CONCENTRATION NOMINALE* (µg/ml)	INTRA-ESSAI	INTER-ESSAI	INTRA-DAY	INTER-DAY
				CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
Torano <i>et al.</i> , 2001	HPLC-DAD	5 (<i>inter-day</i> : 1 durant 5 jours consécutifs)	0,329	5			-
			0,4816	2			2
			20,22	0,8			1,7
Warnock et Turner, 1981	HPLC	6	50	2,19§			
		6	100	4,57§			

Abréviations : CV : coefficient de variation; sem : semaine; HPLC-DAD : chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes; *intra-day* : intrajournalier (au cours d'une même journée); *inter-day* : d'une journée à l'autre.

*Une conversion des unités présentées dans les études est réalisée à des fins d'uniformité.

†Précision.

§Écart-type relatif (%).

Tableau 3 Recouvrement et interférences

ÉTUDE	MÉTHODE	n	CONCENTRATION NOMINALE (µg/ml)	RECOUVREMENT (%)	INTERFÉRENCES
Bury <i>et al.</i> , 1979	HPLC	-	-	103	Aucune interférence avec le 5-fluorouracil ni avec 22 autres médicaments.
Diasio <i>et al.</i> , 1978	HPLC	-	10	76	Aucune interférence avec sept autres médicaments.
			40	79	
			60	81	
			100	79	
			150	81	
			200	76	
Hulsewede, 1994	HPLC	-	10-100	≥ 98	Aucune
Miners <i>et al.</i> , 1980	HPLC	-	5-150	97,5	Interférence avec le 5-fluorouracil (même temps de rétention). Aucune interférence avec 21 autres médicaments.
Ng <i>et al.</i> , 1996	HPLC	-	-	96,2	Interférence avec l'aztréonam (même temps de rétention). Aucune interférence avec 23 autres médicaments.
Petersen <i>et al.</i> , 1994	HPLC-DAD	-	10	97,4	Aucune interférence avec 34 autres médicaments.
			25	99,5	
			50	99,2	
			100	102,7	
			200	99,4	
Schwertschlag <i>et al.</i> , 1984	HPLC	-	-	-	Aucune interférence avec 40 autres médicaments.
Torano <i>et al.</i> , 2001	HPLC-DAD	5	0,329	98	Aucune
			0,4816	113	
			48,16	110	
			192,6	108	
Warnock et Turner, 1981	HPLC	-	50	100,32	Aucune interférence avec 34 autres médicaments.
			100	103,50	

Abréviations : HPLC : chromatographie liquide à haute performance; HPLC-DAD : chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes; N : nombre de spécimens.

Corrélation entre le test et le comparateur

Diasio et ses collaborateurs [1978] comparent la courbe de calibration obtenue par la méthode HPLC à celle de la méthode microbiologique. Les résultats obtenus par chacune des méthodes sont comparés aux valeurs calculées (prévues) de concentration de flucytosine. Le coefficient de corrélation de la HPLC est $r^2 = 0,998$ et celui de la méthode microbiologique est $r^2 = 0,992$.

Cinq autres études ont comparé la HPLC à la méthode microbiologique ou la spectrofluorométrie (tableau 4). Les résultats montrent une bonne corrélation entre la HPLC et les autres méthodes puisque les valeurs des coefficients de corrélation sont supérieures à 0,92.

Tableau 4 Corrélation entre la HPLC et une méthode comparative

ÉTUDE	MÉTHODES	COEFFICIENT DE CORRÉLATION R	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS (TYPE DE SPÉCIMENS)
Bury <i>et al.</i> , 1979	HPLC vs méthode biologique	0,9548	28 (plasma)
Hulsewede, 1994	HPLC vs méthode biologique	0,96	54 (sérum)
Miners <i>et al.</i> , 1980	HPLC vs spectrofluorométrie	0,99	5 (plasma), 5 (liquide céphalorachidien), 13 (plasma témoin préparé)
St-Germain <i>et al.</i> , 1989	HPLC vs méthode biologique avec puits	0,946	-
	HPLC vs méthode biologique avec cylindre	0,932	-
Warnock et Turner, 1981	HPLC vs méthode biologique	0,9202	18 (sérum)

Concordance

Dans deux des études, la HPLC produit, aux faibles concentrations de flucytosine, des valeurs plus faibles que celles obtenues par la méthode biologique, et aux concentrations élevées, des valeurs plus élevées [St-Germain *et al.*, 1989; Diasio *et al.*, 1978].

Dans l'étude de St-Germain et ses collaborateurs [1989], la tendance linéaire est maintenue avec la HPLC, contrairement aux deux méthodes biologiques où la courbe standard n'est pas linéaire aux concentrations élevées (> 100 µm/ml) de flucytosine.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Un guide de pratique clinique de la *Infectious Disease Society of America* (IDSA) portant sur la gestion des infections à *Cryptococcus* recommande le dosage de la flucytosine jumelé à de fréquentes analyses de la formule sanguine complète afin d'assurer une surveillance des effets indésirables graves [Perfect *et al.*, 2010]. Le dosage sérique de la flucytosine devrait être effectué après 3 à 5 jours de traitement, avec une concentration cible (2 heures après la dose) de 30 à 80 µg/ml. Les concentrations > 100 µg/ml devraient être évitées. Il n'y a aucune mention de la méthode d'analyse à privilégier.

Lorsque le dosage de la flucytosine n'est pas disponible, une attention particulière doit être accordée aux paramètres hématologiques (décompte de globules blancs et de plaquettes) et l'ajustement de la flucytosine devrait alors se faire selon la clairance de la créatinine [Perfect *et al.*, 2010].

Le suivi thérapeutique pharmacologique de la flucytosine est effectué couramment dans plusieurs établissements du Royaume-Uni [Pasqualotto *et al.*, 2007] et des Pays-Bas [Torano *et al.*, 2001; Vermes *et al.*, 2000] afin d'éviter une toxicité et pour assurer une efficacité adéquate.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

L'appareillage nécessaire à l'analyse par HPLC se trouve généralement dans les laboratoires. Le HPLC-DAD est disponible et fonctionnel au laboratoire du requérant.

Au centre demandeur, c'est toujours une équipe multidisciplinaire, qui inclut le médecin traitant, qui prend la décision de faire le suivi thérapeutique de la flucytosine chez un patient. Si un suivi thérapeutique s'avère nécessaire en clinique, le test est effectué, car l'établissement possède la technologie, l'équipe clinique et le savoir-faire pour exercer une gestion pharmacothérapeutique individualisée⁸⁸.

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 (sociaux, juridiques, politiques)

N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

L'analyse de la flucytosine permet d'assurer un suivi thérapeutique pharmacologique adéquat dans le but d'optimiser le dosage du médicament chez les patients atteints d'infections fongiques invasives afin d'atteindre une réponse maximale au traitement tout en évitant une toxicité médicamenteuse et une résistance microbienne.

7.2 Validité clinique

Aucune évaluation directe de la validité clinique du dosage de la flucytosine n'a été repérée.

7.3 Validité analytique

La plupart des études de validation de méthode sont anciennes (datant entre 1975 et 1996) et portent sur la HPLC plutôt que sur la HPLC-DAD. Cependant, cette différence de détection ne change pas la technique de préparation des échantillons. Les résultats sont similaires.

⁸⁸ Communication électronique du 2 mai 2014 avec le requérant.

La HPLC est une méthode sensible, spécifique, précise et reproductible pour le dosage de la flucytosine dans les échantillons de sérum ou de plasma.

7.4 Recommandations d'autres organismes

La *Infectious Disease Society of America* recommande le dosage de la flucytosine jumelé à de fréquentes analyses de la formule sanguine complète afin d'assurer une surveillance des effets indésirables graves. La méthode d'analyse n'est toutefois pas mentionnée.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Dosage de la flucytosine (5-fluorocytosine) par HPLC-DAD

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 production des données cliniques (suivi des résultats de l'analyse et lien avec les résultats cliniques)
- ☐ 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 de la santé publique du Canada (ASPC). *Cryptococcus neoformans*. Fiche technique santé-sécurité: agents pathogènes [site Web]. Ottawa, ON : ASPC; 2010. Disponible à : <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/cryptococcus-fra.php>.
- Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: Established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(1):24-34.
- Begg EJ, Barclay ML, Kirkpatrick CM. The therapeutic monitoring of antimicrobial agents. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(Suppl 1):35S-43S.
- Blair AD, Forrey AW, Meijsen BT, Cutler RE. Assay of flucytosine and furosemide by high-pressure liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1975;64(8):1334-9.
- British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party (BSAC Working Party). Laboratory monitoring of antifungal chemotherapy. *Lancet* 1991;337(8757):1577-80.
- Bury RW, Mashford ML, Miles HM. Assay of flucytosine (5-fluorocytosine) in human plasma by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16(5):529-32.
- Diasio RB, Wilburn ME, Shadomy S, Espinel-Ingroff A. Rapid determination of serum 5-fluorocytosine levels by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;13(3):500-4.
- Drew RH, Townsend ML, Pound MW, Johnson SW, Perfect JR. Recent advances in the treatment of life-threatening, invasive fungal infections. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(17):2361-74.
- Eloy O, Joly V, Ghnassia JC, Carbon C, Yeni P. Choix et surveillance du traitement des mycoses systémiques. Intérêt et limites des tests in vitro. *Presse Med* 1992;21(20):937-42.
- Fraisse T, Lachaud L, Sotto A, Lavigne JP, Cariou G, Boiteux JP, et al. Recommandations du comité d'infectiologie de l'AFU. Diagnostic, traitement et suivi des candiduries. *Prog Urol* 2011;21(5):314-21.
- Gerson B. Flucytosine (5-fluorocytosine). *Clin Lab Med* 1987;7(3):541-4.
- Goodwin ML et Drew RH. Antifungal serum concentration monitoring: An update. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(1):17-25.
- Hulsewede JW. Comparison of high-performance liquid chromatography and bioassay for the determination of 5-fluorocytosine in serum. *Int J Med Microbiol* 1994;281(4):513-8.
- Jullien V. Pharmacocinétique et pharmacodynamie des antifongiques en pédiatrie. *Arch Pediatr* 2011;18(Suppl 1):S42-7.
- Kernbaum S, réd. *Dictionnaire de médecine Flammarion*. 8^e éd. Paris, France : Médecine-Sciences Flammarion; 2008.
- Kontoyiannis DP. Invasive mycoses: Strategies for effective management. *Am J Med* 2012;125(1 Suppl):S25-38.

- Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ). Dosage sérique de la 5-Fluorocytosine. Guide des services. Révisé le 14 février 2014. Disponible à : <http://www.inspq.qc.ca/lspq/repertoire-des-analyses>.
- Lewis RE. Antifungal therapeutic drug monitoring. *Curr Fungal Infect Rep* 2010;4(3):158-67.
- Loyse A, Dromer F, Day J, Lortholary O, Harrison TS. Flucytosine and cryptococcosis: Time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(11):2435-44.
- Miners JO, Foenander T, Birkett DJ. Liquid-chromatographic determination of 5-fluorocytosine. *Clin Chem* 1980;26(1):117-9.
- Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). Répertoire des procédures suprarégionales de biologie médicale. Mis à jour en 2014. Disponible à : <http://www.msss.gouv.qc.ca/repertoires/biomed/fiche.php?id=40350>
- Nailor MD et Chandrasekar PH. Antifungal drugs: Predicting clinical efficacy with pharmacodynamics. *Expert Review Clin Pharmacol* 2009;2(4):373-9.
- Ng TK, Chan RC, Adeyemi-Doro FA, Cheung SW, Cheng AF. Rapid high performance liquid chromatographic assay for antifungal agents in human sera. *J Antimicrob Chemother* 1996;37(3):465-72.
- Pasqualotto AC, Howard SJ, Moore CB, Denning DW. Flucytosine therapeutic monitoring: 15 years experience from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(4):791-3.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Disease Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50(3):291-322.
- Petersen D, Demertzis S, Freund M, Schumann G, Oellerich M. Individualization of 5-fluorocytosine therapy. *Chemotherapy* 1994;40(3):149-56.
- Schäfer-Korting M. Pharmacokinetic optimisation of oral antifungal therapy. *Clin Pharmacokinet* 1993;25(4):329-41.
- Schwertschlag U, Nakata LM, Gal J. Improved procedure for determination of flucytosine in human blood plasma by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26(3):303-5.
- Smith J et Andes D. Therapeutic drug monitoring of antifungals: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit* 2008;30(2):167-72.
- Soltani M, Tobin CM, Bowker KE, Sunderland J, MacGowan AP, Lovering AM. Evidence of excessive concentrations of 5-flucytosine in children aged below 12 years: A 12-year review of serum concentrations from a UK clinical assay reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28(6):574-7.
- Song JC et Deresinski S. Hepatotoxicity of antifungal agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6(2):170-7.
- St-Germain G, Lapierre S, Tessier D. Performance characteristics of two bioassays and high-performance liquid chromatography for determination of flucytosine in serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(8):1403-5.

- Summers KK, Hardin TC, Gore SJ, Graybill JR. Therapeutic drug monitoring of systemic antifungal therapy. *J Antimicrobi Chemother* 1997;40(6):753-64.
- Torano JS, Vermes A, Guchelaar HJ. Simultaneous determination of flucytosine and fluorouracil in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2001;15(2):89-94.
- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(2):171-9.
- Warnock DW et Turner AJ. High performance liquid chromatographic determination of 5-fluorocytosine in human serum. *Antimicrob Chemother* 1981;7(4):363-9.

ANNEXE A

Tableau des médicaments testés pour déterminer s'il y a interférence avec la flucytosine

MÉDICAMENTS TESTÉS	BURY <i>ET AL.</i> , 1979	DIASIO <i>ET AL.</i> , 1978	MINERS <i>ET AL.</i> , 1980	NG <i>ET AL.</i> , 1996	PETERSEN <i>ET AL.</i> , 1994*	SCHWERTSCHLAG <i>ET AL.</i> , 1984	WARNOCK <i>ET TURNER</i> , 1981
AGENTS ANTIMICROBIENS (ANTIBIOTIQUES ET ANTIVIRAUX)							
Acide fusidique				X			
Amikacine					30 mmol/L	15 µmol/l	X
Amphotéricine B	X	X	X			200 µmol/l	X
Amoxicilline						5 µmol/l	
Ampicilline	X	X		X		200 µmol/l	X
Aztréonam				X			
Benzylpénicilline			X	X			X
Carbénicilline		X		X		200 µmol/l	X
Céfamandole				X			
Céfotaxime				X			
Céfoxitin							X
Ceftazidime				X			
Ceftriaxone				X			
Céfuroxime							X
Céphalexine	X						X
Céphalothine		X				100 µmol/l	
Céphradine			X				
Chloramphénicol					65 µmol/l	30 µmol/l	X
Ciprofloxacine				X			

MÉDICAMENTS TESTÉS	BURY <i>ET AL.</i> , 1979	DIASIO <i>ET AL.</i> , 1978	MINERS <i>ET AL.</i> , 1980	NG <i>ET AL.</i> , 1996	PETERSEN <i>ET AL.</i> , 1994*	SCHWERTSCHLAG <i>ET AL.</i> , 1984	WARNOCK ET TURNER, 1981
Clindamycine		X					
Cyclosporine A				X			
Cyclosporine					147 mg/l		
Doxycycline			X				
Érythromycine				X			
Framycetine	X						
Ganciclovir				X			
Gentamicine		X			40 mg/l	8 µmol/l	
Imipénem				X			
Kétoconazole						5 µmol/l	
Méthicilline		X					
Métronidazole							X
Miconazole						5 µmol/l	
Nitrofurantoïne						10 µmol/l	
Nystatine	X						
Ofloxacin				X			
Oxacilline						40 µmol/l	
Pénicilline		X					
Pénicilline G						30 µmol/l	
Piperacilline				X			
Streptomycine					43 µmol/l		
Sulfaméthoxazole	X					50 µmol/l	
Téicoplanine				X			

MÉDICAMENTS TESTÉS	BURY <i>ET AL.</i> , 1979	DIASIO <i>ET AL.</i> , 1978	MINERS <i>ET AL.</i> , 1980	NG <i>ET AL.</i> , 1996	PETERSEN <i>ET AL.</i> , 1994*	SCHWERTSCHLAG <i>ET AL.</i> , 1984	WARNOCK ET TURNER, 1981
Tétracycline			X	X			
Tobramycine					9,6 µmol/l	8 µmol/l	
Triméthoprim	X			X			
Triméthoprim-sulfaméthoxazole							X
Vancomycine	X			X	25 mg/l		
AUTRES MÉDICAMENTS							
Acide valproïque					499 µmol/l		
Acide 2-(acétyloxy)benzoïque	X		140 ppm				
Acétaminophène					370 µmol/l	25 µmol/l	
Allopurinol							X
Amitriptyline					829 nmol/l	1 µmol/l	
Amylobarbitol			X				
Antidépresseurs tricycliques			X				
Atropine	X						
Aztréonam				Interférence			
Bendrofluméthiazide							X
Benzodiazépine			X				
Caféine			X		11,3 mg/l		
Carbamazépine					43,6 µmol/l	5 µmol/l	
Chlorambucil							X
Chlordiazépoxyde						1 µmol/l	X
Chloroquine						10 µmol/l	

MÉDICAMENTS TESTÉS	BURY <i>ET AL.</i> , 1979	DIASIO <i>ET AL.</i> , 1978	MINERS <i>ET AL.</i> , 1980	NG <i>ET AL.</i> , 1996	PETERSEN <i>ET AL.</i> , 1994*	SCHWERTSCHLAG <i>ET AL.</i> , 1984	WARNOCK ET TURNER, 1981
Chlorphéniramine						30 µmol/l	X
Chlorpropamide							X
Cimétidine	X					1 µmol/l	
Clonazépam					50 µmol/l		
Codéine	X					1 µmol/l	
Cortisol					535 nmol/l		
Cyclophosphamide							X
Cytarabine							X
Daunorubicine							X
Désipramine					785 nmol/l		
Dextropropoxyphène	X						X
Diazépam					4,9 µmol/l	1 µmol/l	X
Digoxine	X				2 nmol/l		
Dihydrocodéine							X
Disopyramide			X		8,5 µmol/l		
Éphédrine						1 µmol/l	
Estriol					475 nmol/l		
Éthosuximide					538 µmol/l		
5-fluorouracile			Interférence			1 µmol/l	
Flurazépam						1 µmol/l	
Furosémide							X
Héparine	X						
Hydrate de chloral	X						

MÉDICAMENTS TESTÉS	BURY <i>ET AL.</i> , 1979	DIASIO <i>ET AL.</i> , 1978	MINERS <i>ET AL.</i> , 1980	NG <i>ET AL.</i> , 1996	PETERSEN <i>ET AL.</i> , 1994*	SCHWERTSCHLAG <i>ET AL.</i> , 1984	WARNOCK ET TURNER, 1981
Hydrocortisone				X			
Imipramine	X				799 nmol/l	1 µmol/l	
Isoniazide						5 µmol/l	
Lidocaïne					17,9 µmol/l		
Lithium					1,5 mmol/l		
Melphalan							X
6-mercaptopurine			X			10 µmol/l	
Méthotrexate					1,4 µmol/l		X
Métochloramide							X
Morphine	X						
N-acétylprocaïnamide					15,3 µmol/l	4 µmol/l	
Acide nalidixique				X			
Nitrazépam	X						
Nortriptyline					113 nmol/l		
Paracétamol	X		X				X
Péthidine	X						
Phénobarbital			X		102 µmol/l	30 µmol/l	
Phénytoïne			X	X	52 µmol/l	20 µmol/l	
Prednisolone	X						X
Prednisone							X
Primidone					42 µmol/l		
Procaïnamide			X		22 µmol/l	6 µmol/l	
Procarbazine							X

MÉDICAMENTS TESTÉS	BURY <i>ET AL.</i> , 1979	DIASIO <i>ET AL.</i> , 1978	MINERS <i>ET AL.</i> , 1980	NG <i>ET AL.</i> , 1996	PETERSEN <i>ET AL.</i> , 1994*	SCHWERTSCHLAG <i>ET AL.</i> , 1984	WARNOCK ET TURNER, 1981
Prochlorpérazine							X
Quinidine			X		11,1 µmol/l	5 µmol/l	
Salicylate					1,4 mmol/l	300 µmol/l	
Théobromine			X				
Théophylline			X		83 µmol/l	20 µmol/l	
Thioguanine							X
Thyroxine					175 nmol/l		
Tolbutamide							X
Warfarine			X				

*Méthode par la HPLC-DAD

ÉOSINE-5'-MALÉIMIDE (EMA) – DÉTECTION DE LA SPHÉROCYTOSE HÉRÉDITAIRE (RÉFÉRENCE 2014.01.007)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur :** CHU Sainte-Justine
- 1.2 Date de transmission de la demande au MSSS :** 14 janvier 2013
- 1.3 Date de réception de la demande à l'INESSS :** 1 mars 2014
- 1.4 Date de transmission de l'avis au ministre :** 30 juin 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 LICENCES

2.1 Nom de la technologie

Détection de la sphérocytose héréditaire par coloration au éosine-5'-maléimide en cytométrie en flux (test EMA).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Il s'agit d'un test de cytométrie en flux (analyseur BD FACSCanto II) destiné à mesurer l'intensité de la fluorescence des érythrocytes lavés et incubés avec un agent intercalant membranaire, l'éosine-5'-maléimide [Loosveld et Arnoux, 2010]. L'intensité de la fluorescence est exprimée en unités IMF (Intensité moyenne de fluorescence). L'acquisition des données se fait à l'aide d'un logiciel informatique [Do-Rouvière, 2008].

L'éosine-5'-maléimide se lie aux protéines de la membrane érythrocytaire, principalement à la protéine bande 3. Dans les cas de sphérocytose, d'elliptocytose⁸⁹ et de pyropoïkilocytose⁹⁰ héréditaires, ces protéines sont déficitaires, et la fluorescence obtenue est plus faible [Mentzer, 2014].

La liaison de l'EMA à la lysine-430 sur la première boucle extracellulaire de la protéine bande 3 est responsable d'environ 80 % de la fluorescence. Le reste de la fluorescence est imputable à la liaison de l'EMA avec des groupements sulfhydryles appartenant au « complexe Rh » (CD47, RhAG⁹¹ et le polypeptide Rh), présents à la surface des globules rouges. Une diminution de ces molécules à la surface des globules rouges a été démontrée dans la sphérocytose héréditaire. La liaison de l'EMA à ces protéines (bande 3, CD47, RhAG et polypeptide Rh) qui sont étroitement associées au cytosquelette du globule rouge,

⁸⁹ Érythrocytes en forme d'ellipse.

⁹⁰ Maladie caractérisée par une instabilité de la membrane cellulaire qui rend les érythrocytes très fragiles.

⁹¹ RhAG : glycoprotéine associée au Rh (rhésus).

explique la spécificité élevée de ce test. Bien que l'EMA n'interagisse pas directement avec la spectrine, l'ankyrine et la protéine 4.2, trois molécules aussi en cause dans la sphérocytose héréditaire, la liaison de l'EMA au CD47, au polypeptide Rh et à la RhAG est un reflet indirect mais fiable de la composition du cytosquelette [information fournie par le demandeur].

La réduction de l'intensité de la fluorescence est calculée en pourcentage selon la formule suivante (IMF chez les témoins - IMF patient)/IMF des témoins x 100 [Do-Rouvière, 2008].

Le demandeur interprète les résultats comme suit :

- Diminution de la fluorescence de 0 % à 15 % (variation interindividuelle normale) : normal, **absence de sphérocytose héréditaire**;
- Diminution de la fluorescence de 15 % à 20 % (variation interindividuelle légèrement augmentée) : douteux, **sphérocytose héréditaire possible**;
- Diminution de la fluorescence de plus de 20 % (variation interindividuelle anormalement augmentée) : anormal, **sphérocytose héréditaire probable**.

2.3 Société ou développeur

Le produit éosine-5'-maléimide (EMA) est fourni par la compagnie Molecular Probes®.

L'analyseur utilisé pour la cytométrie en flux est le BD FACSCanto II, de la compagnie BD Biosciences®.

2.4 Licences : sans objet.

2.5 Brevet : sans objet.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) : sans objet.

2.7 Valeur pondérée : 62,16.

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

3.1 Patients ciblés

Les patients ciblés sont ceux chez qui il y a suspicion de sphérocytose héréditaire lorsque les critères cliniques de diagnostic ne sont pas remplis et que les autres causes d'hémolyse ont été exclues.

3.2 Description de la maladie visée

La sphérocytose héréditaire (SH) ou maladie de Minkowsky-Chauffard est l'anémie hémolytique héréditaire la plus fréquente dans le nord de l'Europe et en Amérique du Nord. Son incidence est d'environ 1 personne sur 5 000, mais elle pourrait être de 1 sur 2 000 si les formes légères ou subcliniques sont prises en compte [Bolton-Maggs *et al.*, 2011; Furs et Moriarty, 2009; Dhermy, 2006]. Le niveau d'hémolyse est très variable : il va d'un besoin urgent de transfusion à l'absence de symptômes et la découverte fortuite de la maladie [Furs et Moriarty, 2009]. La transmission est autosomique dominante dans 75 % des cas; autrement, il s'agit d'une mutation *de novo* ou d'une transmission autosomique récessive [Dhermy, 2006]. La pathogénèse est en lien avec les cinq protéines du cytosquelette de la membrane érythrocytaire (spectrine α et β , ankyrine, protéine bande 3 et protéine 4.2) qui

régulent la déformabilité et l'élasticité des érythrocytes. Des anomalies quantitatives ou qualitatives de ces protéines sont observées chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire [Bolton-Maggs *et al.*, 2011].

Le diagnostic de la sphérocytose héréditaire est clinique, basé sur les antécédents familiaux, la présentation clinique typique (signes d'anémie, splénomégalie, hyperbilirubinémie) et les résultats de tests de laboratoire (présence de sphérocytes, augmentation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, augmentation de réticulocytes). Lorsque ces informations cliniques confirment le diagnostic, aucun test additionnel n'est requis. Dans les cas où le diagnostic est équivoque, d'autres tests sont nécessaires, comme le test de cryohémolyse et l'EMA. Ces énoncés sont des recommandations gradées (grade 1A) [Bolton-Maggs *et al.*, 2011] (section 5.4).

La pyropoïkilocytose héréditaire est une forme rare et grave d'elliptocytose qui touche les personnes noires.

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur estime qu'il y aura près de 80 nouvelles analyses par année.

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

Hématologie et pédiatrie.

3.5 Modalités d'administration du test

L'analyse requiert un échantillon de sang entier (EDTA ou héparine de sodium) du patient et de deux à trois échantillons témoins négatifs (d'un sujet normal, non apparenté, non fumeur) pour chaque journée d'analyse; il est important que le sang du patient et des témoins soit prélevé sur le même anticoagulant [information fournie par le demandeur]. L'âge et le sexe du patient et du témoin doivent être indiqués. Les spécimens doivent être réfrigérés (à 4°C, selon le demandeur) et parvenir au laboratoire dans les 96 heures (Mayo Medical Laboratories, test HSEP⁹²).

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Analyse complémentaire. Selon le demandeur, l'analyse EMA est faite en première intention. Si le résultat n'est pas concluant, le test de fragilité osmotique (FO) est effectué (code 10070; VP : 139,0).

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Il existe plusieurs analyses de laboratoire autres que l'EMA pour le diagnostic des anomalies de la membrane cellulaire érythrocytaire. Parmi ces analyses en première intention, citons notamment le FO, le test de lyse à l'acide glycérol (AGLT), le Pink test et la cryohémolyse. La recherche subséquente des cas douteux inclut le SDS-PAGE⁹³, l'ektacytométrie et l'analyse moléculaire [King et Zanella, 2013; King, 2011].

⁹² Mayo Medical Laboratories. Hereditary Spherocytosis Evaluation [site Web]. Disponible à : <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Overview/81087>.

⁹³ SDS-PAGE : électrophorèse de polyacrylamide en présence de sulfate de sodium dodécylque (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Dans une revue de littérature publiée en 2013, King et Zanella décrivent brièvement ces différentes analyses :

- Fragilité osmotique : détermine la concentration de NaCl provoquant une lyse de globules rouges à 50 % en sang frais ou incubé.
- AGLT et Pink test : déterminent le taux de lyse des érythrocytes suspendus dans une solution tampon de glycérol. Ces tests ne différencient pas la SH des autres sphérocytoses secondaires associées à d'autres maladies, notamment les anémies hémolytiques auto-immunes.
- Cryohémolyse : utilise la susceptibilité augmentée des sphérocytes à un refroidissement rapide de 37°C à 0°C en conditions hypertoniques.
- EMA : sa capacité de fixation du colorant à des molécules particulières de la membrane cellulaire (macrocomplexe bande 3) lui confère sa plus grande spécificité par rapport aux autres tests.

King et Zanella [2013] rapportent les résultats d'une enquête menée par l'*European Network for Rare Cell Anemias* (ENERCA) dans 25 centres de référence européens selon laquelle 60 % des centres ont adopté l'EMA et 50 % utilisent la FO sur sang frais. La majorité des centres utilisent une combinaison des tests.

L'électrophorèse de polyacrylamide en présence de sulfate de sodium dodécylque (SDS-PAGE) permet de déterminer quelle est la protéine déficiente. Quant au diagnostic moléculaire, il serait réservé aux cas où le phénotype parmi les apparentés ne peut pas être expliqué par les résultats du SDS-PAGE. King [2011] indique qu'il s'agit d'une pratique rare puisque les gènes associés à la protéine affectée sont grands, entre 19 et 52 exons.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Selon des études rapportées par Bolton-Maggs et ses collaborateurs [2011], l'EMA est facile d'utilisation, les résultats sortent en deux ou trois heures, la sensibilité et la spécificité sont comparables au test de lyse glycérol acidifié et à l'ektacytométrie et meilleures que celles du test de fragilité osmotique. L'analyse se réalise sur un échantillon de petit volume, ce qui la rend intéressante pour les enfants et les nouveau-nés [King *et al.*, 2000]. Autre avantage de l'analyse, celle-ci peut être réalisée en différé de plusieurs jours (48 heures à 6 jours) [Guitton *et al.*, 2008].

Devant une suspicion de sphérocytose héréditaire, un résultat normal au test EMA permet une élimination rapide du diagnostic de SH, ce qui est très intéressant surtout lorsque les laboratoires ne possèdent pas d'autres technologies plus complexes [Loosveld et Arnoux, 2010].

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 : aucun.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Il s'agit d'une analyse en première intention. En présence d'une réduction de la fluorescence entre 16 % et 21 % (cas douteux, sphérocytose héréditaire possible), la

recherche devrait être complétée en utilisant une autre analyse, comme l'ektacytométrie (EC) ou la SDS-PAGE. Ces deux analyses ne sont pas disponibles partout et la rapidité de l'analyse après prélèvement de l'échantillon préconise l'utilisation de l'EMA [Girodon *et al.*, 2008]. Bien que cette méthode est selon certains auteurs [King *et al.*, 2000], hautement prédictive du diagnostic de sphérocytose héréditaire, il n'y a pas de corrélation entre les valeurs d'IMF (intensité moyenne de fluorescence) et la gravité de la maladie.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Le diagnostic différentiel rapide de la sphérocytose héréditaire permet une meilleure approche thérapeutique, mais l'analyse n'est pas directement en lien avec un traitement.

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		

Le tableau 1 présente les résultats de la performance clinique de l'EMA de 12 études. La capacité de l'EMA à détecter la sphérocytose héréditaire est bonne dans la majorité des études et offre une sensibilité de 89 % à 100 %, sauf dans deux études qui rapportent des résultats entre 70 % et 80 % [Ciepiela *et al.*, 2013 ; Crisp *et al.*, 2011] et une spécificité de 94 % à 100 %. Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) rapportées par cinq études varient respectivement entre 81 % et 97,8 % et entre 93 % et 100 %. Selon les résultats de six études, l'aire sous la courbe est de 0,873 à 0,99. Une étude montre que la probabilité que l'EMA porte un diagnostic positif de sphérocytose héréditaire (Rapport de vraisemblance ou RV positif) est de 18,0. Toutefois, l'utilité clinique de ce test est moindre, car le RV négatif est de 0,31 [Crisp *et al.*, 2011].

Les valeurs seuils sont variables et différemment exprimées, soit en pourcentage de diminution de l'intensité moyenne de la fluorescence (11 %, 17 %, > 17 %, 18 %, 19,5 %, 21 % et 80 %), en intensité moyenne de la fluorescence (0,80, 400 et 10126 IMF) ou en unités IMF (45,5, 48,2 et 91,5 IMF).

La question du seuil de diminution de l'intensité moyenne de la fluorescence ne semble pas résolue. Certains auteurs rapportent une zone grise entre 16 % et 21 % [Mackiewicz *et al.*, 2012]. Dans une étude réalisée en France, rapportée dans une lettre à l'éditeur, 85 % des patients atteints de sphérocytose héréditaire ont eu une diminution de l'intensité moyenne de la fluorescence > 15 % et les 134 témoins se situaient à 15 % ou moins [Mayeur-Rousse *et al.*, 2012].

L'exactitude diagnostique de l'EMA est > 90 % : 94,7 % [Kar *et al.*, 2010]; 96,91 % [D'Alcamo *et al.*, 2011] et 97,2 % [King *et al.*, 2000].

Tableau 1 Validité clinique de l'EMA pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire

ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTS (FAMILLES)	TÉMOINS	SEUIL EMA*	PERFORMANCE DE L'EMA				
				SE %	SP %	AUC	VPP %	VPN %
Ciepiela <i>et al.</i> , 2013 Pologne	5	30 non atteints de SH	80 %	80	100			
Simões <i>et al.</i> , 2013 Portugal	115	441 sujets sains	0,80 (IMF)	93	99,5			
Bianchi <i>et al.</i> , 2012 Italie	150 (appartenant à 128 familles non apparentées)	575 sujets sains	11 %	93	98			
Crisp <i>et al.</i> , 2012 Argentine	31 enfants (sang capillaire) (âge entre 2 jrs et 7 ans)		> 17 %	90	-	-		
Crisp <i>et al.</i> , 2011 Argentine	62 (55 ayant une probable SH; 7 parents) appartenant à 4 familles	263 donneurs de sang	17 %	70,2	96,1	0,873	81	93
D'Alcamo <i>et al.</i> , 2011 Italie	33	130 sujets sains	48,2 % (IMF)	98,45	90,91	0,9927	93,75	97,69
Kar <i>et al.</i> , 2010 Inde	114	20 sujets sains	10126 (IMF)	96,4	94,2	0,99	84,4	98,8
Loosveld et Arnoux, 2010 France	35	132 sujets sains	18 %	100	99,3			
Tachavanich <i>et al.</i> , 2009 Thaïlande	50 (âge entre 2 sem et 36 ans)	142 sujets sains	91,5 % (IMF)	100	99,6	0,99		
Do-Rouvière, 2008 France	21 SH	29 non atteints de SH	19,5	100	93,1	0,95		
Girodon <i>et al.</i> , 2008 France	53	6	> 21 %	89	96			
Stoya <i>et al.</i> , 2006 Allemagne	58 (appartenant à 40 familles)	110 sujets sains; 8 membres de la famille non atteints de SH	400 U (IMF)	96,6	99,1			
King <i>et al.</i> , 2000 Royaume-Uni	98	180 adultes sains	45,5 U (IMF)	92,7	99,1	0,99	97,8	96,9

Abréviations : AUC : aire sous la courbe; EMA : éosine-5'-maléimide; IMF : intensité moyenne de la fluorescence; jrs : jours; Se : sensibilité; SH : sphérocytose héréditaire; Sp : spécificité; U : unités

* Seuil : IMF, pourcentage de diminution de l'IMF ou unités IMF.

L'EMA semble être plus sensible que la méthode de fragilité osmotique. Les données de comparaison sont limitées (tableau 2).

L'analyse concomitante à l'aide de deux méthodes, EMA et le test d'hémolyse en milieu glycérolé et acidifié ou *acidified glycerol lysis test* (AGLT) pourrait diagnostiquer 100 % des patients atteints de sphérocytose héréditaire [Bianchi *et al.*, 2012].

Tableau 2 Performance comparative des méthodes de diagnostic de la sphérocytose héréditaire

ÉTUDE	EMA			AGLT			FO			CH		
	SE %	SP %	AUC	SE %	SP %	AUC	SE %	SP %	AUC	SE %	SP %	AUC
Bianchi <i>et al.</i> , 2012	93	98		95			68* 81†					
Crisp <i>et al.</i> , 2012	90	-	-							95		
Crisp <i>et al.</i> , 2011	70,2	96,1	0,873				58,8‡ 73,5§	99,1‡ 74,4§	0,784‡ 0,827§	78,7	95,8	0,916
Kar <i>et al.</i> , 2010	96,4	94,2	0,99				71,4	74,1				

Abréviations : AGLT : test d'hémolyse en milieu glycérolé et acidifié (*acidified glycerol lysis test*); AUC : aire sous la courbe; CH : cryohémolyse; EMA : éosine-5'-maléimide; FO : fragilité osmotique; Se : sensibilité; Sp : spécificité.

* FO avec NaCl frais

± FO avec NaCl incubé

‡ Incubée

§ Non incubée

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	

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats varie en fonction de la stabilité de la solution EMA et de la concentration utilisée, du temps d'incubation, des conditions de conservation des échantillons et du délai pour pratiquer l'analyse des érythrocytes marqués par l'EMA [King *et al.*, 2000].

Selon le délai de stockage

On observe une diminution rapide de la fluorescence moyenne dans les 3 premiers jours lorsque l'EMA est conservé à 4°C pendant 1 semaine. Le stockage à -20°C produit aussi une réduction de la fluorescence moyenne, quoique beaucoup plus faible, sur une période de 4 mois [Cooper *et al.*, 2007; Kedar *et al.*, 2003; King *et al.*, 2000].

Selon le délai d'utilisation après sa décongélation

Lorsque l'EMA est décongelé la veille de son utilisation, une réduction de la fluorescence de 40 % à 60 % est observée sur des échantillons appartenant à 6 témoins normaux du jour [Do-Rouvière, 2008].

Selon le délai de conservation des échantillons d'analyse après marquage des érythrocytes

Le marquage des globules rouges dans du PBS/BSA⁹⁴ après un délai de 48 heures à 4°C produit une IMF stable comme en témoigne les résultats de CV obtenus (entre 0,6 % et 2,6 %) [Do-Rouvière, 2008]. D'autres auteurs ne montrent pas de différence entre le pourcentage de fluorescence mesuré tout de suite après marquage au temps zéro, 1 heure et 24 heures après la conservation des échantillons d'analyse à 4°C ($66,72 \pm 9,26$ %; $66,90 \pm 10,24$ % et $67,86 \pm 11,31$ %, respectivement) ni de celui de l'IMF ($26,44 \pm 3,87$; $25,76 \pm 3,97$; $26,88 \pm 4,01$, respectivement, valeur de *p* non rapportée) [Ciepiela *et al.*, 2013].

Concentration de l'EMA et temps d'incubation

La concentration d'EMA recommandée est de 0,5 mg/ml et le temps d'incubation est de 1 heure.

Variation intra-individuelle

La technique est très reproductible selon des CV de 2,2 % (12 échantillons témoins) [Do-Rouvière, 2008]. Selon une étude, sur deux mesures répétées des échantillons témoins le CV était de 2,25 % dans les cas de témoins positifs et de 2 % dans le groupe des témoins négatifs [Kar *et al.*, 2010].

Spécificité analytique

Les résultats ne sont pas modifiés par la diminution du volume des globules rouges (MCV), comme c'est le cas dans l'anémie ferriprive. L'intensité de la fluorescence est augmentée en présence d'une augmentation du volume des globules rouges (par exemple, chez les alcooliques) [King *et al.*, 2000].

Concordance

Le demandeur a réalisé une étude de concordance entre l'EMA et la FO avec 21 patients (1 témoin par patient). Dans 10 cas où il y avait fluorescence anormale à l'EMA (sphérocytose héréditaire confirmée : SH +), la FO était augmentée et dans 7 cas où il y avait fluorescence normale à l'EMA (pas de SH), la FO était normale. Dans deux cas jugés « SH possible » à l'EMA, la FO était légèrement augmentée. Il y a eu deux cas de discordance : un dont l'EMA signalait « SH+ » et l'autre, où l'indication était « absence de SH ». La concordance était de 90,5 % (19/21) [données fournies par le demandeur].

- Corrélation entre le test et le comparateur

⁹⁴ Solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine bovine (*Phosphate Buffered Saline with Bovine Serum Albumin*).

- Corrélation entre l'EMA et l'AGLT : $r = 0,69$ [Stoya *et al.*, 2006]
- Corrélation entre l'EMA et la résistance globulaire : $r = 0,64$ [Do-Rouvière, 2008]

5.4 Recommandations d'autres organismes

Le guide pour le diagnostic et le traitement de la sphérocytose héréditaire, préparé par le *British Committee for Standards in Haematology* et mis à jour en 2011 [Bolton-Maggs *et al.*, 2011], recommande le test de cryohémolyse et l'EMA pour confirmer un cas de sphérocytose héréditaire lorsque le diagnostic clinique (antécédents familiaux, symptomatologie typique et tests de laboratoire usuels) n'est pas concluant (recommandation de grade 1, niveau de preuve A)⁹⁵. Toutefois, une étude publiée sous forme de résumé en 2013 [Park *et al.*, 2013] met en doute la performance de la cryohémolyse et conclut que, malgré la recommandation de ce guide, les meilleurs tests de diagnostic de la SH sont l'EMA et la FO.

Selon les recommandations de la société allemande, pour le diagnostic et le traitement des maladies hématologiques et oncologiques [Eber *et al.*, 2012], il n'existe pas de test unique qui détecte toutes les formes de sphérocytose héréditaire, c'est pourquoi il est recommandé d'utiliser au moins deux méthodes différentes, de préférence les tests de l'EMA et l'AGLT. Ces recommandations non gradées se basent sur une seule étude [Bianchi *et al.*, 2012]. Dans des cas exceptionnels, après ces deux tests, les auteurs recommandent le recours à l'ektacytométrie, à l'analyse protéinique ou génétique.

6 RÉPERCUSSIONS DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

- 6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines :** n'ont pas été analysés.
- 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 (sociaux, juridiques, politiques)**
- N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Il s'agit d'un test utile pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire.

7.2 Validité clinique

La validité clinique de l'EMA dans la confirmation du diagnostic de la sphérocytose héréditaire est bien établie, avec une sensibilité générale de 89 % à 100 % et une spécificité de 94 % à 100 %. Par contre, en raison de la variabilité des valeurs seuils de fluorescence de la méthode EMA rapportée dans les différentes études, il est essentiel pour tous les laboratoires de standardiser la méthode et de déterminer la valeur seuil de référence.

⁹⁵ Échelle GRADE : une recommandation de grade 1 indique une recommandation forte pouvant être appliquée à la plupart des patients; un niveau de preuve A indique une preuve de haute qualité : il est improbable que de nouvelles études puissent changer l'estimation de l'effet.

7.3 Validité analytique

La reproductibilité des résultats de la méthode EMA par cytométrie en flux dépend de la stabilité de la solution EMA utilisée. Peu d'études ont été publiées sur le sujet, mais les informations disponibles indiquent un CV < 3. Une étude de validation locale a montré une bonne concordance avec le test de fragilité osmotique.

7.4 Recommandation d'autres organismes

Les recommandations disponibles sont unanimes sur le fait qu'au moins deux différents tests de laboratoire doivent être utilisés lorsque le diagnostic clinique de la sphérocytose héréditaire (antécédents familiaux, symptomatologie typique) et les tests de laboratoire habituels ne sont pas concluants. L'EMA est une méthode fiable. Le choix des autres méthodes qui pourraient être utilisées en association avec l'EMA n'est pas établi et les opinions diffèrent.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Éosine-5'-maléimide (EMA) – détection de la sphérocytose héréditaire

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 mise en place d'un mécanisme de contrôle de la qualité externe, qui comprend éventuellement des échanges entre les laboratoires, au Québec
- ☐ 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

- Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Porretti L, Cortelezzi A, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: A comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica* 2012;97(4):516-23.
- Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol* 2011;156(1):37-49.
- Ciepiela O1, Kotuła I, Górski E, Stelmazczyk-Emmel A, Popko K, Szmydki-Baran A, et al. Delay in the measurement of eosin-5'-maleimide (EMA) binding does not affect the test result for the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(4):817-23.
- Cooper S, Zarkos K, Jurinkulravanish T, Dolotin M, Brown R. Diagnosis of hereditary spherocytosis by flow cytometric detection of eosin-5'-maleimide binding to band 3. *Aust J Med Sci* 2007;28(3):109-11.
- Crisp RL, Solari L, Gammella D, Schwartzman GA, Rapetti C, Donato H. Use of capillary blood to diagnose hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(7):1299-301.
- Crisp RL, Solari L, Vota D, Garcia E, Miguez G, Chamorro ME, et al. A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina. *Ann Hematol* 2011;90(6):625-34.
- D'Alcamo E, Agrigento V, Sclafani S, Vitrano A, Cuccia L, Maggio A, et al. Reliability of EMA binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis in Italian patients. *Acta Haematol* 2011;125(3):136-40.
- Dhermy D. Sphérocytose héréditaire. Orphanet; 2006. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=822 (consulté le 6 mars 2014).
- Do-Rouvière J-A. Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale. Thèse pour l'obtention du diplôme d'État de docteur en pharmacie. Nancy, France : Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de Pharmacie; 2008. Disponible à : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2008_DO_ROUVIERE_JULIE_ANNE.pdf.
- Eber S, Ehninger G, Goede J, Gassmann W, Heimpel H, Schrezenmeier H, et al. Hereditary spherocytosis (spherocytic anemia): Guideline. Recommendations from the society for diagnosis and therapy of haematological and oncological diseases. Berlin, Allemagne : DGHO Onkopedia; 2012. Disponible à : <http://www.onkopedia-guidelines.info/en/onkopedia/guidelines/hereditary-spherocytosis-spherocytic-anemia/hereditary-spherocytosis-spherocytic-anemia.pdf> (consulté le 1 mai 2014).
- Furs SA et Moriarty H. Hereditary spherocytosis: A review. *Aust J Med Sci* 2009;30(2):42-50.

- Girodon F, Garçon L, Begoin E, Largier M, Delaunay J, Fénéant-Thibault M, et al. Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: Comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *Br J Haematol* 2008;140(4):464-74.
- Guitton C, Garçon L, Cynober T, Gauthier F, Tchernia G, Delaunay J, et al. Sphérocytose héréditaire : recommandations pour le diagnostic et la prise en charge chez l'enfant. *Arch Pediatr* 2008;15(9):1464-73.
- Kar R, Mishra P, Pati HP. Evaluation of eosin-5-maleimide flow cytometric test in diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol* 2010;32(1 Pt 2):8-16.
- Kedar PS, Colah RB, Kulkarni S, Ghosh K, Mohanty D. Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. *Clin Lab Haematol* 2003;25(6):373-6.
- King MJ. Laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(Suppl 1):S61.
- King MJ et Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol* 2013;35(3):237-43.
- King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2000;111(3):924-33.
- Loosveld M et Arnoux I. Intérêt du test à l'éosine 5' maléimide dans le diagnostic de la sphérocytose héréditaire. *Hématologie* 2010;16(3):261-3.
- Mackiewicz G, Bailly F, Favre B, Guy J, Maynadié M, Girodon F. Flow cytometry test for hereditary spherocytosis. *Hematologica* 2012;97(12):e47.
- Mayeur-Rousse C, Gentil M, Botton J, Fénéant Thibaut M, Guitton C, Picard V. Testing for hereditary spherocytosis: A French experience. *Hematologica* 2012;97:e48.
- Mentzer WC. Hereditary spherocytosis: Clinical features, diagnosis, and treatment. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com>.
- Park SH, Park CJ, Lee BR, Young JK, Young-Ku C, Seongsoo J, et al. Screening for hereditary spherocytosis: EMA binding test and flow cytometric osmotic fragility test are recommended, but cryohemolysis test is not recommended. *Blood* 2013;122(21):3425.
- Simões AT, Coucelo M, Almeida H, Relvas L, Ferreira P, Maia T, et al. Eosin-5-maleimide flow cytometry test as diagnostic tool for hereditary spherocytosis - our experience. *Int J Lab Hematol* 2013;35(Suppl 1):88 [abstract 317].
- Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow cytometry as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Acta Haematol* 2006;116(3):186-91.
- Tachavanich K, Tanphaichitr VS, Utto W, Viprakasit V. Rapid flow cytometric test using eosin-5-maleimide for diagnosis of red blood cell membrane disorders. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009;40(3):570-5.

ANALYSE MUTATIONNELLE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR DE LA THYRÉOSTIMULINE (*TSHR*) PAR SÉQUENÇAGE ET MLPA (RÉFÉRENCE 2014.01.008)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeurs : CHU Sainte-Justine

1.2 Date de transmission de la demande d'examen au MSSS : 14 janvier 2014

1.3 Date de réception de la demande à l'INESSS : 1^{er} mars 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juin 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

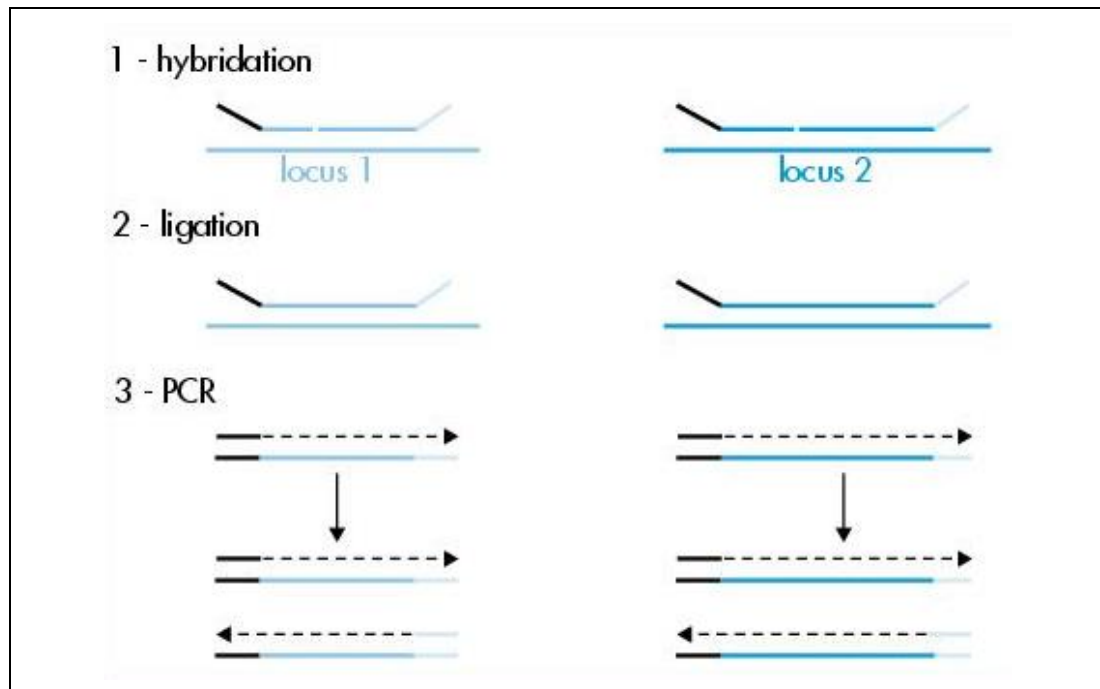
Analyse mutationnelle du gène du récepteur de la thyroïdostimuline (*TSHR*) par séquençage et MLPA (amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation ou *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le séquençage par la méthode de Sanger est une technique de base [Kircher et Kelso, 2010].

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 différencier et de quantifier les loci (figure 1). Pour 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 en chaîne par polymérase (PCR) de tous les loci étudiés. Chaque fragment peut alors être quantifié et comparé à un témoin, ce qui permet ainsi la détection du nombre de copies d'un locus [Keren et Sanlaville, 2008].

Figure 1 Principe de la MLPA



Source : Keren et Sanlaville, 2008.

2.3 Société ou développeur : protocole fourni par le demandeur.

2.4 Licence : sans objet.

2.5 Brevet, le cas échéant : sans objet.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) : sans objet.

2.7 Valeur pondérée : 743,89.

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

3.1 Patients ciblés

L'analyse cible tous les nouveau-nés du Québec qui ont obtenu un résultat positif au dépistage néonatal sanguin (DNS) de l'hypothyroïdie congénitale (HC) et qui présentent une anatomie thyroïdienne normale et une absence d'auto-immunité.

3.2 Description de la maladie visée

L'incidence de l'HC est approximativement de 1 : 3 000 à 4 000 naissances [Toublanc, 1992]. En l'absence d'un traitement précoce, des retards de croissance et des retards cognitifs irréversibles de même que des dommages neuromoteurs apparaîtront graduellement chez la majorité des nouveau-nés atteints d'HC [Laflamme *et al.*, 2006]. La dysgénésie de la thyroïde, définie comme un problème de développement ou de la migration glandulaire, est responsable de 85 % des cas d'HC. Les 15 % restants sont reliés à un problème de synthèse des hormones thyroïdiennes (dysmorphonogénèse). La dysgénésie thyroïdienne peut être causée par une agénésie, une hypoplasie ou une ectopie glandulaire [Park et Chatterjee,

2005]. Les cas d'HC visés par la présente demande sont dits sous-cliniques, c'est-à-dire que le tableau clinique correspond à une résistance à la thyroïdostimuline (TSH), une maladie génétique (OMIM #275200) caractérisée par [Beck-Peccoz *et al.*, 2006; Refetoff, 2003] :

- un niveau sérique de TSH > normale;
- un niveau sérique de thyroxine (T4) et de triiodothyronine (T3) ≤ normale;
- une glande thyroïde de taille ≤ normale;
- l'absence d'autoanticorps thyroïdiens : anti-thyropéroxydase, anti-thyroglobuline, anti-T3, anti-T4, anti-TSH.

L'HC sous-clinique est commune dans la population adulte. La prévalence de cette condition s'élevait à 9 %, selon les résultats d'une enquête populationnelle réalisée au Colorado (États-Unis) en 1995 sur 25 862 participants [Canaris *et al.*, 2000]. Les données relatives à la population pédiatrique indiquent une prévalence inférieure à 2 % [Wu *et al.*, 2006]. Les mutations du gène du récepteur de la TSH (TSHR) mènent à une perte variable de sa fonction et sont responsables de la résistance à la TSH. En effet, lorsque la sensibilité de la thyroïde à l'action de la TSH (par le TSHR) est partiellement conservée, l'élévation du taux sérique de la TSH compense le défaut attribuable au récepteur (résistance partielle à la TSH). Un défaut majeur dans la fonction du TSHR résultant en une perte complète de sensibilité à la TSH entraîne un déficit de la croissance glandulaire (hypoplasie) et de la production d'hormones thyroïdiennes (résistance complète à la TSH) [Persani *et al.*, 2010].

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur estime le nombre de nouveau-nés à tester à environ 50 cas par année. Selon Deladoëy et ses collaborateurs, parmi les 620 bébés nés au Québec entre 1990 et 2009 et qui ont eu un dépistage positif de l'HC, 179 auraient été candidats à l'analyse moléculaire de *TSHR* soit 1 cas toutes les 9 278 naissances, donc environ 10 nouveaux cas par an (~ 90 000 naissances par année, au Québec) [Deladoëy *et al.*, 2011].

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Biochimie médicale et endocrinologie pédiatrique.

3.5 Modalités d'administration du test

Le séquençage s'effectue à partir de l'ADN purifié d'un échantillon de sang ou de salive.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Au Québec, le dépistage de l'HC a été inclus dans le *Programme québécois de dépistage néonatal sanguin* (PQDNS), en avril 1974 [Laflamme *et al.*, 2006].

Actuellement, les cas d'HC issus du dépistage néonatal et jugés pertinents relativement à l'analyse moléculaire du gène *TSHR* sont envoyés hors Québec⁹⁶. En 2012-2013, les données du MSSS quant au dépistage de l'HC ne font état d'aucun envoi hors Québec. Un algorithme d'analyses a été préparé en partenariat avec les endocrinologues du CHU Ste-Justine (présenté en annexe).

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

L'analyse mutationnelle du *TSHR* vise trois points⁹⁷ :

- 1) Corroborer les analyses moléculaires avec le niveau sanguin de TSH légèrement augmenté chez les patients.
- 2) Repérer les cas qui ont une résistance compensée (en partie ou en totalité) afin de cesser le traitement de l'hypothyroïdie et le suivi du taux de TSH.
- 3) Déterminer, parmi les apparentés, les porteurs d'une mutation hétérozygote associée à une perte de fonction du *TSHR*.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence et validité clinique

5.1.1 Remplacement par un autre test : le test est unique.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Le gène du récepteur de la thyroïdostimuline contient 10 exons, et code pour une imposante protéine de 764 acides aminés qui comporte un domaine extracellulaire de liaison à la TSH en N-terminal, une portion transmembranaire de 7 hélices alpha et d'un domaine intracellulaire constitué de 3 boucles et d'une queue C-terminale (figure 2).

La perte de fonction (LoF) du récepteur causée par les mutations qui touchent le gène *TSHR* se nomme « résistance ». Les mutations LoF, sont acquises de manière monoallélique (hétérozygote) ou biallélique (homozygote ou double hétérozygote). Elles sont associées à un large spectre de phénotypes allant d'une seule hyperTSHémie à une hypothyroïdie congénitale grave sans anomalies structurales de la thyroïde (euthyroïdie) ou autoimmunité (tableau 1) [Park *et al.*, 2004].

⁹⁶ Communication téléphonique personnelle avec le D^r Jean-François Soucy du CHU Sainte-Justine (29 avril 2014).

⁹⁷ Formulaire de demande et communication téléphonique personnelle avec le D^r Jean-François Soucy du CHU Sainte-Justine (29 avril 2014)

Figure 2 Représentation schématique de la structure du *TSHR* montrant les mutations accompagnées d'une perte de fonction repérées jusqu'en 2010

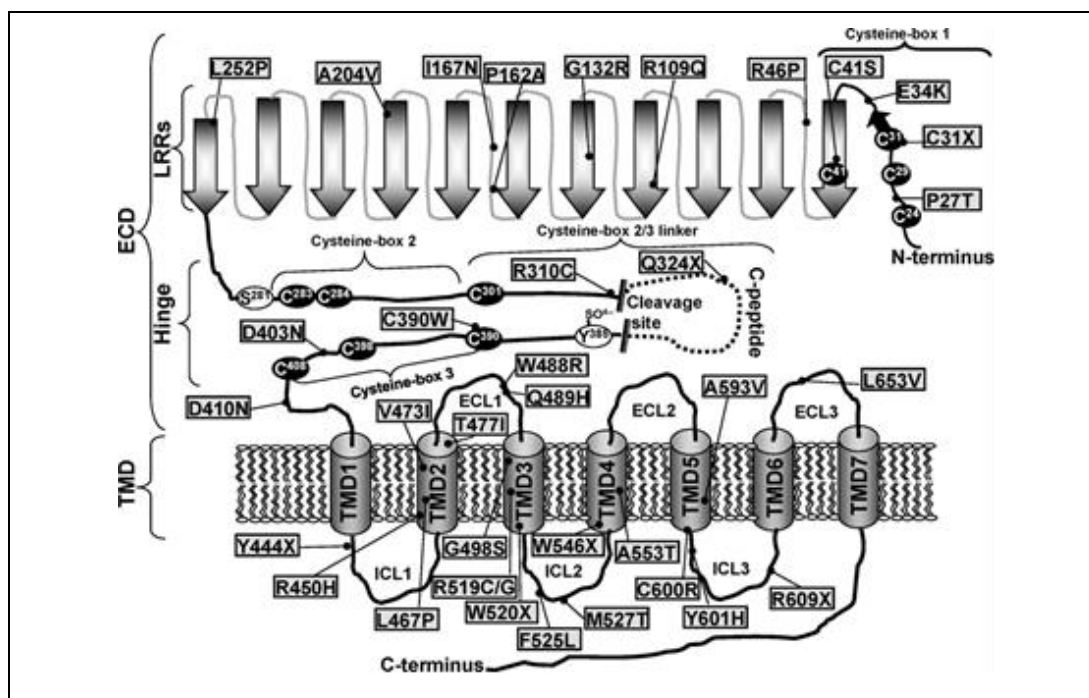


Figure tirée de Persani *et al.*, 2010.

Tableau 1 Critères diagnostiques relativement au syndrome de résistance à la TSH (adapté de Cassio *et al.*, 2013)

RÉSISTANCE À LA TSH	ÂGE AU DIAGNOSTIC	DNS HC	TSH	T4L	TAILLE DE LA THYROÏDE	DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL
Non compensée	Néonatal	+	↑↑	↓	Hypoplasie grave	Mut LoF biallélique TSHR; Mut FT thyroïdien; TSH inactive
Partiellement compensée	Néonatal Enfance	+/-	↑↑	↓/=	Hypoplasie ou normale	Mut LoF mono/biallélique TSHR
Totalement compensée	Enfance	-	=	=	Normale ou hypoplasie légère	Mut FT thyroïdien; TSH inactive; PHP1a; auto-immunité

Abréviations : DNS : dépistage néonatal sanguin, FT : facteur de transcription, HC : hypothyroïdie congénitale, LoF : perte de fonction (*loss-of-function*), Mut : mutation, PHP1a : pseudo-hypoparathyroïdie 1a, T4L : thyroxine libre, TSH : thyrostimuline, TSHR : récepteur de la TSH.

Le niveau de résistance du récepteur *TSHR* à l'action de son ligand, la TSH, varie selon le type et la position de la mutation. Actuellement, plus de 60 mutations différentes du gène *TSHR* ont été décrites en association avec différents niveaux de résistance à la TSH [Cassio *et al.*, 2013]. Les variations de séquence rapportées sont surtout ponctuelles ou constituent de petites insertions/délétions (indels) qui conduisent fréquemment à des mutations faux-sens, mais également à des mutations non-sens ou à un changement du cadre de lecture [Cassio *et al.*, 2013]. Les mutations sont distribuées tout le long de la séquence du gène. Aucune délétion complète du gène n'a été rapportée, mais la délétion d'un exon complet a été décrite [Cangul *et al.*, 2010].

Une recherche sommaire de la littérature scientifique a permis de repérer quelques études cliniques permettant d'apprécier les preuves qui sous-tendent l'utilisation de l'analyse proposée. Le tableau 2 fait état des séries de cas issues d'un dépistage néonatal sanguin (DNS) de l'HC retenues. Ces études permettent de corroborer le phénotype clinique de résistance à la TSH compensée à l'altération moléculaire du gène *TSHR*.

Tableau 2 Séries de cas visant à corroborer la résistance compensée (partielle ou complète) à la TSH et une mutation du *TSHR*

AUTEUR, ANNÉE	CAS (n)	MÉTHODE	VARIATIONS (n)	GÉNOTYPES	L-T4	FORME FAMILIALE	ÉTUDES FONCTIONNELLES (MUTATIONS)
Calebiro <i>et al.</i> , 2012	DNS HC+ (62)	dHPLC Sanger	7 nouvelles	Tous HTZ : 5 FS, 1 CDL, 1 intron	4 traités	Tous les cas ont un parent testé : 3 avec co-ségrégation démontrée et TSH ↑, 2 porteurs sans HC et 2 non porteurs	R609Q, T607I, P162L, I583T et Y466C ↓ de liaison à la TSH. P162L et Y466C ↓ expression surface et d'activité biologique. Q33PfsX46 : protéine tronquée IVS4 + 2A > G : défaut épissage
Ma <i>et al.</i> , 2010	DNS HC+ (18)	SSCP Sanger	1 connue	HMZ R450H	?	6 parents R450H/wt, TSH ↑/T4 normale	Pas de détails
Nicoletti <i>et al.</i> , 2009	DNS HC - (38)	PCR Sanger	9 connues 2 nouvelles	Tous HTZ : 1 NS, 1 CDL, 9 FS	5 traités	Tous les cas ont un parent atteint : aucun signe HC (6), HC seule (3) ou avec Ac+ (2)	P68S montre une réduction de liaison à la TSH sans perte d'activité biologique

Abréviations : Ac : anticorps contre la thyroïde; CDL : changement du cadre de lecture; dHPLC : chromatographie liquide à haute performance en condition dénaturante, ou *denaturing high performance liquid chromatography*; DNS : dépistage néonatal sanguin; FS : faux-sens; HC : hypothyroïdie congénitale; HMZ : homozygote; HTZ : hétérozygote; L-T4 : traitement à la lévothyroxine; n : nombre; NS : non-sens; PRC : réaction en chaîne par polymérase; SSCP : polymorphisme de conformation des ADN simples brins (*single-strand conformation polymorphism*); TSH : thyroïdostimuline; wt : type sauvage (*wild type*).

La grande hétérogénéité clinique de la résistance à la TSH démontre que des facteurs autres que la fonction du *TSHR* sont en cause. En effet, la transmission de lésions bigéniques [Lado-Abeal *et al.*, 2011; Sriphrapradang *et al.*, 2011; Lado-Abeal *et al.*, 2010], la non-couverture de certaines régions du gène (5'UTR, 3'UTR, certaines régions activatrices en cis) par le séquençage et les réarrangements complexes limitent l'efficacité de l'analyse génétique. À ce jour, des délétions larges touchant tout le gène n'ont pas encore été détectées. Toutefois, Cangul et ses collaborateurs ont publié, en 2010, une étude décrivant un cas avec délétion complète de l'exon 2. Le porteur homozygote de cette mutation était issu d'une famille consanguine et montrait une importante hypoplasie thyroïdienne [Cangul *et al.*,

2010]. Aucune étude ayant utilisé la MLPA comme technique de détection des mutations n'a été repérée.

5.1.3 Valeur thérapeutique

L'objectif principal de l'analyse proposée est de diminuer le nombre de dosages hormonaux et d'échographies de la thyroïde chez les cas confirmés de résistance à la TSH compensée. L'analyse moléculaire permettra d'établir le génotype du patient et par suite d'un arrêt transitoire du traitement (L-T4) et d'une évaluation clinique complète, évaluer la pertinence de cesser le traitement. Plusieurs cas qui ont une mutation monoallélique ou biallélique du *TSHR* ont vu leur traitement L-T4 retiré durant l'enfance, en raison d'une démonstration claire que l'hyperthyroïdisme persistante ne cause pas d'hypothyroïdie, condition qui affecte la croissance et le développement cognitif. Le tableau 3 présente la description clinique de quelques cas repérés par le DNS et rapportés dans la littérature.

Tableau 3 Caractéristiques cliniques des cas d'hypothyroïdie congénitale avec glande thyroïde de taille normale (ou légère hypoplasie) et bien positionnée, hyperthyroïdostimulinémie et hormone T4 sérique normale

AUTEUR, ANNÉE	CAS (ÂGE, SEXE)	DNS HC	LÉVOTHYROXINE (L-T4)		ANALYSE MOLÉCULAIRE		CARACTÉRISTIQUES DU PROPOSANT	CARACTÉRISTIQUES DES APPARENTÉS
			DÉBUT	ARRÊT	MÉTHODE	RÉSULTAT		
Lucas- Herald <i>et al.</i> , 2013	M, 11 j	+	94 j	3,1 ans	?	C390F/wt	À 3 ans : croissance normale (taille et poids). Le traitement L-T4 est arrêté. Après 6 semaines, l'enfant se porte bien et est actif : TSH ↑ et T4 normale	Mère, C390F/wt, L-T4 pendant 6 ans. Arrêt L-T4 : TSH ↑, T4 normale. Reprise après 6 semaines pour cause de fatigue.
Moia <i>et al.</i> , 2013	F, 6 ans	+	?	?	dHPLC + Sanger	W520X/wt	À 6 ans : croissance et développement neuro-moteur normaux	Mère, W520X/wt, TSH ?, T4?
Bas <i>et al.</i> , 2012	M, 3 j	+	30 j	Non	?	P162A/P162A	À 3 ans, retard de croissance (âge anatomique ou osseux de 2 ans). Répond à tous les paramètres de développement du Test de Denver. ⁹⁸	Parents consanguins P162A/wt, 1 cas de goître dans la famille,
Narumi <i>et al.</i> , 2009	M, 5 j	+	54 j	2 ans	PCR + Sanger	R450H/R450H	À 17 ans, TSH ↑↑ et T4 normale	s. o.
	F, 6 j	+	14 j	12 ans		G132R/R450H	À 17 ans, TSH ↑↑ et T4 normale	Mère, R450H/wt, TSH normale
	M, 5 j	+	23 j	3 ans		D403N/R450H	À 12 ans, TSH ↑ et T4 normale	Mère, R450H/wt, TSH normale
	M, 4 j	+	5 j	5 ans		R450H/wt	À 5 ans, TSH ↑ et T4 normale	2 frères et mère, R450H/wt, TSH normale
	M, 5 j	+	1 j	1 an		R450H/wt	À 13 ans, TSH ↑ et T4 normale	s. o.
	F, 5 j	+	Non traitée			A204V/wt	À 12 ans, TSH ↑ et T4 normale	s. o.
	Mizuno <i>et al.</i> , 2009	M, 33 j	+	20 mo		15 ans	PCR + Sanger	R450H/R450H
M, 27 j	+	4 mo	13 ans					
M, 35 j	+	44 mo	Non					
M, 61 j	+	32 mo	Non					
F, 17 j	+	17 j	8 ans					

⁹⁸ Le Test de Denver permet d'évaluer le niveau de l'enfant dans les différents domaines du développement (motricité, langage, motricité fine et contact social).
Test du développement de l'enfant de Denver [site Web], disponible à : <http://protectnet.wordpress.com/2011/11/13/test-de-developpement-de-denver/>.

AUTEUR, ANNÉE	CAS (ÂGE, SEXE)	DNS HC	LÉVOTHYROXINE (L-T4)		ANALYSE MOLÉCULAIRE		CARACTÉRISTIQUES DU PROPOSANT	CARACTÉRISTIQUES DES APPARENTÉS
			DÉBUT	ARRÊT	MÉTHODE	RÉSULTAT		
Yuan <i>et al.</i> , 2008	M, 30 j	+	60 j	Non	PCR + Sanger	G245S/wt	À 6 ans : croissance et développement cognitif normaux, maintien du traitement.	Père, G245S/wt, non traité, TSH/T4 normales
Tonacchera <i>et al.</i> , 2007	M, 13 ans	-	13 ans	14 ans	PCR + Sanger	Q8fsX62/wt	TSH ↑/T4 normale à 13 ans sans aucun signe d’hypothyroïdie. Après l’arrêt du traitement, TSH ↑, T4 normale. Croissance, évolution psychologique et scolaire normales.	Père, Q8fsX62/wt, non traité, TSH limite, T4 normale. Sœur, 9 ans, Q8fsX62/wt, DNS HC?, non traitée, TSH ↑, T4 normale. Aucun signe d'hypothyroïdie.
	F, 31 ans	?	21 ans	31,3 ans		D410N/wt	TSH ↑ à 31 ans, hypothyroïdie traitée depuis 10 ans. Après l’arrêt du traitement, TSH ↑, T4 normale.	Sœur, D410N/wt, non traitée TSH ↑, T4 normale.
	M, 38 ans	?	Non traité			P162A/wt	TSH ↑, T4 normale, aucun signe d’hypothyroïdie.	Père, P162A/wt, données médicales manquantes (Ac+?), TSH ↑, T4 normale

Abréviations : Ac : anticorps contre la thyroïde; DNS : dépistage néonatal sanguin; F : sexe féminin; HC : hypothyroïdie congénitale; j : jours; L-T4 : traitement à la lévothyroxine; Mo : mois; n : nombre; NS : non-sens; M : sexe masculin; PCR : amplification en chaîne par polymérase; TSH : thyroïdostimuline; wt : type sauvage (*wild-type*, sans mutation).

5.2 Validité analytique (ou technique)

Le séquençage de type Sanger est virtuellement capable de détecter toutes les substitutions nucléotidiques et petites insertions ou délétions (indels) à l'intérieur d'un amplicon amplifié par PCR. Toutefois, certaines indels plus larges pourraient ne pas être détectées. Comme l'HC est souvent transmise selon un patron autosomique récessif, cette particularité pourrait s'avérer importante en clinique. En effet, Cangul et ses collaborateurs rapportent le cas d'une famille consanguine incluant plusieurs sujets atteints d'une forme grave d'hypothyroïdie congénitale (HC). Au cours d'études de liaison génétique de plusieurs locus connus de l'HC, les chercheurs ont ciblé le gène *TSHR* comme étant la source possible du défaut. L'amplification de l'exon 2 a été tentée à plusieurs reprises, sans succès. Subséquemment, des analyses transcriptionnelles en RT-PCR ont montré une délétion complète de l'exon 2. Les cas touchés étaient homozygotes pour la mutation et les parents étaient tous deux des porteurs hétérozygotes. Dans ce cas-ci, l'analyse moléculaire de *TSHR* par la technique de Sanger n'a pas été suffisante à la détection de la mutation en cause. La RT-PCR ou la MLPA s'avèrent donc des techniques complémentaires essentielles au séquençage de Sanger [Cangul *et al.*, 2014].

5.3 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation n'a été repérée concernant le séquençage du *TSHR* relativement au diagnostic et à la prise en charge de l'hypothyroïdie congénitale.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

La démonstration d'une hyperthyroïdisme persistante compensée causée par une mutation du *TSHR* pourrait permettre le retrait de certains suivis et traitements.

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

Non évaluées.

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

Non évalués.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Parmi les cas d'hypothyroïdie congénitale détectés à la naissance, certains démontrent une hyperthyroïdisme persistante, sans anomalie fonctionnelle ou physique de la glande thyroïde. Dans ces cas, l'analyse moléculaire du *TSHR*, en combinaison à une évaluation clinique complète, peut démontrer que la condition est stable et que le traitement à la lévothyroxine (L-T4) dans le but de normaliser les concentrations sériques de TSH est inutile.

7.2 Validité clinique

Plusieurs séries de cas d'hypothyroïdie congénitale détectés à la naissance et ayant fait l'objet d'analyses cliniques et moléculaires complémentaires ont été recensées. L'évaluation du statut mutationnel du gène *TSHR* au moyen du séquençage classique a permis de mettre en évidence plusieurs cas de résistance à la TSH compensée. À ce jour, une seule mutation facilement repérable par la MLPA a été détectée chez un cas non classique homozygote issu de parents consanguins.

7.3 Validité analytique : aucune donnée.

7.4 Recommandations d'autres organismes : aucune donnée.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Analyse mutationnelle du gène du récepteur de la thyroïdostimuline (*TSHR*) par séquençage et MLPA

Statut de la technologie diagnostique

- ☐ Établie
- ☐ Innovatrice
- ☒ Expérimentale (pour cette application)
- ☐ 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 des données supplémentaires de validité clinique et technique 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

RÉFÉRENCES

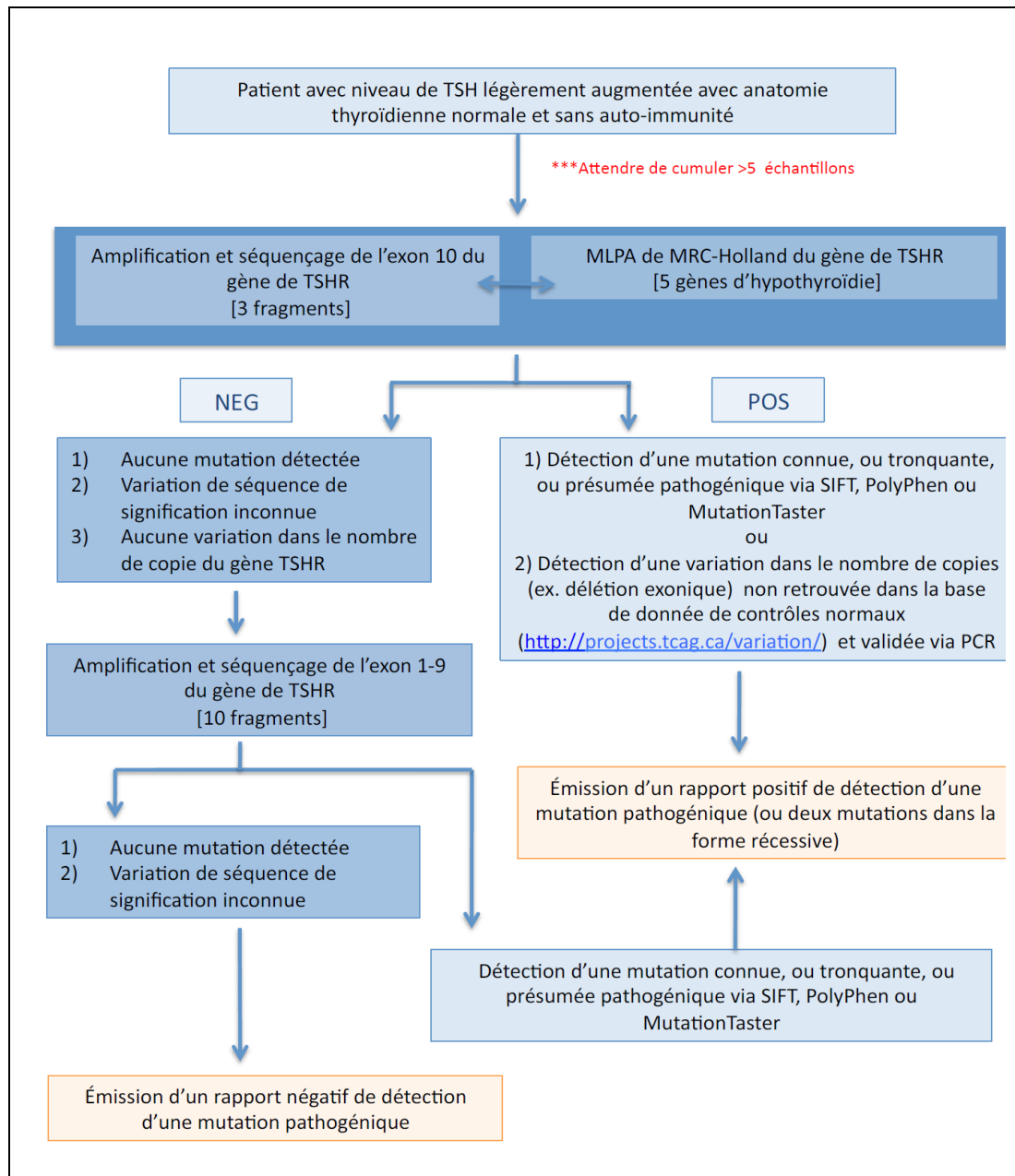
- Bas VN, Cangul H, Agladioglu SY, Kendall M, Cetinkaya S, Maher ER, Aycan Z. Mild and severe congenital primary hypothyroidism in two patients by thyrotropin receptor (TSHR) gene mutation. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25(11-12):1153-6.
- Beck-Peccoz P, Persani L, Calebiro D, Bonomi M, Mannavola D, Campi I. Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(4):529-46.
- Calebiro D, Gelmini G, Cordella D, Bonomi M, Winkler F, Biebermann H, et al. Frequent TSH receptor genetic alterations with variable signaling impairment in a large series of children with nonautoimmune isolated hyperthyrotropinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(1):E156-60.
- Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000;160(4):526-34.
- Cangul H, Schoenmakers NA, Saglam H, Doganlar D, Saglam Y, Eren E, et al. A deletion including exon 2 of the TSHR gene is associated with thyroid dysgenesis and severe congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27(7-8):731-5.
- Cangul H, Morgan NV, Forman JR, Saglam H, Aycan Z, Yakut T, et al. Novel TSHR mutations in consanguineous families with congenital nongoitrous hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;73(5):671-7.
- Cassio A, Nicoletti A, Rizzello A, Zazzetta E, Bal M, Baldazzi L. Current loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene: When to investigate, clinical effects, and treatment. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;(5 Suppl 1):29-39.
- Deladoëy J, Ruel J, Giguère Y, Van Vliet G. Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(8):2422-9.
- Keren B et Sanlaville D. Nouveaux outils diagnostiques du retard mental. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 2008;11(4);230-41.
- Kircher M et Kelso J. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays* 2010;32(6):524-36.
- Lado-Abeal J, Castro-Piedras I, Palos-Paz F, Labarta-Aizpun JI, Albero-Gamboa R. A family with congenital hypothyroidism caused by a combination of loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor and adenylate cyclase-stimulating G alpha-protein subunit genes. *Thyroid* 2011;21(2):103-9.
- Lado-Abeal J, Quisenberry LR, Castro-Piedras I. Identification and evaluation of constitutively active thyroid stimulating hormone receptor mutations. *Methods Enzymol* 2010;484:375-95.
- Laflamme N, Fortier M, Lindsey C, Turgeon J. Rapport d'évaluation du Programme québécois de dépistage sanguin des maladies génétiques chez le nouveauné. Québec, Qc : Institut national de santé publique du Québec (INSPQ); 2006. Disponible à : <http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/484-RapportDepistageSanguin.pdf>.

- Lucas-Herald A, Bradley T, Hermanns P, Jones J, Attaie M, Thompson E, et al. Novel heterozygous thyrotropin receptor mutation presenting with neonatal hyperthyrotropinaemia, mild thyroid hypoplasia and absent uptake on radioisotope scan. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013;26(5-6):583-6.
- Ma SG, Fang PH, Hong B, Yu WN. The R450H mutation and D727E polymorphism of the thyrotropin receptor gene in a Chinese child with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010;23(12):1339-44.
- Mizuno H, Kanda K, Sugiyama Y, Imamine H, Ito T, Kato I, et al. Longitudinal evaluation of patients with a homozygous R450H mutation of the TSH receptor gene. *Horm Res* 2009;71(6):318-23.
- Moia S, Godi M, Walker GE, Roccio M, Agretti P, Tonacchera M, et al. The W520X mutation in the TSHR gene brings on subclinical hypothyroidism through an haploinsufficiency mechanism. *J Endocrinol Invest* 2013;36(9):716-21.
- Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: A population-based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(4):1317-23.
- Nicoletti A, Bal M, De Marco G, Baldazzi L, Agretti P, Menabo S, et al. Thyrotropin-stimulating hormone receptor gene analysis in pediatric patients with non-autoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(11):4187-94.
- Park SM et Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005;42(5):379-89.
- Park SM, Clifton-Bligh RJ, Betts P, Chatterjee VK. Congenital hypothyroidism and apparent athyreosis with compound heterozygosity or compensated hypothyroidism with probable hemizyosity for inactivating mutations of the TSH receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60(2):220-7.
- Persani L, Calebiro D, Cordella D, Weber G, Gelmini G, Libri D, et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2010;322(1-2):72-82.
- Refetoff S. The syndrome of resistance to thyroid stimulating hormone. *J Chin Med Assoc* 2003;66(8):441-52.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg 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.
- Sriprapradang C, Tenenbaum-Rakover Y, Weiss M, Barkoff MS, Admoni O, Kawthar D, et al. The coexistence of a novel inactivating mutant thyrotropin receptor allele with two thyroid peroxidase mutations: A genotype-phenotype correlation. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(6):E1001-6.
- Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, Agretti P, Banco M, Perri A, et al. Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67(5):712-8.
- Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm Res* 1992;38(5-6):230-5.

- Wu T, Flowers JW, Tudiver F, Wilson JL, Punyasavatsut N. Subclinical thyroid disorders and cognitive performance among adolescents in the United States. *BMC Pediatr* 2006;6:12.
- Yuan ZF, Mao HQ, Luo YF, Wu YD, Shen Z, Zhao ZY. Thyrotropin receptor and thyroid transcription factor-1 genes variant in Chinese children with congenital hypothyroidism. *Endocr J* 2008;55(2):415-23.

ANNEXE A

Algorithme d'analyse



SÉQUENÇAGE DE L'EXOME DANS L'EXPLORATION DE LA DÉFICIENCE INTELLECTUELLE ET DES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES (RÉFÉRENCE 2014.01.009)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de la transmission de la demande d'examen au MSSS** : 28 janvier 2014
- 1.3 **Date de la réception des demandes à l'INESSS** : 1^{er} mars 2014
- 1.4 **Date de la transmission de l'avis au ministre** : 30 juin 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 l'exome sur la plateforme HiSeq 2500 (Illumina) à la suite de la capture de l'exome avec la trousse *SureSelect Human all Exon Capture v4* (v5 sous peu) de la compagnie Agilent.

La validation des variants observés est effectuée par séquençage de type Sanger chez le cas index et ses parents. La pertinence clinique des variants repérés est ensuite raffinée à l'aide d'une étude d'association génétique (par trio).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le séquençage de l'ensemble des régions codantes (exome) par séquençage de nouvelle génération (NGS) vise à détecter les mutations à l'origine de la déficience intellectuelle (DI) (ou retard mental) et des maladies neurodégénératives (MN). Cette technologie permet d'obtenir rapidement et en parallèle des millions de séquences qui, lorsque colligées, donneront la séquence de tous les gènes d'un individu. Elle permet, par conséquent, de détecter des variations génétiques dans des gènes déjà associés à la maladie et dans des gènes dont le rôle n'était pas suspecté.

Le séquençage de l'exome est effectué suivant la capture (ou l'enrichissement) d'environ 200 000 exons [Mamanova *et al.*, 2010; Metzker, 2010; Turner *et al.*, 2009]. Au cours de cette étape, l'ADN génomique est fragmenté et lié à des oligonucléotides adapteurs, puis les fragments d'ADN sont hybridés avec des milliers d'oligonucléotides (appâts/*baits*) biotinylés qui, collectivement, assurent la couverture de l'ensemble de l'exome. Les complexes fragments d'ADN/d'oligonucléotides biotinylés sont purifiés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine (annexe A). Par suite de l'élution de l'ADN capturé, les

fragments sont fixés sur un support solide et amplifiés (*bridge amplification*), ce qui mène à la création de foci où se retrouvent multiples copies du même fragment d'ADN (*cluster generation*). Le séquençage est ensuite effectué selon un principe de base similaire à l'approche de Sanger : les nucléotides des fragments d'ADN sont repérés au cours de la synthèse d'un brin complémentaire à la matrice. Le nucléotide ajouté à chaque cycle est détecté par sa fluorescence (type et intensité) (annexe B).

Les séquences obtenues sont alors évaluées pour leur qualité, assemblées et comparées à une séquence référence. L'assemblage est effectué grâce au programme *Burroughs-Wheeler Aligner* (BWA 0.6.2) et au *Genome Analysis Toolkit* (GATK v2.6) du *Broad Institute*. Les variations observées sont filtrées de façon automatisée et manuelle, de façon à ne conserver que les variants qui ont un rôle démontré, suspecté ou inconnu dans l'étiologie de la maladie. L'analyse automatisée est effectuée par le GATK Unified Genotyper (*Broad Institute*) et les variants sont annotées avec Annovar⁹⁹.

Les variants retenus sont confirmés par séquençage de Sanger selon les recommandations de l'*American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) [Rehm *et al.*, 2013]. L'ADN des parents du cas index est également séquençé pour évaluer la pertinence des variations observées. Le demandeur estime avoir à valider une dizaine de variations par cas [données du demandeur; Yang *et al.*, 2013].

2.3 Société ou développeur

La trousse *SureSelect Human all Exon Capture v4* 50Mb est utilisée pour capturer les séquences exoniques. Elle a été conçue par Agilent (Mississauga, Ont).

La plateforme Hi-Seq 2500 est une technologie élaborée et produite par Illumina (San Diego, CA, USA).

2.4 Licence : sans objet.

2.5 Brevet, le cas échéant : la technologie de séquençage est brevetée par Illumina.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Ce test et les technologies utilisées pour effectuer cette analyse n'ont pas fait l'objet d'homologation auprès de Santé Canada ou de la FDA.

2.7 Valeur pondérée : 2 967,48

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

3.1 Patients ciblés

L'analyse sera disponible pour les populations adultes et pédiatriques, selon un algorithme précis (annexe C).

- 1) Chez les patients présentant un retard de développement ou une déficience intellectuelle, l'analyse sera effectuée sous les conditions suivantes :

⁹⁹ ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [site Web]. Disponible à : <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>.

- Le patient présente un retard global de développement modéré à grave ou une déficience intellectuelle modérée à grave.
 - L'investigation clinique n'a pu établir d'étiologie propre aux antécédents cliniques (par exemple, anoxie néonatale, exposition prénatale à l'alcool) ou un tableau clinique (par exemple, syndrome monogénique) qui pourrait faire l'objet d'une investigation ciblée.
 - L'absence d'anomalies pathogéniques est établie par hybridation génomique comparative sur puce à ADN (*Comparative Genomic Hybridization* ou CGH).
 - L'exploration phénotypique pertinente est complétée (par exemple, imagerie cérébrale).
- 2) Chez les patients aux prises avec une maladie neurodégénérative, l'analyse sera effectuée :
- en présence de perte des acquisitions ou de progression d'un symptôme neurologique particulier (à l'exclusion de l'épilepsie).
 - en l'absence d'un diagnostic précis qui pourrait être exploré de façon efficace par séquençage ciblé.
 - lorsque l'exploration phénotypique pertinente est complétée.
 - après exclusion de cas sporadiques de conditions neurodégénératives caractérisées par une grande complexité génétique (par exemple, maladie de Parkinson).

3.2 Description de la maladie visée

Déficience intellectuelle (DI)

La déficience intellectuelle (DI) est le trouble neurologique le plus commun. Son taux de prévalence est évalué entre 1 % et 3 % de la population [Héron et Jacquette, 2009; Shevell *et al.*, 2003; Leonard et Wen, 2002; Yeargin-Allsopp *et al.*, 1997; Baroff, 1982]. Ses répercussions 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 personnes, leur famille et la société. Le *Center for Disease Control* (CDC) a estimé, en 2003, le coût de soutien de chaque patient, pendant toute sa vie, à environ 1 000 000 \$ [Topper *et al.*, 2011]. 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 ce qui est des comorbidités physiques et mentales associées [Einfeld *et al.*, 2011; Van Schrojenstein Lantman-de Valk et Walsh, 2008; Kwok et Cheung, 2007].

Les DI sont catégorisées en quatre sous-groupes en fonction du phénotype et tel que mesuré par le quotient intellectuel (QI). Les déficiences légères, modérées et graves présentent respectivement un QI compris entre 50 et 70, 35 et 50 et 20 et 35. Dans certains cas, les patients qui ont un QI inférieur à 20 sont considérés comme déficients profonds [Chiurazzi et Oostra, 2000; Battaglia *et al.*, 1999]. L'*American Psychiatric Association* [APA, 2003] rapporte que, dans l'ensemble des personnes atteintes d'une DI, 85 % sont considérées comme présentant une DI légère, alors que 10 % ont une DI modérée. Les cas de DI grave se retrouvent chez 3 % à 4 % des patients. Finalement, chez 1 % à 2 % des patients, une DI profonde est rapportée.

La DI fait partie des caractéristiques cliniques de plus de 2 000 maladies ou syndromes décrits dans OMIM¹⁰⁰. Cette hétérogénéité phénotypique rend le diagnostic et

¹⁰⁰ Recherche effectuée en date du 26 mars 2014 sur le site Web d'OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

l'établissement de l'étiologie complexes. Les causes de la DI peuvent être acquises ou génétiques. Les cas acquis proviendraient, entre autres, d'insultes environnementales comme les infections, les traumatismes et les expositions à des agents tératogènes. Dans les pays développés, il est estimé que la plupart des formes les plus graves de DI (QI<50) aurait une origine monogénique, alors que les formes plus légères pourraient résulter d'une interaction mettant en cause plusieurs gènes et des facteurs environnementaux [Ropers, 2010]. La DI est souvent sporadique et sans éléments familiaux, ce qui suggère qu'une proportion importante des cas sont causés par des mutations *de novo* [De Ligt *et al.*, 2012].

Les causes génétiques de la DI peuvent grossièrement être divisées en trois groupes : les aberrations chromosomales, les défauts monogéniques et les troubles épigénétiques. Un dernier sous-groupe pourrait être créé pour les troubles causés par les mutations d'ADN mitochondrial. Les deux tiers de ces cas proviennent de la trisomie 21, dont l'incidence est d'environ 1 cas pour 770 naissances vivantes dans la population générale, au Québec¹⁰¹. La deuxième cause en importance de DI est liée à la présence de mutations dans le gène *FMR1* (syndrome du X fragile) dans 0,5 % des cas¹⁰². Plusieurs autres gènes situés sur le chromosome X mais également sur les autosomes ont été associés à la DI syndromique [Campeau *et al.*, 2013; Carss *et al.*, 2013; Mefford *et al.*, 2012; Coffee *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2001; Amir *et al.*, 1999; Hamel *et al.*, 1999]. La cause génétique précise demeure inconnue chez 55 % à 60 % des patients [Mefford *et al.*, 2012; Topper *et al.*, 2011; Rauch *et al.*, 2006] et plusieurs auteurs ont suggéré que 450 à 1 000 gènes pourraient être en cause dans la DI [Schuurs-Hoeijmakers *et al.*, 2013; Van Bokhoven, 2011].

Maladies neurodégénératives (MN)

Les maladies neurodégénératives regroupent plus de 600 troubles qui affectent principalement les neurones du cerveau humain. La maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie de Huntington (MD) sont les troubles qui touchent le plus d'individus parmi les MN [Inglese et Petracca, 2013; Coppodè, 2012; Williams, 2002]. Il s'agit de conditions incurables et débilitantes qui résultent en dégénération ou en perte neuronale (ou de leur gaine de myéline) menant à une atteinte de la capacité de mouvement (ataxie) ou de fonctionnement mental (démence). Elles peuvent être graves, voire mortelles¹⁰³ [Gbaya *et al.*, 2012]. Plusieurs de ces maladies sont caractérisées par l'accumulation progressive d'agrégats protéiques particuliers dans certaines régions du cerveau. Ces agrégats contribuent à l'étiologie de la maladie et à son diagnostic [Yankner *et al.*, 2008].

Les maladies neurodégénératives peuvent être causées par certaines conditions telles que l'alcoolisme, les blessures cérébrales, les tumeurs ou les accidents vasculaires cérébraux. Le rôle de facteurs environnementaux tels que les métaux et les pesticides a également été rapportée [revue par Modgil *et al.*, 2014]. L'agrégation de cas familiaux de plusieurs troubles neurodégénératifs et des études d'association ont permis de repérer des gènes associés aux formes les plus communes de maladies neurodégénératives. Toutefois, la majorité des cas semblent sporadiques [Al-Chalabi *et al.*, 2013; Cruts *et al.*, 2012; Sellbach *et al.*, 2006; Campion *et al.*, 1999]. Une composante génétique semble influencer l'apparition des phénotypes, mais le nombre de gènes concernés, leurs interactions et la contribution de

¹⁰¹ Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). Trisomie 21 [site Web], disponible à :

<http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/santepub/depistage-prenatal/professionnels/index.php?Trisomie-21>.

¹⁰² Centers for Disease Control and Prevention. Fragile X syndrome (FXS) [site Web], disponible à : <http://www.cdc.gov/ncbddd/fxs/data.html>.

¹⁰³ European Commission. Neurodegenerative disorders [site Web]. Disponible à :

http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological/index_en.htm.

facteurs épigénétiques rendent l'étiologie complexe et la transmission différente du mode mendélien classique [Cruts *et al.*, 2012; Coppodè, 2012; Parròn *et al.*, 2011; Williams, 2002].

Les populations aux prises avec une MN sont importantes. À titre d'exemple, la maladie d'Alzheimer est la MN la plus commune et la forme la plus importante de démence chez les personnes âgées. Au Québec, il est estimé qu'en 2009, 100 000 personnes étaient atteintes de la maladie d'Alzheimer et de co-morbidités associées¹⁰⁴. Chez les aînés de 65 ans et plus, 1 personne sur 11 est touchée et la prévalence double en moyenne aux 5 ans [Gbaya *et al.*, 2012]. La deuxième MN en importance au Québec est la maladie de Parkinson. Au début des années 2000, la maladie de Parkinson atteignait approximativement 100 000 personnes de 65 ans et plus (environ 1 personne sur 100) [Gbaya *et al.*, 2012].

Tout comme pour la DI, la détermination de l'étiologie est complexe, ce qui est non seulement attribuable à une hétérogénéité génétique importante, mais également à l'implication de facteurs environnementaux. Jusqu'à présent et pour la maladie d'Alzheimer seulement, 695 gènes dont le rôle de leur protéine va du transport lipidique (APOE, CLU) à la réponse immunitaire (CD33, EPHA1) ont été associés à cette maladie¹⁰⁵. Il est estimé que 90 % à 95 % des cas observés chez les personnes de plus de 65 ans sont de nature sporadique [Coppodè, 2012; Campion *et al.*, 1999].

3.3 Nombre de patients visés

Déficiences intellectuelles

Les demandeurs estiment l'incidence des formes modérées à graves de DI à 0,5 %. Environ 400 nouveaux cas sont répertoriés chaque année, au Québec. Toutefois, comme le rendement diagnostique des approches conventionnelles (caryotype, CGH et approche de gène candidat) est d'environ 50 %, le nombre d'analyses prévues est d'environ 200 cas par année.

Il est à noter que, pour chaque cas index, le séquençage d'environ 10 loci par une approche de type Sanger sera également effectué pour génotyper les parents (400 spécimens).

Maladies neurodégénératives

Sur la base de son expérience, le demandeur estime la demande annuelle à 100 cas.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Diagnostic moléculaire, conseil génétique, génétique, neurologie et pédiatrie.

3.5 Modalités d'administration du test

Le centre demandeur a établi un algorithme précis décrivant les conditions sous lesquelles un séquençage de l'exome pourra être demandé (annexe C). Seul un médecin généticien pourra demander le séquençage de l'exome pour l'établissement de l'étiologie de la déficience intellectuelle, alors que les maladies neurodégénératives requerront la demande conjointe d'un médecin généticien et d'un neurologue. L'analyse ne pourra être effectuée que suivant la révision de la demande par un comité d'experts constitué de médecins généticiens et de neurologues spécialisés dans les conditions neurodéveloppementales et neurodégénératives.

¹⁰⁴ Statistique obtenue de la Société Alzheimer du Québec (site Web : <http://www.societealzheimerdequebec.com/>).

¹⁰⁵ Alzforum. AlzGene: Field synopsis of genetic association studies in AD [site Web], disponible à : <http://www.alzgene.org/>.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Le séquençage de l'exome sera réalisé chez les patients dont l'étiologie n'aura pu être établie par les approches de première intention. Dans le dépistage génétique, cette analyse sera donc complémentaire au CGH et au séquençage de certains gènes particuliers dans les cas où une maladie syndromique est suspectée.

Il s'agit d'une nouvelle analyse qui ne remplacera aucune autre qui figure actuellement dans le *Répertoire*. La recherche de mutation dans certains gènes individuels associés à la DI et les MN se trouve dans le *Répertoire* dont :

- La recherche d'expansion de trinuécléotides dans *FMR1* par buvardage de type Southern pour les cas de X fragile – code 50340
- La recherche d'expansion de trinuécléotides dans *FRAXE*; *FMR2* dans les cas de déficience intellectuelle – code 50140
- La recherche de l'expansion de trinuécléotides (CAG) dans la maladie de Huntington - code 50161
- La recherche de mutation dans les cas d'ataxie de Charlevoix-Saguenay (ARSACS); SACS par ASO – code 50010
- La recherche de mutation par TAAN et buvardage de type Southern dans le gène *FXN* dans les cas d'ataxie de Friedreich (recherche d'expansion de trinuécléotides) – code 50011
- La recherche de mutation par MS-MLPA pour le syndrome Prader-Willi, syndrome d'Angelman – code 50301

Dans le cas de la recherche de mutation dans les gènes *FRAX* et *FMR2* (code 50140), le test doit être effectué avant le séquençage de l'exome. Les autres recherches de mutations devraient se poursuivre dans les cas qui ont des antécédents familiaux ou chez qui le tableau clinique soutient un dépistage génétique ciblé. Les codes pourraient également être utilisés pour la recherche de porteur d'allèle mutée.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le diagnostic et la recherche de l'étiologie de la DI comporte une recherche phénotypique et un dépistage génétique. Plusieurs organismes et groupes d'experts ont émis des recommandations à ce sujet dont l'*American Academy of Pediatrics* et l'*American Academy of Neurology* [Héron et Jacquette, 2009; Moeschler et Shevell, 2006; Shevell *et al.*, 2003]. La série de tests sélectionnée est souvent dépendante du phénotype particulier de la personne atteinte. Parmi les examens demandés, notons des analyses biomédicales, des analyses d'imagerie cérébrale, d'électrophysiologie et des examens génétiques et métaboliques.

Environ 15 % des DI sont attribuables à des défauts génétiques détectables par cytogénétique [Rauch *et al.*, 2006; De Vries *et al.*, 2005; Leonard et Wen, 2002] tels que des chromosomes supplémentaires, des translocations non équilibrées et des délétions relativement importantes. Le caryotype classique et l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) peuvent également être effectués dans certains cas de suspicion d'aneuploïdies (comme les trisomies 21 ou 18) ou de certains syndromes bien définis ou pour confirmer certains résultats obtenus par CGH.

L'utilisation de CGH a mené à la détection de pertes ou de gains de segments chromosomiques plus petits et de variations dans le nombre de copies indétectables avec la cytogénétique classique. L'utilisation de cette approche permet d'élucider 15 % à 20 % des cas de DI [Flore et Milunsky, 2012; Cooper *et al.*, 2011; Manning et Hudgins, 2010; Miller *et al.*, 2010; Hochstenbach *et al.*, 2009; Zahir et Friedman, 2007]. L'ACGM en recommande l'utilisation en première intention [Kearney *et al.*, 2010].

Le séquençage de gènes ciblés est également effectué en présence ou en l'absence de caractéristiques particulières comme la micro- ou la macroencéphalie, l'autisme, le dysmorphisme facial ou des convulsions. Cette option a une application limitée puisqu'elle est hautement dépendante de la concordance entre le phénotype du patient et la description clinique du trouble. De plus, l'hétérogénéité génétique associée aux maladies rend le choix de ce type d'examen lourd et coûteux. Le rendement associé à la recherche de mutations dans des gènes ciblés est d'environ 5 % à 10 % [Willemsen et Kleefstra, 2014; Topper *et al.*, 2011].

L'examen de panels de gènes associés à la DI et la MN et le séquençage de l'exome sont actuellement disponibles sur le marché, aux États-Unis. Plusieurs laboratoires diagnostiques offrent le séquençage de panels de gènes constitués de 12 à plus de 100 gènes. En fonction du fournisseur, ces panels se concentrent sur certains sous-types de DI ou de MN (par exemple, la DI liée au chromosome X ou la maladie d'Alzheimer). Le séquençage de l'exome est généralement recommandé chez des patients qui ont passé des analyses poussées et présentent certaines caractéristiques cliniques particulières. Il existe un séquençage d'exomes aux fins d'applications cliniques disponible auprès, entre autres, du *Baylor College of Medicine*, de l'ARUP, du *Emory Genetics Laboratory*, du *Cincinnati Children's Hospital Medical Center*, de *Duke Medicine*, de *Gene-by-Gene* et d'*Ambry Genetics*. Les coûts associés à ce type d'analyses se situent entre 1 095 \$ et plus de 15 000 \$ en fonction du type de résultats attendus (données brutes ou rapports finaux), du type d'exome désiré (l'exome entier ou seulement les 4 000 à 4 600 gènes associés aux maladies humaines, à ce jour) et de la rapidité avec lesquels les résultats doivent être émis.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les entités cliniques visées par cette analyse sont génétiquement et phénotypiquement très hétérogènes et les méthodes d'investigation actuelles ne permettent de déterminer les causes génétiques que chez 40 % à 50 % des patients. Or, comme le séquençage de l'exome par NGS permet d'obtenir rapidement et à faible coût la séquence de la plupart des exons simultanément [Dixon-Salazar *et al.*, 2012; Need *et al.*, 2012; Neveling *et al.*, 2012; Shanks *et al.*, 2012] et qu'il est estimé que 80 % à 85 % des variants responsables des maladies mendéliennes sont situés dans l'exome [Dixon-Salazar *et al.*, 2012; Bonnefond *et al.*, 2010], le taux de résolution de l'étiologie génétique par cette approche pourrait être significatif. De plus, dans les cas où le patient possède un tableau clinique atypique ou peu spécifique, cette analyse élimine la nécessité d'établir une concordance phénotype-génotype précise pour proposer le dépistage de gènes précis.

À la lumière de l'évolution des connaissances qui va à un rythme exponentiel et contrairement au séquençage de type Sanger ciblée, l'utilisation de cette approche permet de revisiter les données de séquençage subséquentement pour déterminer si des causes peuvent être établies dans les cas indéterminés. En 2012, De Ligt et ses collaborateurs ont séquencé l'exome de 100 patients présentant une DI. Ils ont rapporté une résolution de l'étiologie génétique dans 16 % des cas. En 2013, une nouvelle analyse des séquences

exoniques chez les cas non résolus a permis d'augmenter ce taux de résolution à 29 % [Willemsen et Kleefstra, 2014].

Malgré les limites de la technique, le rendement diagnostique rapporté par plusieurs groupes est supérieur à celui des autres approches diagnostiques qui sont actuellement offertes [Yang *et al.*, 2013; Dixon-Salazar *et al.*, 2012; Rauch *et al.*, 2012; Manning et Hudgins, 2010].

4.4 Coût de la technologie et des options

Le tableau ci-dessous comprend les coûts associés au démarrage de l'analyse (non récurrents) et au maintien des ces activités. Il est à noter que les coûts n'incluent pas les dépenses en matière de ressources humaines et d'activités de formation rémunérées (dont les congrès) nécessaires à la formation initiale et au maintien des compétences du personnel.

Tableau 1 Coûts associés au démarrage et à la production de l'analyse

COÛTS NON RÉCURRENTS DE DÉMARRAGE		
ÉLÉMENT	COÛT	COMMENTAIRES
HiSeq 2500	s. o.	
Structure informatique	s. o.	Elle sera fournie par Génome Québec dans le cadre de son partenariat CHUSJ-GQ.
Total des coûts non récurrents	s. o.	
COÛTS RÉCURRENTS		
ÉLÉMENT	COÛT	COMMENTAIRES
Coûts reliés au contrôle de la qualité		
Épreuves du CAP ou autre (coût annuel)		En 2014, aucune épreuve propre au séquençage par NGS n'est disponible par le CAP.
Coût des réactifs pour l'épreuve de contrôle de la qualité externe	nil	
Coût en ressources humaines pour la réalisation des épreuves	nil	
Mise à jour des logiciels (coûts annuels)	s. o.	La mise à jour sera faite par Génome Québec.
Coûts d'exploitation		
Coûts des réactifs (capture d'exons, séquençage NGS, Sanger), par patient	1 022,51 \$ (Hiseq) + 877,69 \$ (Sanger) + 102 \$ (reprise)	
Coût en ressources humaines, par patient	828,05 \$	Taux horaire : 35 \$ l'heure, en 2014.
<i>Total des coûts récurrents</i>	<i>2 934,20 \$</i>	

Abréviations : CAP : *College of American Pathologists*; CHUSJ-GQ CHU Sainte-Justine-Génome Québec; NGS : *new generation sequencing*; s.o. : sans objet.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement par un autre test : cette analyse ne remplace aucune autre.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

L'incapacité à établir les bases génétiques des troubles neurologiques comme la DI et les MN représente un problème clinique attribuable à l'administration de tests effractifs inutiles, à l'absence d'information pronostique et de conseils en matière d'amélioration de la qualité de vie et d'initiation à des traitements bénéfiques (ou à l'accès limité à ces ressources) [De Ligt *et al.*, 2012; Romano, 2010; Stevenson et Carey, 2009; Shea, 2006; Moeschler et Shevell, 2006]. L'absence de facteur étiologique empêche de limiter la récurrence, le conseil reproductif et éventuellement, le diagnostic prénatal. De plus, le fait d'obtenir une explication a souvent des répercussions importantes chez la personne concernée et sa famille [Willemsen et Kleefstra, 2014; Flore et Milunsky, 2012].

Le séquençage de l'exome s'est avéré utile depuis son introduction en recherche pour déterminer la cause de maladies mendéliennes au sein de familles, chez plusieurs sujets présentant un même phénotype et même chez des patients uniques [Need *et al.*, 2012; Vissers *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2009]. Toutefois, peu d'études publiées à ce jour visent l'application clinique de cette technologie, la plupart examinant plutôt la faisabilité d'une implantation de l'approche en clinique. Ces études sont souvent effectuées sur des cohortes restreintes, hautement sélectionnées et pour lesquelles les approches diagnostiques traditionnelles ont échoué dans la détermination de l'étiologie. Elles ont souvent pour but la découverte de nouveaux gènes, l'applicabilité étant généralement évaluée de façon secondaire. Toutefois, fait intéressant, Topper et ses collaborateurs soulignaient déjà, en 2011, que le séquençage de l'exome avait eu des répercussions majeures sur la découverte des gènes en cause dans la DI.

5.1.3 Valeur thérapeutique

La valeur thérapeutique associée au séquençage de l'exome est limitée, les mutations et les gènes dans lesquelles elles se produisent sont hautement hétérogènes et constituent rarement une cible thérapeutique. Dans deux études de séquençage d'exomes évaluant 218 personnes atteintes d'une DI moyenne à grave, De Ligt et Dixon-Salazar et leurs collègues [2012] rapportent, chez 4 patients, la détection de mutations dans des gènes sur lesquels ils ont été en mesure d'agir.

Récemment, chez 18 patients provenant de 13 familles, Foley et ses collègues [2014] ont rapporté avoir repéré des mutations dans le gène *SLC52A2* qui seraient à l'origine du syndrome Brown-Vialetto-Van Laere (OMIM 211530), maladie neurodégénérative incurable. Ils ont démontré que les mutations réduisent la captation de la riboflavine et l'expression de sa protéine de transport. La prise de doses élevées de riboflavine chez 16 patients porteurs de ces mutations a permis une amélioration clinique et biochimique significative dans 2 cas et une réponse clinique préliminaire dans 13 cas.

Certains groupes rapportent également que la détection de mutations causales par séquençage de l'exome a mené à la révision du diagnostic chez plusieurs patients qui avaient des présentations atypiques. Actuellement, la valeur thérapeutique de l'analyse ne peut être évaluée que sur une base individuelle en fonction la maladie et du gène touché.

5.2 Validité clinique

Le séquençage de l'exome permet la recherche de l'étiologie génétique de maladies phénotypiquement complexes ou mettant en cause de multiples gènes dont certains peuvent être inconnus. Cette approche peut être utilisée dans un contexte de maladie à transmission héréditaire ou de cas sporadiques (de mutations *de novo*). Des mutations liées au chromosome X, à transmission autosomale récessive, autosomale dominante et de mosaïcisme somatique, ont été détectées à l'aide du séquençage de l'exome [Choi *et al.*, 2011; Lindhurst *et al.*, 2011; O'Roak *et al.*, 2011; Bilgüvar *et al.*, 2010; Choate *et al.*, 2010; Vissers *et al.*, 2010]. Dans leur ensemble, les résultats des diverses études suggèrent que cette approche peut contribuer de façon significative à la résolution de l'étiologie de maladies diverses [entre autres : Gonzaga-Jauregui *et al.*, 2012; Bamshad *et al.*, 2011; Gilissen *et al.*, 2011].

Toutefois, plusieurs auteurs soulignent les difficultés liées à l'implantation du séquençage de l'exome dans un cadre clinique. Le séquençage de gènes ciblés, selon l'approche de Sanger, est un type d'analyse courant dans les laboratoires diagnostiques. Dans ce cadre restreint, il mène à la détection d'un faible nombre de variants par gène ciblé. Les variants observés peuvent être jugés causaux et contribuer à un diagnostic précis. En l'absence de données scientifiques suffisamment étayées, d'autres variants peuvent être déclarés « potentiellement causaux », alors que le rôle d'autres variants peut être incertain ou inconnu. L'analyse de l'exome de chaque sujet révèle environ de 20 000 à 30 000 variants particuliers. Environ 90 % des variants se retrouvent chez plus de 5 % de la population et il se peut qu'ils ne soient pas directement en cause dans les maladies qui pourraient être investiguées, mais chaque personne est porteuse de plus de 76 à 190 variants faux-sens délétères et de jusqu'à 20 mutations responsables de la perte de fonction complète de la protéine produite ou associée à des maladies (non-sens dans les sites d'épissage ou résultant en un changement de cadre de lecture) [Liu *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2012; MacArthur *et al.*, 2012; The 1000 Genomes Project Consortium, 2012]. L'imputabilité de la maladie à un ou à plusieurs variants peut donc être complexe.

De plus, les banques de données dans lesquelles sont colligées les différents variants et leurs associations à des maladies sont nombreuses (environ 2 000) et comportent fréquemment des erreurs (plus de 25 % d'erreurs) [Kenna *et al.*, 2013; Marshall, 2013; Bell *et al.*, 2011]. Récemment, Marshall [2013] et Brownstein et ses collègues [2014] rapportent deux études indépendantes dont le but était de comparer les résultats d'analyse et d'interprétation de séquençage d'exome et de génome, respectivement, effectuées dans 33 centres. Les participants devaient déterminer, à partir de spécimens communs, l'étiologie génétique des maladies. Malgré un consensus général sur les processus d'analyse et d'interprétation, les variants causaux repérés étaient majoritairement discordants. En effet, la fonction et l'association de la plupart des gènes du génome aux diverses maladies est peu connue, facteur qui contribue à la discordance. Les chercheurs doivent fréquemment se tourner vers les données de patrons d'expression, de conservation des résidus, de prédiction de structure de la protéine, d'études *in vitro* et *in vivo* et d'autres outils variés pour évaluer l'importance et le rôle possible d'un gène et de ses variants dans la maladie. La caractérisation de chacun des variants candidats devient rapidement un processus lourd et difficile dans ce contexte.

Malgré ces lacunes, l'*American College of Medical Genetics* (ACMG) est d'avis que les bénéfices du séquençage de l'exome dépassent les risques dans certaines conditions (se reporter à la section 5.4 portant sur les recommandations d'autres organismes).

Déficiences intellectuelles

L'étiologie génétique demeure inconnue chez 50 % à 60 % des patients atteints de DI suivant les examens diagnostiques recommandés actuellement (CGH, caryotype, FISH, MPLA et approches de gènes ciblés) [Willemsen et Kleefstra, 2014; De Ligt *et al.*, 2012]. Quelques études effectuées dans le cadre de projets de recherche de nouveaux gènes associés à la DI ont permis de démontrer que le séquençage de l'exome permet la détection d'étiologies jusque-là inconnues malgré des recherches approfondies chez un nombre significatif de patients.

Le CHU Ste-Justine a débuté un projet-pilote dans le cadre duquel les chercheurs ont analysé l'exome de 70 cas de maladies rares. De ce groupe, 49 patients présentaient une déficience intellectuelle. Leur rendement diagnostique global est de 36 % (25/70) et de 37 % (18/49) chez les cas de DI.

Maladies neurodégénératives

La littérature actuelle révèle que l'utilisation du séquençage de l'exome pour déterminer l'étiologie génétique des MN est largement restreinte aux formes de troubles neurologiques familiaux dans un contexte de découverte de nouveaux gènes. Par exemple, le séquençage d'exomes a permis, chez des patients atteints d'une forme familiale de la maladie de Parkinson, une association avec les gènes *EIF4G1* et *VPS35* [Chartier-Harlin *et al.*, 2011; Vilariño-Güell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011]. Guerreiro et ses collaborateurs [2011] ont relié des mutations dans *Notch3* à certains cas familiaux de la maladie d'Alzheimer. De même, Ramagopalan et ses collègues [2011] ont repéré des variants rares dans *CYP27B1* au sein d'une cohorte de patients aux prises avec la sclérose en plaques.

Aucune étude d'implantation, de rendement ou de validation clinique propre aux maladies neurodégénératives n'a été repérée.

Découvertes fortuites

En attente d'une recommandation du Collège canadien de généticiens médicaux (CCMG), le demandeur a établi une ligne de conduite concernant les trouvailles fortuites selon laquelle :

- dans tous les cas, les trouvailles fortuites n'ayant pas d'effet connu sur la santé selon les connaissances actuelles ne sont pas divulguées;
- dans la population pédiatrique, les découvertes fortuites ne sont rapportées que lorsque la mutation est associée à un effet connu sur la santé pendant l'enfance ou l'adolescence; celles qui n'ont de conséquence qu'à l'âge adulte ne sont pas divulguées;
- dans la population adulte, les patients décident s'ils désirent recevoir les résultats fortuits qui peuvent avoir un effet connu sur leur santé selon les connaissances actuelles, effet pour lequel il existe un traitement ou une surveillance préventive.

Tableau 2 Études de validation clinique

AUTEUR	PLATEFORME NGS/TROUSSE D'ENRICHISSEMENT	COUVERTURE/ PROFONDEUR	PHÉNOTYPE	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE MUTATION/NOMBRE DE PATIENTS	TYPE DE MUTATION	% RÉSOLUTION	INVESTIGATIONS PRÉALABLES NÉGATIVES
Vissers, 2010	Solid3	90 %/10X	DI modérée à grave	10 trios	10/8 : 3 mutations connues et 4 dans des gènes ayant un rôle neurodéveloppemental	<i>De novo</i>	30	Caryotype/CGH/antécédents familiaux
Need, 2012	HiSeq 2000/SureSelect Human All Exon 50 Mb, Agilent	88 %/71X	DI ou délai développemental	12 trios	6 causaux + 1 suggestif	<i>De novo</i>	50	Micropuce (Affimetrix 6.0)
Najmabadi, 2011	Agilent SureSelect et séquençage par Illumina Genome Analyser		DI	136 familles	23 gènes connus 50 gènes inconnus	Héréditaire/homozygote		
De Ligt, 2012*	SOLiD 4/SureSelect Human All Exome Kit, version 2, 50 Mb, Agilent		DI avec QI <50	100 trios	79 mutations (53 patients) 18 dans des gènes connus (16 patients)	<i>De novo</i>	16	Investigation clinique et dépistage génétique
Rauch, 2012	HiSeq 2000/Sure Select XT Human, Agilent	90 %/20X	DI avec QI <60	51 patients	16 variants dans des gènes déjà associés avec la DI 6 mutations candidates	<i>De novo</i>	31	Absence d'anomalies chromosomiques majeures
Dixon-Salazar, 2012	GAllx ou HiSeq200/SureSelect Human All Exome 50 Mb, Agilent	96 %/10X	Délai développemental	118 patients	Une mutation dans un gène associé à la maladie détectée dans 10 cas (8 %). Dans 19 % des cas (22 patients), une ou des mutations repérées dans 22 autres gènes non associés jusqu'à présent, mais dont les mutations ségrégaient avec le phénotype.	Familiale récessive	27	Étiologie génétique

Schuurs-Hoeijmakers, 2013	SOLiD 4/SureSelect All Human Exome 50 Mb, Agilent			19 familles	8 gènes; 3 ayant déjà été associés à des cas de DI et 5 ayant un potentiel pathogénique.		16	Caryotype et CGH
Yang, 2013	Illumina Genome Analyzer IIX Platform (Illumina) et HiSeq 2000	95 %/20X Couverture moyenne de 130X	Varié (80 % de troubles neurologiques)	250 patients	86/62	De novo Autosomale dominante ou récessive	25	Commentaire : découvertes fortuites chez 30 des 250 patients testés par séquençage de l'exome.

Abréviations : CGH : hybridation génomique comparative (*comparative genomic hybridization*); DI : déficience intellectuelle; NGS : séquençage de nouvelle génération (*new generation sequencing*).

*Les chercheurs ont décrit la sensibilité clinique à l'aide du séquençage de l'exome comme étant le taux de rendement ou de résolution de l'étiologie génétique. Hautement variable d'une étude à l'autre, elle a été évaluée entre 16 et plus de 60 %.

Tableau3 Tableau synoptique de la 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)

La détection sensible et spécifique des variants génétiques à l'origine de maladies nécessite une validation de l'ensemble des étapes du processus analytique, de l'extraction du matériel génétique à l'analyse bio-informatique des variants [Rehm *et al.*, 2013; Gargis *et al.*, 2012]. L'approche utilisée doit optimiser l'uniformité de la couverture, la profondeur de lecture et la qualité des séquences et permettre l'élimination d'un maximum de variants non causaux sans éliminer ceux qui sont responsables de l'étiologie.

Il est intéressant de noter que la technologie du séquençage de l'exome est en évolution rapide. Des chimies et des technologies sont modifiées fréquemment pour assurer une meilleure performance en matière de couverture, de rapidité et d'adaptabilité du séquençage pour les diverses applications. Plusieurs études ayant pour but de comparer les performances des différentes plateformes de séquençage, des trousse de capture des exomes ont été initialement effectuées lors de la mise en marché des différents outils liés au séquençage NGS. Toutefois, il y a peu d'études formelles des mises à jour ou de versions optimisées dans la littérature. Les études originales ayant rapporté la preuve de concept, les laboratoires responsables des analyses doivent valider les paramètres de performance des diverses composantes de leur plateforme.

Validité de la plateforme HiSeq2500

L'utilité et la validité de chacune des plateformes de séquençage NGS ont été rapportées au cours des dernières années dans le cadre de validation technique, d'études étiologiques de différentes maladies et de leur implantabilité dans le milieu clinique.

Les demandeurs prévoient utiliser la plateforme HiSeq 2500 d'Illumina pour réaliser leurs analyses. Cette plateforme constitue une mise à jour de la plateforme HiSeq 2000 à la différence qu'elle peut accommoder un nombre inférieur d'échantillons et fonctionner en mode rapide.

Le tableau 4 résume quelques études comparatives soulignant la performance du HiSeq2000.

Tableau 4 Résumé de quelques études comparatives de plateformes NGS récentes

ÉTUDE	TYPE D'ÉCHANTILLON (NOMBRE)	TYPE D'ANALYSE	CRITÈRES ÉVALUÉS	COMMENTAIRE
Quail, 2012	4 génomes bactériens (contenu GC de 19,3 % à 67,7 %)	Génome entier (profondeur de lecture de 15X)	Taux d'erreurs : < 0,26 Spécificité : 99,9 % (Q30) Sensibilité : 68 % à 76 % des SNP détectés	Les logiciels d'analyses étaient ceux du fabricant. Une partie de la variabilité observée pourrait provenir de cette composante.
Sivakumaran, 2013	ADN humain (8)	Panel de 24 gènes lié à la perte d'audition (profondeur de lecture 40X)	Spécificité : 99,99 % Sensibilité : 100 % Concordance : > 99,99 %	▪ Étude comparative de 29 % des régions avec les résultats de séquençage par l'approche de Sanger. ▪ L'approche permet la détection de SNP et d'indels (jusqu'à 22 nucléotides). ▪ Analyse des séquences par le programme NextGENe.
Sule, 2013	ADN humain (10)	Panel de 34 gènes associés à une densité osseuse faible ou élevée (profondeur de lecture moyenne de 900X)	Sensibilité : 100 % chez les 6 patients connus. Chez 4 autres patients, détection de mutations causales jusque-là inconnues et confirmées par la méthode de Sanger.	▪ Une faible couverture était observée quant aux gènes ayant des paralogues et aux régions riches en GC. ▪ Analyse des séquences par le programme NextGENe.
Umbarger, 2014	ADN humain (194 lignées immortalisées (Coriell*) et 55 échantillons extraits à partir de sang total)	Panel de 15 gènes	Spécificité : > 99,99 % Sensibilité : 99,97 % pour SNV; 95,3 % pour indels Reproductibilité : Taux de concordance : 0,999997. Coefficient de corrélation de Pearson : 0,868	▪ Les génotypes observés par NGS et comparés avec les données du HapMapProject et les discordances étaient évalués par séquençage de Sanger. ▪ Analyse des séquences par les programmes Burrows-Wheeler Aligner (version 0.5.7) et GATK (version 1.0.5083).

Abréviations : ADN : acide désoxyribonucléique; GC : guanine-cytosine; NGS : séquençage de nouvelle génération (*new generation sequencing*); Q : score de qualité indiquant la probabilité d'erreur; SNP : polymorphisme mononucléotidique (*single nucleotide polymorphism*); SNV : variant mononucléotidique (*single nucleotide variant*).

* Coriell Cell Repositories, Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA)

Une seule étude d'évaluation de la performance de la plateforme HiSeq2500 a été repérée. Linderman et ses collègues [2014] ont validé plusieurs paramètres de performance de leur plateforme constituée de la trousse de capture de l'exome SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 de Nimblegen, du HiSeq 2500 et de leur pipeline bio-informatique basé sur celui du projet *1000 Genomes*. Le séquençage de cinq échantillons d'ADN humain (obtenus du *Coriel Institute for Medical Research*) a été effectué. Les résultats obtenus ont été comparés aux génotypes obtenus par micropuce Human Omni2.5 BeadChip (Illumina) dans un test maison, aux données obtenues dans le cadre du projet *1000 Genomes* et de l'*International HapMap Project*. Les auteurs ont choisi une profondeur de lecture de 20X pour évaluer les paramètres de performance.

Reproductibilité et répétabilité

La concordance entre les réplicats de séquençage intra- ou inter-essai est d'environ 89,5 % pour ce qui est des insertions/délétions (indels) et de 97,9 % pour ce qui est des variants d'un nucléotide (SNV).

Sensibilité

La concordance des génotypes observés entre les micropuces, les données du projet *1000 Genomes* et *HapMap* et le séquençage de l'exome est supérieure à 97 %. Toutefois, la capacité à détecter des variants pathogéniques a été évaluée à environ 92 % à 93 %.

Tableau 5 Tableau synoptique de la validité analytique du HiSeq

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		

Validité de la trousse de capture des exons

La caractérisation analytique de différentes troussees utilisées pour effectuer la capture de l'exome a fait l'objet de quelques études de caractérisation et études comparatives.

Asan et ses collaborateurs [2011] ont évalué la performance des troussees Human Exome 2.1 M Array et SeqCapEZ (v 1.0) de Nimblegen et de la trousse *SureSelect Human All Exon Kits* d'Agilent. Pour ce faire, le séquençage de l'exome d'un échantillon d'ADN de la lignée immortalisée du sujet séquencé lors du projet *YanHuang whole-genome sequencing analysis*¹⁰⁶ a été effectué suivant la capture en duplicata de l'exome par chacune des troussees. La plateforme de séquençage utilisée était le HiSeq2000.

Régions ciblées

La compilation des données faisant partie des bases de données de CCDS (27 mars 2009),

¹⁰⁶ YanHuang Project [site Web], disponible à : <http://yh.genomics.org.cn/>.

refGen (21 avril 2009) et EnsemblGen ont permis de déterminer que *SureSelect* peut cibler environ 1 100 gènes supplémentaires, comparativement aux trousse de Nimblegen, soit 17 199 gènes codant constituant 80,6 % des séquences codantes contre 16 188 gènes (75,9 %).

Une compilation similaire effectuée à l'aide des gènes contenus dans les banques de données de *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM; 10 mars 2011), de la *Human Gene Mutation Database* (HGMD; Professional 2009.2), du *Genome-Wide Association Study* (GWAS; 3 March 2011) et du projet de *Cancer Genome* (CGP; 1^{er} décembre 2010) a permis d'observer que la trousse d'Agilent ciblait 4 871 gènes (86 %), alors qu'en comparaison, Nimblegen en ciblait 4 642 (83 %).

Couverture

Les trois trousse couvrent 98 à 99 % de leurs régions ciblées à faible profondeur de lecture. Le niveau de couverture chute de façon importante lorsqu'un critère de profondeur de lecture de 10X à 50X est appliqué. À ce niveau, la trousse d'Agilent couvre 59 % des régions ciblées.

Sensibilité

La sensibilité des trousse a été évaluée à différentes profondeurs de lecture en comparaison avec les résultats obtenus par séquençage du génome entier :

À 10X (Q30), Nimblegen avait une sensibilité > 83 % alors que la trousse d'Agilent démontrait une sensibilité d'environ 77 %.

De 20 à 50X, la sensibilité de la trousse d'Agilent se situait entre 64 % et 85 %.

Spécificité

À une profondeur de lecture de 30X, 99,88 % des sites homozygotes étaient détectés de façon spécifique contre 99,7 % des sites hétérozygotes.

Répétabilité

Un coefficient de corrélation supérieur à 0,65 quant à la couverture et supérieur à 0,90 en ce qui a trait à la profondeur de lecture sont obtenus lors de l'évaluation de la reproductibilité intraplateforme.

Biais

Les auteurs ont rapporté que les trois trousse démontrent un biais en présence de contenu en GC < 20 % ou > 75 %. Un biais de capture favorisant l'allèle de référence est également observé.

Parla et ses collègues [2011] ont évalué les premières versions des trousse de *SeqCap EZ Exome Library SR* de Nimblegen et *Sure Select Human All Exon Kit* d'Agilent en effectuant le reséquençage de deux trios (père, mère, enfant) caractérisés dans le projet *1000 Genomes*. L'ADN a été obtenu à partir de lignées cellulaires (*Coriell Cell Repositories*) et les séquences ont été analysées sur le *Genome AnalyzerIIx* (Illumina). La séquence de référence utilisée était le *human hg18 reference* et c'est le *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) qui a réalisé l'alignement des séquences.

Régions ciblées

La trousse d'Agilent couvre 98,3 % des séquences de la base de données CCDS par rapport à 89,8 % pour celle de Nimblegen.

Couverture

La trousse de NimbleGen assure la couverture de 86,58 % à 88,04 % des séquences de la base de données CCDS à une profondeur de lecture de 1X alors que *SureSelect* permet de couvrir de 95,94 % à 96,11 % des séquences. À une profondeur de lecture de 20X et en optimisant la quantité de données générées, la couverture des séquences étaient de 85,81 % à 85,98 % dans le cas de Nimblegen et entre 90,16 % et 90,59 % pour ce qui est d'Agilent.

Profondeur de lecture

Nimblegen couvre l'exome avec une profondeur moyenne entre 61X et 93X, comparativement à 39 à 53X pour ce qui est d'Agilent.

Sensibilité

Une sensibilité supérieure à 97 % a été évaluée en comparant les SNP obtenues au séquençage avec ceux repérés par l'*International HapMap Project* et le projet *1000 Genomes*.

Spécificité

La spécificité des données générées à l'aide des trousse a été évaluée > 99,9965 %, en comparaison avec *1000 Genomes*, alors qu'elle était > 99,35 %, comparativement au *HapMap*.

Sulonen et ses collaborateurs [2011] ont effectué une étude comparative de la trousse *SureSelect All Exon*, de sa version mise à jour, du Human All Exon 50Mb (Agilent) et de la trousse *SeqCap EZ Exome* de Nimblegen et de sa version 2.0. La plateforme de séquençage utilisée était le GAIIx (Illumina). La séquence de référence humaine utilisée était hg19 (GRCh37).

Régions ciblées

SureSelect et *SureSelect 50Mb* d'Agilent ciblaient respectivement 274 264 et 300 040 exons couvrant 20 699 et 23 031 gènes, alors que les trousse de Nimblegen, *SeqCap* et *SeqCap v2* ciblaient 252 479 et 298 304 exons provenant de 18 865 et 23 028 gènes.

Couverture

Les séquences couvertes par les trousse (v1) d'Agilent et de Nimblegen représentaient respectivement 81,4 % et 84,4 % de la séquence de référence hg19 (GRCh37). Les deuxièmes versions des trousse couvraient 94,2 % (Agilent) et 75,3 % (NimbleGen) de hg19.

À une profondeur de lecture de 20X, 69,4 % des bases étaient couvertes avec *SureSelect* comparativement à 78,8 % pour ce qui est de Nimblegen. Les versions mises à jour ont permis une couverture de 60,3 % et de 81,2 %, respectivement.

Concordance

Les SNP repérés par séquençage ont été validés à l'aide d'une micropuce *Human660W-Quad v1 SNP* (Illumina). La concordance des génotypes était de 97,44 %, 98,75 %, 97,25 % et

99,39 %, respectivement, quant aux versions 1 et 2 des trousse d'Agilent, et aux versions 1 et 2 de Nimblegen.

Clark et ses collaborateurs [2011] ont comparé les performances du *SeqCap EZ Exome Library v2.0* de Nimblegen, du *SureSelect Human All Exon 50Mb* d'Agilent et du *TruSeq Exome Enrichment* d'Illumina à l'aide de l'ADN d'un échantillon de sang et du HiSeq2000. L'alignement des séquences a été effectué à l'aide du BWA et l'analyse des variants, au moyen du GATK.

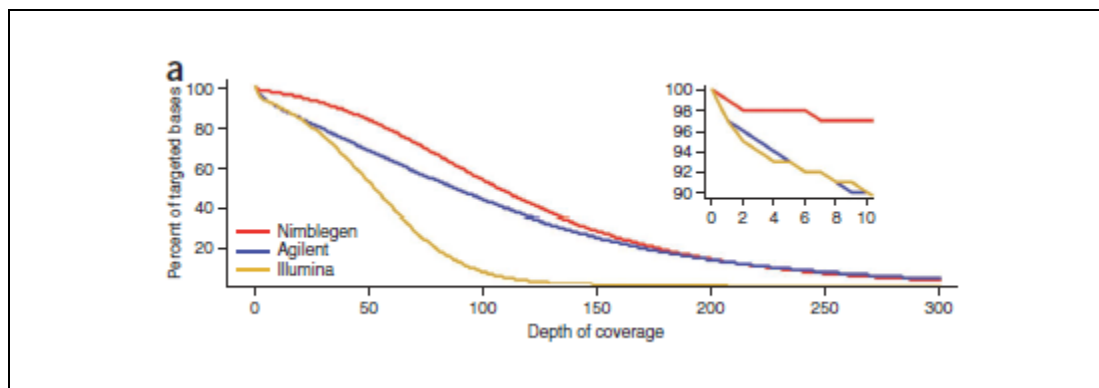
Efficacité de capture

L'efficacité de capture a été évaluée en mesurant la couverture de l'ensemble des bases lues. Nimblegen permettait la lecture de 98,6 % des bases ciblées au moins une fois, alors que 96,8 % étaient lues au moins 10 fois. L'utilisation de la trousse d'Illumina permettait la lecture de 97,1 % des bases au moins une fois et de 90,0 % à 10X. Agilent permettait la lecture de 96,6 % des bases à 1X et de 89,6 % à 10X.

Couverture

La figure ci-dessous illustre la profondeur de lecture en fonction du nombre de bases séquencées.

Figure 1 Profondeur de lecture en fonction du nombre de bases séquencées



Tirée de Clark *et al.*, 2011.

Concordance

Les SNP observés ont été validés à l'aide de la micropuce *Human 1M-Duo SNP* (Illumina). Le niveau de concordance était de 99,3 % pour ce qui est d'Agilent, de 99,5 % en ce qui a trait à Nimblegen et de 99,2 % pour Illumina.

Type de mutations détectées

Les mutations détectées comprenaient de petites indels, de taille variant de -84 à +18 bases.

Des études de validation plus récentes et utilisant les dernières versions des trousse n'ont pu être relevées dans la littérature. Toutefois, la version 5 de la trousse *SureSelect* d'Agilent est maintenant disponible. La compagnie rapporte que 21 522 gènes (375 999 exons) sont désormais couverts par leur stratégie basée sur les données de CCDS, RefSeq, Gencode, MiRbase, TCGA et UCSC.

Tableau 6 Tableau synoptique de la validité analytique de la trousse de capture

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 générale de l'analyse par le demandeur

Dans le cadre de ses activités de recherche, de projets pilotes et de ses activités cliniques, le demandeur a effectué le séquençage de l'exome de plus de 1 000 échantillons de recherche et 100 échantillons cliniques.

Couverture des cibles

Selon l'expérience du demandeur, 98 % et 95 % des exons sont couverts, avec une profondeur de lecture minimale respective de 10 et 20X, si la trousse *SureSelect v4* d'Agilent est utilisée.

Le demandeur mentionne qu'il élabore actuellement une structure bio-informatique de panel de gènes dans le cadre duquel, pour chaque maladie investiguée, seuls les variants retrouvés dans des gènes associés seront évalués. La présence d'une couverture insuffisante pour certaines régions sera signalée au clinicien pour investigation diagnostique subséquente, au besoin.

Profondeur de lecture

Une profondeur de couverture moyenne de 137 X est observée.

Spécificité

Le demandeur a évalué la spécificité de son approche en séquençant, selon l'approche de Sanger, 128 variants observés par NGS. Aucun faux-positif n'a été détecté.

Trousse de capture d'exome v5

Selon plusieurs collaborateurs du demandeur, la version v5 de la trousse de capture d'Agilent offre une meilleure couverture des exons que la version précédente. Le demandeur valide actuellement cette dernière version.

Contrôle de la qualité externe

Il n'existe actuellement aucun programme de contrôle de la qualité externe pour l'exome clinique. Le demandeur planifie de procéder à des échanges d'échantillons avec le *Medical Genetics Laboratories* de Baylor pour contrer cette lacune. Baylor utilise une stratégie de séquençage et d'analyse similaire à celle du demandeur.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Dans une déclaration de principes émise en 2012¹⁰⁷, l'ACMG propose que le séquençage de l'exome (et du génome) devrait être envisagé chez un sujet atteint :

- Lorsque le phénotype ou les antécédents familiaux suggèrent une étiologie génétique sans que le phénotype ne corresponde à un trouble précis associé à un gène cible pouvant être testé en clinique.
- Lorsque le patient présente un trouble génétique possédant une grande hétérogénéité génétique qui rend une approche par séquençage de l'exome ou du génome plus sensée que l'analyse successive de plusieurs gènes.
- Lorsqu'un patient possède les caractéristiques cliniques suggérant un trouble génétique mais dont les analyses génétiques disponibles pour ce phénotype n'ont pas permis d'obtenir de diagnostic.
- Lorsqu'un diagnostic n'a pu être obtenu chez un fœtus présentant probablement un trouble génétique.

En mars 2013, l'ACMG a finalisé ses recommandations portant sur le processus de rapport de découvertes fortuites lors de séquençage de l'exome. Dans ce cadre, ils recommandent que certaines découvertes fortuites doivent être rapportées pour le bénéfice clinique du patient et de sa famille. Ils vont plus loin en recommandant que les variants liés à certaines conditions médicales soient activement recherchés. Les recommandations du CCMG à ce sujet devraient être émises en 2014.

De plus, un certain nombre d'experts et d'organismes nationaux et internationaux (ACMG, CAP, CCMG, CDC, CMGS, etc.) ont mis de l'avant certaines recommandations relatives à la méthodologie et aux considérations lors de l'implantation du séquençage de nouvelle génération dans le milieu diagnostique, à l'assurance de la qualité liée à l'utilisation de cette technologie et à la mise en place de critères d'interprétation.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effets sur les ressources matérielles et humaines

Des coûts significatifs sont reliés à l'acquisition, à la validation et au maintien d'une plateforme de NGS et des ressources informatiques (programmes d'analyses, capacité de stockage de données) nécessaires à son utilisation. Il est primordial de disposer d'un personnel spécialisé ayant accès à des ressources mises à jour régulièrement et à une formation initiale et continue appropriées pour analyser et interpréter les résultats générés.

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

L'analyse de séquençage de l'exome n'en remplace aucune autre. Elle représente donc un coût additionnel pour le système de santé sur le plan analytique. Dans une faible proportion des cas, la détermination de l'étiologie de la maladie permettra une intervention précoce, s'il y a lieu.

¹⁰⁷ American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Policy statement: Points to consider in the application of genomic sequencing [site Web]. Bethesda, MD : ACMG; 2012. Disponible à : https://www.acmg.net/StaticContent/PPG/Clinical_Application_of_Genomic_Sequencing.pdf.

Il est possible que l'analyse mène à des découvertes fortuites qui nécessiteront une prise en charge du patient afin d'assurer le traitement ou la surveillance accrue d'une autre maladie, inconnue jusque-là.

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

Le séquençage de l'exome (comme les autres approches par NGS) se situe à la frontière entre l'application diagnostique et la recherche fondamentale. Les mutations de pathogénicité variable, probable ou incertaine générées peuvent influencer les décisions cliniques et personnelles [Evans et Rothschild, 2012; Makrythanasis et Antonarakis, 2012]. À cet effet, certains organismes ont publié des recommandations à savoir si les découvertes fortuites doivent être rapportées ou lesquelles doivent être consignées. De plus, l'évolution rapide des connaissances actuelles exige que les fournisseurs d'une analyse comme celle proposée dans le cadre de cette demande, établisse également des règles encadrant la réanalyse *a posteriori* des résultats obtenus chez un patient.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

L'établissement de l'étiologie génétique des troubles neurologiques visés par la demande permet, dans certains cas, de confirmer le diagnostic, de contribuer à l'établissement d'un pronostic ou d'un traitement ou à limiter la multiplication des examens diagnostiques. Les résultats obtenus à l'aide de l'analyse étudiée pourraient également jouer un rôle dans certaines décisions de reproduction.

7.2 Validité clinique

Peu d'études de validation utilisant une approche de séquençage d'exome à des fins cliniques ont été repérées dans la littérature. Le séquençage de l'exome a le potentiel de changer les pratiques cliniques relatives aux maladies génétiques. Toutefois, il est nécessaire d'approfondir la connaissance sur la pathogénécité des variants [Rauch *et al.*, 2012]. L'avancement des connaissances scientifiques va permettre d'obtenir un taux de résolution supérieur.

7.3 Validité analytique

Le séquençage de l'exome est une technique ayant démontré une grande sensibilité analytique. Certaines régions demeurent toutefois impossibles à investiguer au moyen de cette approche. L'ACMG recommande de confirmer les variants observés par la technique classique de Sanger.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Pour l'instant, aucune recommandation sur l'utilisation de cette approche pour investiguer les cas de DI ou de MN n'a été mise de l'avant. Toutefois, un certain nombre d'experts et d'organismes nationaux et internationaux (ACMG, CAP, CCMG, CDC, CMGS, etc.) ont formulé certaines recommandations relatives à la méthodologie et aux considérations lors de l'implantation du séquençage de nouvelle génération dans le milieu diagnostique, à l'assurance de la qualité liée à l'utilisation de cette technologie et à la mise en place de critères d'interprétation.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Séquençage de l'exome dans l'exploration de la déficience intellectuelle et des maladies neurodégénératives

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 :
 - la validation sera terminée, surtout en ce qui concerne la structure informatique;
 - le mécanisme de contrôle de la qualité externe sera actualisé;
 - la conformité du laboratoire aux principes directeurs du MSSS sur l'« Organisation des services publics de diagnostic moléculaire, au Québec » sera assurée.

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 a beaucoup de potentiel sur le plan clinique, mais demeure encore expérimentale.

RÉFÉRENCES

- Al-Chalabi A, Kwak S, Mehler M, Rouleau G, Siddique T, Strong M, Leigh PN. Genetic and epigenetic studies of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013;14(Suppl 1):44-52.
- American Psychiatric Association (APA). DSM-IV-TR. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux : texte révisé. Paris, France : Masson; 2003.
- 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. *Nature Genet* 1999;23(2):185-8.
- Asan YX, Jiang H, Tyler-Smith C, Xue Y, Jiang T, Wang J, et al. Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms. *Genome Biol* 2011;12(9):R95.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011;12(11):745-55.
- Baroff GS. Predicting the prevalence of mental retardation in individual catchmen areas. *Ment Retard* 1982;20(3):133-5.
- 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.
- Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 2011;3(65)65ra4.
- Bilgüvar K, Oztürk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, Yalnizoğlu D, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature* 2010;467(7312):207-10.
- Bonnefond A, Durand E, Sand O, De Graeve F, Gallina S, Busiah K, et al. Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next-generation sequencing of the whole exome. *PLoS One* 2010;5(10):e13630.
- Brownstein CA, Beggs AH, Homer N, Merriman B, Yu TW, Flannery KC, et al. An international effort towards developing standards for best practices in analysis, interpretation and reporting of clinical genome sequencing results in the CLARITY Challenge. *Genome Biol* 2014;15(3):R53.
- Campeau PM, Kasperaviciute D, Lu JT, Burrage LC, Kim C, Hori M, et al. The genetic basis of DOORS syndrome: An exome-sequencing study. *Lancet Neurol* 2014;13(1):44-58.
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: Prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 1999;65(3):664-70.
- Carss KJ, Stevens E, Foley AR, Cirak S, Riemersma M, Torelli S, et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2013;93(1):29-41.

- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM, et al. Translation initiator *EIF4G1* mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89(3):398-406.
- Chiurazzi P et Oostra BA. Genetics of mental retardation. *Curr Opin Pediatr* 2000;12(6):529-35.
- Choate KA, Lu Y, Zhou J, Choi M, Elias PM, Farhi A, et al. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in KRT10. *Science* 2010;330(6000):94-7.
- Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, et al. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 2011;331(6018):768-72.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(45):19096-101.
- Clark MJ, Chen R, Lam HY, Karczewski KJ, Chen R, Euskirchen G, Butte AJ, Snyder M. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. *Nat Biotechnol* 2011;29(10):908-14.
- Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL, Warren ST. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet* 2009;85(4):503-14.
- 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.
- Coppodè F. Advances in the genetics and epigenetics of neurodegenerative diseases. *Epigenetics Neurodegener Dis* 2013;1(1):3-31.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL. FMR-1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001;3(5):359-71.
- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat* 2012;33(9):1340-4.
- 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.
- De Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005;77(4):606-16.
- Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpa N, Schroth J, Bielas S, Schaffer AE, et al. Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. *Sci Transl Med* 2012;4:138ra78.
- 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.
- Evans JP et Rothschild BB. Return of results: Not that complicated? *Genet Med* 2012;14(4):358-60.
- 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.

- Foley AR, Menezes MP, Pandraud A, Gonzalez MA, Al-Odaib A, Abrams AJ, et al. Treatable childhood neuronopathy caused by mutations in riboflavin transporter RFVT2. *Brain* 2014;137(Pt 1):44-56.
- Foo JN, Liu JJ, Tan EK. Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol* 2012;8(9):508-17.
- Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 2012;30(11):1033-6.
- Gbaya AA, Paquet M, Garand C. Les maladies neurodégénératives. Les maladies chroniques dans Lanaudière. Joliette, Qc : Agence de la santé et des services sociaux de Lanaudière; 2012. Disponible à : <http://www.santecom.qc.ca/bibliothequevirtuelle/Lanaudiere/9782923685892.pdf>.
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol* 2011;12(9):228.
- Gonzaga-Jauregui C, Gibbs L Jr, Richard A. Human genome sequencing in health and disease. *Ann Rev Med* 2012;63:35-61.
- Guerreiro RJ, Lohmann E, Kinsella E, Brás JM, Luu N, Gurunlian N, et al. Exome sequencing reveals an unexpected genetic cause of disease: NOTCH3 mutation in a Turkish family with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2011;33(5):1008.e17-23.
- Hamel BC, Smits AP, van den Helm B, Smeets DF, Knoers NV, van Roosmalen T, et al. Four families (MRX43, MRX44, MRX45, MRX52) with nonspecific X-linked mental retardation: Clinical and psychometric data and results of linkage analysis. *Am J Med Genet* 1999;85(3):290-304.
- 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.
- Inglese M et Petracca M. Imaging multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *Prion* 2013;7(1):47-54.
- Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A, Rao KW. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med* 2011;13(7):676-9.
- Kenna KP, McLaughlin RL, Hardiman O, Bradley DG. Using reference databases of genetic variation to evaluate the potential pathogenicity of candidate disease variants. *Hum Mutat* 2013;34(6):836-41.
- 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.

- Linderman MD, Brandt T, Edelmann L, Jabado O, Kasai Y, Kornreich R, et al. Analytical validation of whole exome and whole genome sequencing for clinical applications. *BMC Med Genomics* 2014;7:20.
- Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, et al. A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *New Engl J Med* 2011;365(7):611-9.
- Liu X, Han S, Wang Z, Gelernter J, Yang BZ. Variant callers for next-generation sequencing data: A comparison study. *Plos One* 2013;8(9):e75619.
- MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, Huang N, Morris J, Walter K, et al. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science* 2012;335(6070):823-8.
- Makrythanasis P et Antonarakis SE. High-throughput sequencing and rare genetic diseases. *Mol Syndromol* 2012;3(5):197-203.
- Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* 2010;7(2):111-8.
- 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.
- Marshall E. Biomedicine. NIH seeks better database for genetic diagnosis. *Science* 2013;342(6154):27.
- Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med* 2012;366(8):733-43.
- Metzker ML. Sequencing technologies—The next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11(1):31-46.
- 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.
- Modgil S, Lahiri DK, Sharma VL, Anand A. Role of early life exposure and environment on neurodegeneration: Implications on brain disorders. *Transl Neurodegener* 2014;3:9.
- Moeschler JB et Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006;117(6):2304-16.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 2011;478(7367):57-63.
- Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, Meisler MH, Goldstein DB. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 2012;49(6):353-61.
- Neveling K, Collin RW, Gilissen C, van Huet RA, Visser L, Kwint MP, et al. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2012;33(6):963-72.
- Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461(7261):272-6.

- O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* 2011;43(6):585-9.
- Parla JS, Iossifov I, Grabill I, Spector MS, Kramer M, McCombie WR. A comparative analysis of exome capture. *Genome Biology* 2011;12(9):R97.
- Parròn T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;256(3):379-85.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012;13:341.
- Ramagopalan SV, Dymment DA, Cader MZ, Morrison KM, Disanto G, Morahan JM, et al. Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70(6):881-6.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayer 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 SJL, réd. *Genetics of mental retardation: An overview encompassing learning disability and intellectual disability*. Vol. 18 of *Monographs in Human Genetics*. Bâle, Suisse : Karger; 2010 : 57-66.
- Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010;11:161-87.
- Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de Vondervoort 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.
- Shanks ME, Downes SM, Copley RR, Lise S, Broxholme J, Hudspith KA, et al. Next generation sequencing (NGS) as a diagnostic tool for retinal degeneration reveals a much higher detection rate in early-onset disease. *Eur J Hum Genet* 2012;21(3):274-80.
- Shea SE. Mental retardation in children ages 6 to 16. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13(4):262-70.
- Sellbach AN, Boyle RS, Silburn PA, Mellick GD. Parkinson's disease and family history. *Parkinsonism Relat Disord* 2006;12(7):399-409.
- 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.

- Sivakumaran TA, Husami A, Kissell D, Zhang W, Keddache M, Black AP, et al. Performance evaluation of the next-generation sequencing approach for molecular diagnosis of hereditary hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;148(6):1007-16.
- 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.
- Sule G, Campeau PM, Zhang VW, Nagamani SCS, Dawson BC, Grover M, et al. Next-generation sequencing for disorders of low and high bone mineral density. *Osteoporos Int* 2013;24(8):2253-9.
- Sulonen AM, Ellonen P, Almusa H, Lepistö M, Eldfors S, Hannula S, et al. Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome Biol* 2011;12(9):R94.
- The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491(7422):56-65.
- Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet* 2011;80(2):117-26.
- Turner EH, Ng SB, Nickerson DA, Shendure J. Methods for genomic partitioning. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009;10:263-84.
- Umbarger MA, Kennedy CJ, Saunders P, Breton B, Chennagiri N, Emhoff J, et al. Next-generation carrier screening. *Genet Med* 2014;16(2):132-40.
- 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.
- Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89(1):162-7.
- 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 M et Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet* 2014;85(2):101-10.
- Williams A. Defining neurodegenerative diseases. *BMJ* 2002;324(7352):1465-6.
- 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.
- Yankner BA, Lu T, Loerch P. 2008. The aging brain. *Annu Rev Pathol* 2008;3:41-66.
- Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero JF, Decouflé P, Hollowell JG. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. *Dev Med Child Neurol* 1997;39(3):142-9.

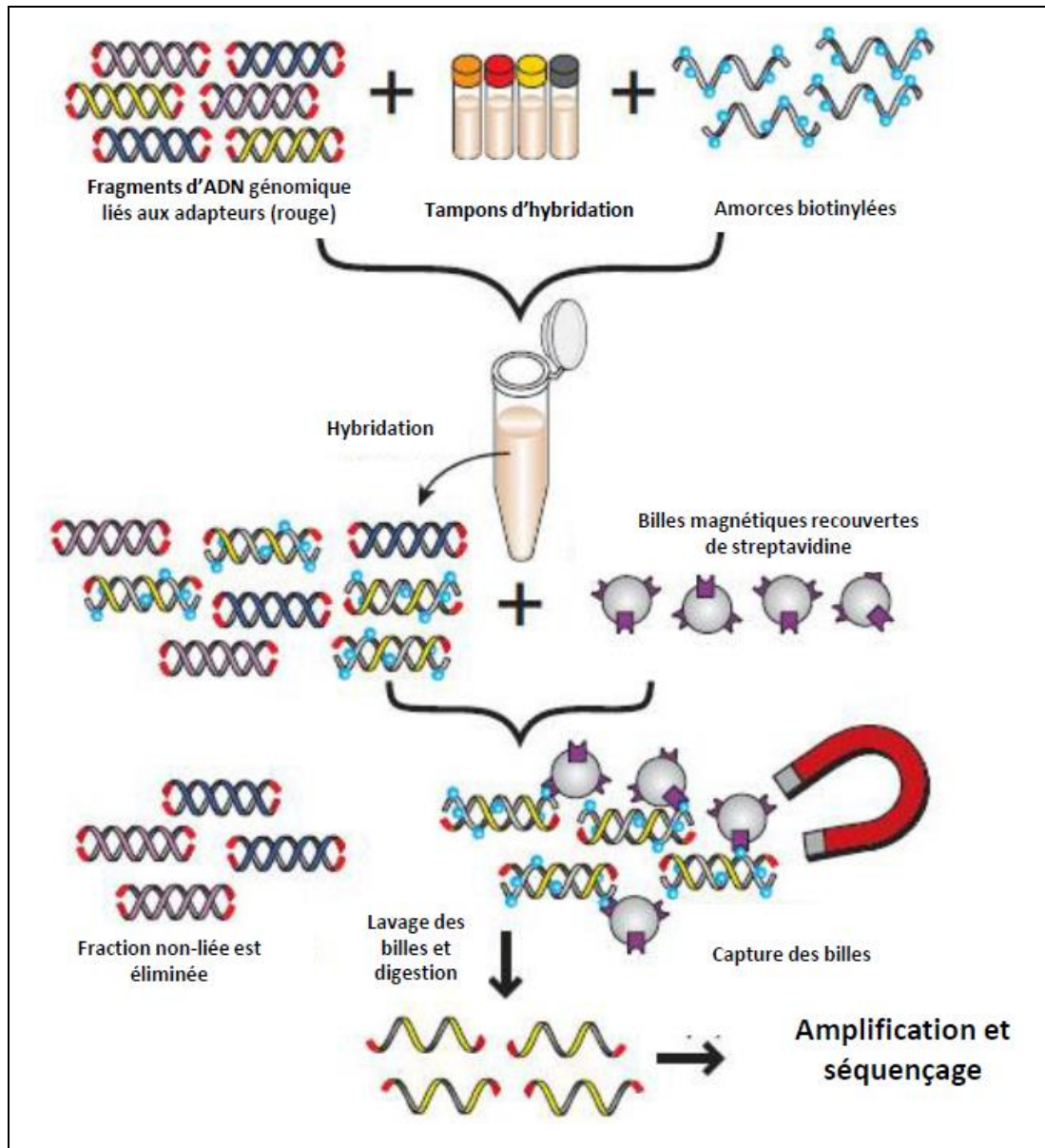
Zahir F et Friedman JM. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: A review of current technologies and their clinical utility. Clin Genet 2007;72(4):271-87.

Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN, et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. Am J Hum Genet 2011;89(1):168-75.

ANNEXE A.

Résumé de la procédure de capture des exons

Figure A1 Trousse SureSelect Human All Exon (Agilent)

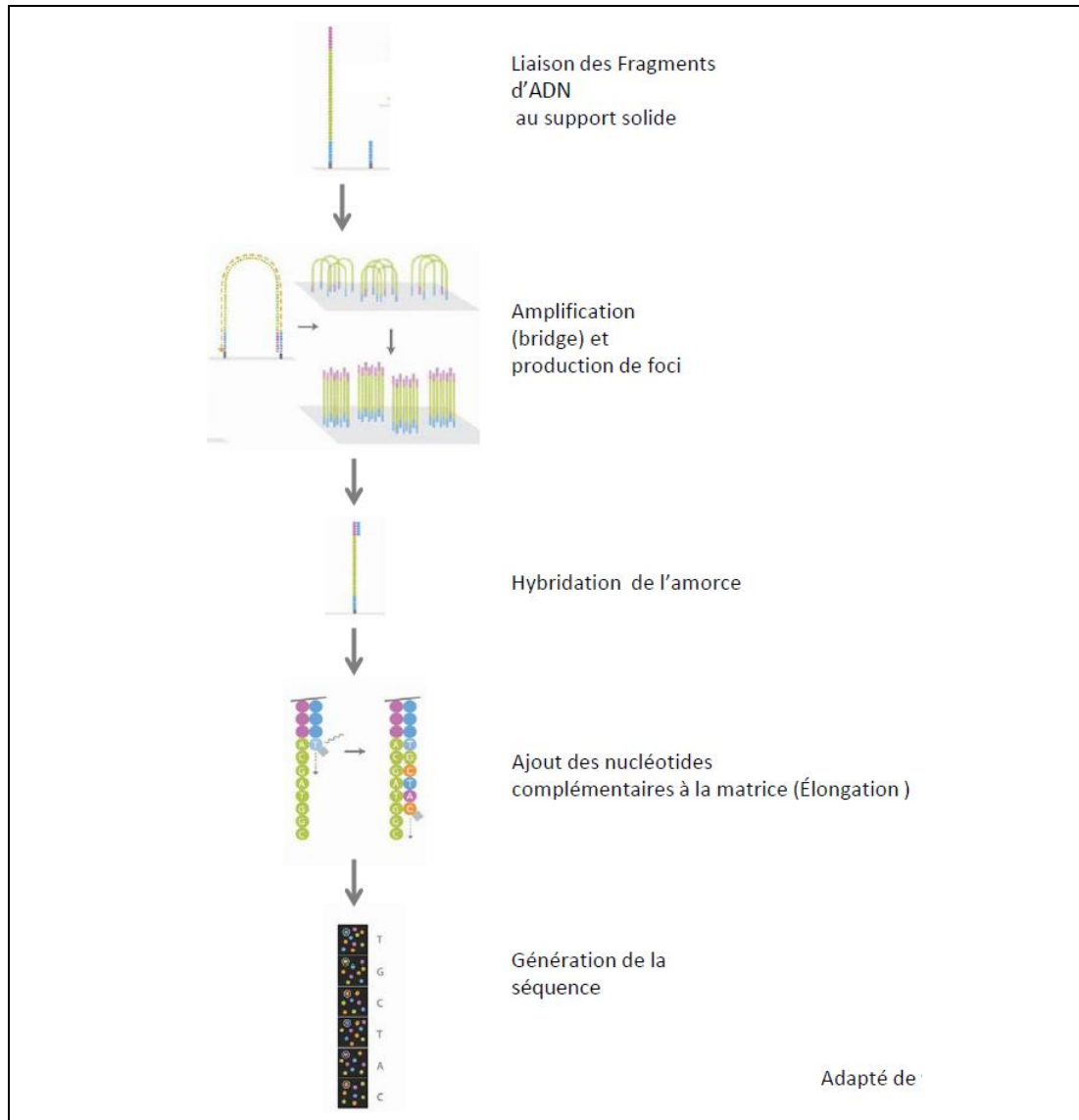


Adaptée de <https://www.genomics.agilent.com/>.

ANNEXE B

Séquençage de nouvelle génération

Figure B1 Technologie d'Illumina



Adaptée de <http://www.illumina.com>.

ANNEXE C

Balisage du séquençage de l'exome clinique

Critères de soumission d'un échantillon pour séquençage de l'exome. Document soumis par le demandeur

Nous proposons que les demandes de séquençage de l'exome clinique soient préalablement soumises au laboratoire pour approbation. Dans le cadre de ce processus de soumission, les cliniciens devront remplir un questionnaire qui vise à présenter le tableau clinique du patient, ses antécédents familiaux, et à résumer le bilan des investigations. Puis, un groupe d'experts qui comprend des médecins généticiens et des neurologues spécialisés dans les conditions neuro-développementales et neuro-dégénératives assurera la révision de ces demandes. Si la demande est approuvée, les cliniciens devront soumettre l'échantillon et le formulaire de consentement dûment rempli.

A. Retard de développement/déficiência intellectuelle

Au moins dans un premier temps, c'est un médecin généticien qui devra soumettre les demandes d'exome clinique pour l'indication de retard de développement/de déficiencia intellectuelle. Voici les critères de sélection :

- 1) retard global de développement/déficiencia intellectuelle modérée ou grave;
- 2) absence d'étiologie propre aux antécédents (p. ex. l'anoxie néonatale, l'exposition prénatale à l'alcool, l'antécédents familiaux pertinents par rapport au diagnostic étiologique déjà établi, etc.);
- 3) exploration phénotypique pertinente complétée (p. ex. l'imagerie cérébrale);
- 4) absence d'anomalies pathogéniques au CGH;
- 5) exclusion du syndrome du X fragile, s'il y a lieu;
- 6) absence d'un tableau clinique (p. ex. le syndrome monogénique particulier) qui pourrait faire l'objet d'une investigation ciblée se traduisant par un haut rendement diagnostique à un coût raisonnable.

B. Maladies neurodégénératives

Au moins dans un premier temps, un médecin généticien et un neurologue devront soumettre une demande conjointe d'exome clinique pour l'indication des maladies neurodégénératives. Voici les critères de sélection :

- 1) perte des acquisitions ou progression d'un symptôme neurologique particulier (sauf l'épilepsie);
- 2) exploration phénotypique pertinente complétée;
- 3) absence de diagnostic précis qui pourrait être exploré de façon efficace par un séquençage ciblé d'un ou plusieurs gènes;
- 4) exclusion de cas sporadiques de conditions neuro-dégénératives caractérisée par une plus grande complexité génétique (p. ex. la maladie de Parkinson).