

Avis

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

28 avril 2015

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. Il a été transmis au ministre le 27 février 2015.

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

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

Professionnels scientifiques

Frédéric Breton, B. Sc.

Faïza Boughrassa, M. Sc.

Andrée Fortin, Ph. D.

Nathalie Girard, Ph. D.

Éric Potvin, Ph. D.

Recherche d'information scientifique

Caroline Dion, MBSI, *bibl. prof.*

Mathieu Plamondon, MSI

Soutien documentaire

Micheline Paquin, *tech. doc.*

Édition

Responsable

Renée Latulippe

Coordination

Véronique Baril

Révision linguistique

Josianne Richard

Mise en page

Marie-Andrée Houde

Vérification bibliographique

Denis Santerre

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2015

Bibliothèque et Archives Canada, 2015

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF)

ISBN 978-2-550-73024-8 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2015

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 neuf analyses pour la mise à jour du Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale. Québec, Qc : INESSS; 2013. 170 p.

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

Responsabilité

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

Déclaration d'intérêts

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

COMITÉ SCIENTIFIQUE – ANALYSES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Président

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

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

Membres

Lambert Busque, M.D., FRCPC

- Hématologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Lorraine Caron

- Consultante en éthique

Guy Fink, Ph. D.

- Biochimiste clinique, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

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

- Anatomo-pathologiste, Hôtel-Dieu du CHUM

Annie-Claude Labbé, M.D., FRCPC

- Microbiologiste infectiologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

David Rosenblatt, M.D., FRCPC

- Pédiatre, généticien, Hôpital général de Montréal

François Rousseau, M.D., FRCPC

- Médecin biochimiste, CHU de Québec

Maude Saint-Jean, M.D.

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

Membre citoyen

Suzanne K. Bédard

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

LISTE DES ANALYSES

TABLEAU SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS.....	i
SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>GATA2</i> - SYNDROME MYÉLODYSPLASIQUE (RÉFÉRENCE – 2014.02.10)	1
QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY - LAC-SAINT-JEAN – RECHERCHE DE MUTATIONS (REFERENCE – 2014.03.02)	15
GÉNOTYPAGE HLA-A, B, C, DRB1 ET DQB1 EN HAUTE RÉOLUTION PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (RÉFÉRENCE – 2014.03.04).....	35
STATUT MUTATIONNEL DU <i>FGFR3</i> DANS LES CAS D’ACHONDROPLASIE-HYPOCHONDROPLASIE (EXONS 10 ET 13) ET DE DYSPLASIE THANATOPHORE DE TYPE I ET II (EXONS 7, 10, 15, 19) PAR SÉQUENÇAGE DE TYPE SANGER (RÉFÉRENCE – 2014.03.06)	54
RECHERCHE DE MUTATIONS CIBLÉES DU GÈNE <i>NRAS</i> DANS LES TUMEURS COLORECTALES MÉTASTATIQUES (EXONS 2, 3 ET 4 : CODONS 12, 13, 61 ET 146) (RÉFÉRENCE – 2014.03.07)	85
DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTINEURONAUX : ANTI-GANGLIOSIDES ET ANTI-MAG (2014.03.08).....	107
PROFIL SÉROLOGIQUE DE L’HÉPATITE AUTO-IMMUNE PAR LINEBLOT (RÉFÉRENCE – 2014.03.10)...	125
DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-ADAMTS-13 (RÉFÉRENCE - 2014.03.11)	146
RECHERCHE DE PROTOZOAIRES INTESTINAUX PAR PCR MULTIPLEX EN TEMPS RÉEL (RÉFÉRENCE 2014.03.12)	159

TABLEAU SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES-RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.02.10	SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>GATA2</i> - SYNDROME MYÉLODYSPLASIQUE	Établie	Avis de recommandation d'introduction.	
2014.03.02	QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY - LAC-SAINT-JEAN – RECHERCHE DE MUTATIONS	Établie	Avis de recommandation d'introduction.	
2014.03.04	GÉNOTYPAGE HLA-A, B, C, DRB1 ET DQB1 EN HAUTE RÉOLUTION PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION	Établie	Avis de recommandation d'introduction.	
2014.03.06	STATUT MUTATIONNEL DU FGFR3 DANS LES CAS D'ACHONDROPLASIE-HYPOCHONDROPLASIE (EXONS 10 ET 13) ET DE DYSPLASIE THANATOPHORE DE TYPES I ET II (EXONS 7, 10, 15, 19) PAR SÉQUENÇAGE DE TYPE SANGER	Établie	Avis de recommandation d'introduction.	Le temps de réponse devrait être de 5 jours quel que soit l'endroit de référence.
2014.03.07	RECHERCHE DE MUTATIONS CIBLÉES DU GÈNE NRAS DANS LES TUMEURS COLORECTALES MÉTASTATIQUES (EXONS 2, 3 ET 4 : CODONS 12, 13, 61 ET 146)	Innovatrice	Avis de réévaluation lorsque de nouvelles données probantes seront disponibles sur l'utilité clinique de cette analyse.	

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES-RECOMMANDATIONS ADDITIONNELLES
2014.03.08	DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTINEURONAUX : ANTI-GANGLIOSIDES ET ANTI-MAG	Établie	Avis de réévaluation sur réception d'une demande complète.	Les analyses (anti-MAG et anti-GM1) étaient inscrites dans le Répertoire du CUSM et codées 20687 (Anticorps tissulaires ou cellulaires). Ce code a été retiré de la version 2014-2015 du <i>Répertoire québécois</i> . La personne-ressource contactée au laboratoire central de l'Hôpital Royal Victoria nous a informés que l'analyse n'est plus disponible dans son laboratoire en raison d'un volume insuffisant pour garantir l'expertise et assurer la qualité. Les analyses sont actuellement envoyées à Calgary (Alberta), au laboratoire du Dr Fritzler (Mitogen Advanced Diagnostics).
2014.03.10	PROFIL SÉROLOGIQUE DE L'HÉPATITE AUTO-IMMUNE PAR LINEBLOT	Établie	Avis de recommandation d'introduction.	Il y a un intérêt à étendre l'offre de cette analyse à la population adulte, surtout que la trousse utilisée par le demandeur mesure neuf anticorps, dont trois sont indiqués pour le diagnostic de l'hépatite auto-immune et les six autres seraient utiles au diagnostic d'autres maladies hépatiques auto-immunes présentes surtout chez l'adulte.
2014.03.11	DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-ADAMTS-13	Innovatrice	Avis de réévaluation quand : • plus de données d'utilité et de validité seront disponibles; • la démonstration de la valeur ajoutée de l'utilisation pour une seule catégorie de patients sera faite; • la preuve de l'effet réel de l'analyse sur la prise en charge du PTT chez les adultes sera faite.	
2014.03.12	RECHERCHE DE PROTOZOAIRES INTESTINAUX PAR PCR MULTIPLEX EN TEMPS RÉEL	Établie	Avis de recommandation d'introduction.	

SÉQUENÇAGE DU GÈNE *GATA2* - SYNDROME MYÉLODYSPLASIQUE (RÉFÉRENCE – 2014.02.10)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 7 mai 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 10 juillet 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

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 du gène *GATA2* par la méthode Sanger.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Selon l'information fournie par le demandeur, le séquençage du gène *GATA2* est effectué en plusieurs étapes. Une première étape consiste à l'extraction de l'ADN, ensuite les 5 exons codants et leurs régions adjacentes sont amplifiés par 6 réactions d'amplifications en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'un essai maison. La réaction de séquençage est effectuée en utilisant la trousse BigDye V3.1 (Life Technologies). Le séquençage bidirectionnel des amplicons est réalisé avec des amorces spécifiques sélectionnées par le demandeur. Les séquences sont déterminées sur un analyseur 3730 (Applied Biosystems, Life Technologies) et analysées par le logiciel Mutation Surveyor V4.0.9 (SoftGenetics). L'algorithme d'analyse des variations nucléotidiques est défini par le laboratoire. Chaque mutation trouvée fait l'objet d'une recherche dans les bases de données spécialisées en génétique, dans la littérature et dans les programmes informatiques de prédiction de la pathogénicité des différentes mutations.

2.3 Société ou développeur

Protocole fourni par le demandeur.

2.4 Licence

Ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant

Ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Ne s'applique pas.

2.7 Valeur pondérée

: 247.

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

3.1 Patients ciblés

- Nouveaux cas de syndrome myélodysplasique (SMD).
- Patients présentant un SMD qui se transforme en leucémie aiguë myéloïde (LAM).
- Les membres de la fratrie si le patient présente une mutation.
- Des patients présentant un historique familial significatif de SMD-LAM.

3.2 Description de la maladie visée

Syndrome myélodysplasique

Le syndrome myélodysplasique (SMD) est un groupe de néoplasies myéloïdes difficiles à diagnostiquer et à classer. Les catégories de SMD et leurs critères diagnostiques, tels que définis dans la dernière version de la classification des néoplasies myéloïdes et leucémies aiguës, publiée en 2008 par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), sont présentés à l'annexe 1.

Le SMD peut être asymptomatique ou se manifester par des symptômes peu spécifiques comme la fièvre, des saignements, la fatigue, les infections fréquentes, etc. Le diagnostic est souvent fait de façon fortuite, lors d'un examen de routine ou d'investigation d'une autre maladie. Dans 30 % des cas, un SMD se transforme en leucémie aiguë myéloïde (LAM).

La majorité des cas est sporadique. Très rarement a-t-on observé des cas de susceptibilité familiale au SMD et au SMD-LAM associés aux gènes *RUNX1*, *CEBPA*, *TERT*, *TERC* et *GATA2* [Gao *et al.*, 2014; West *et al.*, 2014; Holme *et al.*, 2012].

Le SMD est très rare chez les enfants. En utilisant des données populationnelles de 18 états américains entre 2005 et 2009, le SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results du National Cancer Institute) fait état d'une incidence annuelle par 100 000 de 0,2; de 0,8; de 2,5; de 9,6; de 27,9 et de 51,5 pour les individus âgés de moins de 40 ans; de 40 à 49 ans ; de 50 à 59 ans; de 60 à 69 ans; de 70 à 79 ans et de plus de 79 ans, respectivement¹. Selon la même source, l'incidence globale du SMD est estimée à 4,5 cas par 100 000.

La greffe allogénique de cellules hématopoïétiques est actuellement le seul traitement curatif du SMD et constitue la première ligne de traitement pour les cas pédiatriques dans le cadre d'une stratégie agressive de traitement².

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur estime le nombre de séquençages du gène *GATA2*, sans compter la fratrie, à 20 par année au Québec (dont la moitié en pédiatrie).

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Diagnostic moléculaire, hémato-oncologie, conseil génétique.

¹ SEER Cancer Statistics Review 1975-2009. Section 30: Myelodysplastic Syndromes (MDS), Chronic Myeloproliferative Disorders (CMD), and Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). Disponible à : http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2009_pops09/results_merged/sect_30_mds.pdf.

² Information fournie par le centre demandeur.

3.5 Modalités d'administration du test

Le CHU Sainte-Justine effectue le séquençage du gène *GATA2* depuis décembre 2012. La mise au point du test a débuté en juin 2012 et 27 patients ont été testés (données recueillies en août 2014).

L'analyse est effectuée dans le laboratoire de diagnostic moléculaire du centre demandeur à partir d'un échantillon de sang (tube EDTA), de la moelle osseuse, d'un frottis buccal ou d'un prélèvement de tissu. Il n'y a présentement aucune analyse de séquençage du gène *GATA2* envoyée hors Québec, à l'exception de deux échantillons envoyés à un laboratoire en Australie pour des fins de contrôle de qualité.³

Le demandeur prévoit effectuer l'analyse 1 fois par mois avec un temps de réponse de 3 semaines.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

L'analyse proposée est unique et vise la détermination du statut mutationnel de *GATA2*.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Différents tests contribuent au diagnostic du SMD, incluant la formule sanguine complète, la biopsie de moelle osseuse, le caryotype médullaire et l'analyse mutationnelle, entre autres.

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

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le séquençage du gène *GATA2* constitue une nouvelle application d'une technologie déjà existante (séquençage Sanger). Il permettra de confirmer un diagnostic de SMD familial, d'identifier les membres de la fratrie porteurs d'une mutation et contribuer ainsi à la sélection d'un donneur lorsqu'une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique familiale est envisagée comme option thérapeutique.

Un algorithme diagnostique incluant l'évaluation du statut mutationnel de *GATA2*, en fonction des symptômes, a été repéré [Churpek *et al.*, 2013].

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

³ Les données ont été fournies par Catherine Hamelin, conseillère au dossier génétique de la Direction de la biovigilance et de la biologie médicale du ministère de la Santé et des Services sociaux (23 septembre 2014).

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Le séquençage du gène *GATA2* ne remplace aucun autre test inscrit au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* – Édition 2014-2015. Le demandeur mentionne qu'il a déjà effectué plus de 20 tests depuis 2 ans.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

GATA2 (GATA-Binding Protein 2) a un rôle essentiel dans l'hématopoïèse en régulant des gènes impliqués dans le développement, la survie et la prolifération des cellules hématopoïétiques [Persons *et al.*, 1999]. L'absence du gène *GATA2* dans les modèles animaux cause la mort au stade embryonnaire [Tsai *et al.*, 1994]. C'est en 2011 que *GATA2* a été identifié comme le gène responsable de différents syndromes prédisposant au SMD-LAM tels que Emberger, MonoMAC et DCML [Dickinson *et al.*, 2011; Hahn *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2011; Ostergaard *et al.*, 2011]. Le tableau 1 présente la variabilité phénotypique des différents syndromes maintenant reconnus comme une déficience héréditaire en *GATA2*.

Les mutations causales sont transmises selon un mode autosomique dominant. Elles peuvent être ponctuelles ou des délétions mineures ou majeures entraînant une perte de fonction du facteur de transcription par haploinsuffisance ou par perte de sa capacité à interagir avec ses séquences cibles sur l'ADN ou ses partenaires protéiques [Bresnick *et al.*, 2012].

Tableau 1 Syndromes associés à la déficience en *GATA2*

SYNDROMES	PRINCIPAUX PHÉNOTYPES CLINIQUES	ÉTUDES DECRIVANT LE PHÉNOTYPE	ÉTUDES DE CORRÉLATION PHÉNOTYPE-GÉNOTYPE
MonoMAC*	Monocytopénie Lymphocytopénie B et NK Infections disséminées à mycobactéries, champignons, virus Prédisposition au SMD-LAM	Vinh <i>et al.</i> , 2010	Hsu <i>et al.</i> , 2011
DCML	Syndrome MonoMAC + Déficience en cellules dendritiques	Bigley et Collin, 2011	Dickinson <i>et al.</i> , 2011
Emberger	Lymphœdème des membres inférieurs Anomalies lymphatiques génitales (lymphœdème, hydrocèle, lymphangiectasie) SMD-LAM Verrues multiples, surdité et anomalies mineures	Mansour <i>et al.</i> , 2010	Ostergaard <i>et al.</i> , 2011
SMD-LAM	SMD-LAM familial	Hahn <i>et al.</i> , 2011	Hahn <i>et al.</i> , 2011

Abréviations : DCML : Dendritic Cell, Monocytes, Lymphocytes B et NK; NK : Natural Killer; SMD-LAM : Syndrome myélodysplasique-Leucémie aiguë myéloïde.

Hahn a étudié quatre familles étendues porteuses de mutations du gène *GATA2* et pour lesquelles de multiples cas de SMD et de LAM ont été documentés. Parmi les 4 familles étudiées, les mutations *GATA2* transmises selon un mode autosomique dominant ont été associées au développement précoce d'un SMD ou d'une LAM. Ces phénotypes ont été associés à un mauvais pronostic, à moins qu'une greffe de cellules souches ait été réalisée avec succès. Par exemple, pour une des familles avec 13 membres atteints, 12 sont décédés avant 50 ans (de 10 à 49 ans) et le 13^e, en vie à 33 ans, avait été traité avec succès au moyen d'une greffe réalisée 7 ans auparavant. Seuls deux individus âgés de 58 ans et de 62 ans portaient la mutation sans toutefois être atteints. Tous les autres membres non porteurs de la famille étaient vivants ou avaient vécu plus de 53 ans. L'auteur souligne qu'en raison d'une issue clinique défavorable associée aux mutations *GATA2*, une stratégie agressive de traitement est appropriée pour les individus porteurs [Hahn *et al.*, 2011].

Spinner et ses collaborateurs ont passé en revue les dossiers médicaux de 57 cas démontrés de déficience en *GATA2*. Parmi ceux-ci, 40 ont été repérés en raison de symptômes associés (infection à mycobactéries non tuberculeuses, immunodéficiences primaires ou syndrome d'insuffisance médullaire héréditaire) et 17 en raison du dépistage familial. Parmi les patients retenus, l'âge médian auquel les premiers symptômes sont apparus est de 20 ans (5 mois - 78 ans). L'âge médian de la première évaluation d'une possibilité de déficience en *GATA2* est de 30 ans (4 - 76 ans). Les patients ont été suivis pendant une durée médiane de 14 mois (0 - 180 mois). Quatre patients (7 %) âgés entre 5 et 55 ans ne présentaient toujours pas de symptômes à la fin du suivi. Le taux de survie des patients non greffés était de 89 % à l'âge de 20 ans et chutait à 53 % à l'âge de 40 ans. L'auteur a également déterminé que les taux de survie à 1 an, à 2 ans et à 4 ans suivant une greffe de cellules souches étaient de 72 %, de 65 % et de 54 % respectivement [Spinner *et al.*, 2014]. L'auteur a également constaté que les patients porteurs de mutations du gène *GATA2* greffés ne présentaient pas de réactivation d'infections à mycobactéries non tuberculeuses (ou fongiques) préexistantes et que les lésions dues au VPH présentaient une nette régression [Spinner *et al.*, 2014]. Toutefois, comme il n'y a pas de greffe documentée avec des donneurs porteurs de mutations *GATA2*, il n'est pas démontré qu'il en serait autrement s'ils avaient été greffés d'un donneur familial également porteur.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Dans une revue de la littérature, Churpek propose une gestion clinique spécifique aux individus porteurs de mutations du gène *GATA2*. Il suggère de considérer la greffe de cellules souches si le patient développe un besoin régulier de transfusion, des anomalies cytogénétiques clonales, de la dysplasie ou des manifestations malignes de la moelle ou encore des infections récurrentes sévères [Churpek *et al.*, 2013].

Cuellar-Rodriguez et ses collaborateurs ont démontré que les patients atteints de déficience en *GATA2* peuvent être traités efficacement par la greffe de cellules souches hématopoïétiques suivant un conditionnement non myéloablatif. Ils ont réalisé une étude pilote de phases 1 et 2 dont l'objectif principal était de déterminer l'efficacité et l'innocuité d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques suivant un conditionnement non myéloablatif [Cuellar-Rodriguez *et al.*, 2011]. Les 6 patients inclus, âgés entre 15 et 46 ans, devaient respecter les critères d'inclusion suivants :

- Au moins 2 épisodes d'infections opportunistes mettant la vie en danger, dont au moins 1 à mycobactéries non tuberculeuses (MNT);
- Monocytopénie et lymphocytopénie (cellules B et NK);

- SMD (blastés à la biopsie médullaire > 5 % et < 10 %);
- Un donneur compatible : apparenté, non apparenté ou de sang de cordon;
- Une espérance de vie < 3 mois.

Les donneurs compatibles apparentés devaient :

- ne pas avoir d'antécédents d'infection à MNT ou autre opportuniste;
- avoir une formule sanguine complète normale.

L'étude a été réalisée avant qu'un défaut génétique impliquant *GATA2* ne soit confirmé. Deux patients ont reçu une greffe d'un donneur apparenté, deux ont reçu une greffe d'un donneur non apparenté et deux ont reçu une greffe de cellules souches du cordon. Les auteurs ont démontré, après les greffes, que les 2 donneurs apparentés étaient porteurs du gène *GATA2* non muté. Un suivi médian de 17,4 mois (de 10 à 25 mois) a été enregistré pour 5 des 6 patients vivants 3 mois après la greffe. Un haut niveau de prise de greffe a été constaté dans tous les foyers hématopoïétiques déficients avant l'intervention. Ainsi, la greffe de cellules souches non myéloablatives a permis la reconstitution des cytopénies sévères (monocytes, B et NK) et le renversement du phénotype clinique associé à la déficience en *GATA2* [Cuellar-Rodriguez *et al.*, 2011]. Le bilan des patients étudiés est présenté au tableau 2.

Tableau 2 Résultats observés chez les patients atteints de déficience en *GATA2* greffés

NO	MUTATIONS	MOELLE PRÉ-TRANSPLANTATION	GREFFES		MOELLE POST-TRANSPLANTATION	ISSUE, MOIS APRÈS LA GREFFE
			ÂGE	DONNEUR		
1	G81GfsX103	Mc atypiques, 10-15 % de cellules plasmatisques	33	DF	Hématopoïèse des 3 lignées cellulaires, 8-10 %	en vie, 25
2	R398W	↗Mc, dysplasie, LGL	46	DF	↘Mc, macrophages hémophagocytiques	Décès, 3
3	R398W	Hypocellulaire avec hypoplasie des 3 lignées	33	DNR	Moelle normale	En vie, 23
4	R396Q	↘Mc atypiques, ↗blastés	23	DNR	Hématopoïèse des 3 lignées cellulaires	En vie, 11
5	T354M	Mc atypiques, 10 % de myéloblastes	41	UCB	Quelques mc atypiques, < 5 % blastés	En vie, 18
6	Y260CfsX24	Mc atypiques, légère dysplasie	15	UCB (2x)	Hypoplasie des 3 lignées cellulaires, pas de hausse des blastés	En vie, 10

Source : Cuellar-Rodriguez *et al.*, 2011.

Abréviations : LGL : grands lymphocytes granulaires; Mc : mégacaryocytes; DF : donneur familial; DNR : donneur non relié; UCB : sang de cordon de donneur non apparenté.

5.2 Validité clinique

Aucune greffe de cellules souches provenant d'un donneur porteur d'une mutation du gène *GATA2* n'a été documentée; il est ainsi impossible de démontrer cliniquement qu'une telle greffe est néfaste pour le receveur.

Un séquençage du gène *GATA2* permet d'écarter d'autres syndromes génétiques dont les symptômes recoupent ceux de la déficience en *GATA2*. Des mutations des gènes *TERT*, *TERC*, *CEBPA* et *RUNX1* sont également associées au SMD-LAM familial. Sur une période de 20 ans, Holme et ses collaborateurs ont rassemblé 27 familles qui comptaient au moins 2 membres ayant des déficiences médullaires (engendrant de l'anémie aplasique, un SMD ou la leucémie) et dont au moins 1 membre était atteint de SMD ou de LAM. Les gènes *GATA2*, *RUNX1*, *CEBPA*, *TERC*, *TERT*, *TET2* et *NPM1* ont été séquencés chez les personnes atteintes afin de déterminer une cause génétique. Quatre familles étaient porteuses de mutations du gène *GATA2*, soit 14,8 % des familles atteintes de SMD familial (3 familles portaient des mutations du gène *TERT*, 2 du gène *TERC* et 1 du gène *RUNX1*) [Holme *et al.*, 2012]. La cause des syndromes évoqués chez 17 des 27 familles n'a toutefois pas été établie.

Hahn et ses collaborateurs ont recherché des mutations causant le syndrome SMD-LAM chez quatre familles en séquençant les exons de 50 gènes candidats et ont ainsi démontré la présence de mutations du gène *GATA2* dans les quatre familles [Hahn *et al.*, 2011]. Ces auteurs ont également recherché sans succès des mutations du gène *GATA2* chez 8 autres familles qui comptaient plusieurs membres atteints de LAM ainsi que chez 27 familles présentant plusieurs cas de cancers lymphoïdes (11 lymphomes non hodgkiniens, 5 lymphomes hodgkiniens, 3 leucémies lymphoblastiques aiguës, 7 leucémies lymphoblastiques chroniques et 1 myélome multiple). Aucune variation de la séquence de *GATA2* n'a été notée dans des échantillons provenant de 695 personnes témoins saines.

Aucune variation pertinente de la séquence codante de *GATA2* n'a été retrouvée dans des échantillons provenant de 268 individus atteints de LAM sporadique, ce qui suggère que les mutations de *GATA2* ne sont pas fréquentes dans les cas de LAM non familiales [Hahn *et al.*, 2011].

5.3 Validité analytique (ou technique)

La méthode proposée par le demandeur, le séquençage de type Sanger, constitue la méthode de référence pour la détection des mutations ponctuelles ou de délétions mineures dans les cas de maladies à transmission héréditaire [Rehm *et al.*, 2013].

Les mutations germinales signalées chez les familles présentant une susceptibilité accrue au SMD et à la LAM jusqu'à présent sont constituées principalement de faux-sens, de non-sens et de délétions mineures localisées dans l'exon 5 de *GATA2*. L'ensemble de ces mutations est détectable par séquençage de type Sanger des 5 exons et de leurs points de jonction selon la stratégie proposée par le demandeur. Certaines études ont toutefois démontré des mutations qui ne peuvent être trouvées par le séquençage des 5 exons codants :

- Délétion de 28 paires de bases (572+512del28) dans le 5^e intron du gène *GATA2*, qui engendre le syndrome MonoMAC [Johnson *et al.*, 2012].
- Mutation située dans le 5^e intron (1017+512C>T) en séquençant les régions codantes, non codantes et introniques de *GATA2* [Hsu *et al.*, 2013].
- Délétion M1Δ290 causée par une délétion de 2033 paires de bases. Cette mutation entraîne la délétion des 2 premiers exons non codants [Hsu *et al.*, 2011].

- Délétions de 6,9, de 8,2 et de 8,9 mégabases entraînant une délétion complète d'une copie du gène *GATA2* [Pasquet *et al.*, 2013; Kazenwadel *et al.*, 2012].

Le laboratoire participera à un programme de contrôle de qualité du College of American Pathologists (CAP) 2 fois par année pour la portion séquençage de l'analyse.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Une revue systématique de la littérature a été effectuée par un groupe d'experts de l'European Leukemia Network (ELN) et un guide de pratique sur le diagnostic et le traitement du SMD a été établi. Outre des tests d'hématologie, des tests de biochimie et des recherches de virus spécifiques, on suggère d'effectuer des analyses génétiques spécifiques chez un patient lorsqu'il y a une suspicion de maladie héréditaire (voir le tableau 3) [Malcovati *et al.*, 2013]. On y mentionne une vingtaine de gènes mutés de manière récurrente dans les cas de syndrome myélodysplasique. Bien que l'auteur cite l'article de Hahn et ses collaborateurs [2011] portant directement sur l'association entre les mutations du gène *GATA2* et le SMD familial et la LAM, ce gène n'est pas spécifiquement mentionné dans les recommandations.

Tableau 3 Approche diagnostique du SMD selon l'ELN

Examens diagnostiques	Priorité
Frottis de sang périphérique	Obligatoire
Aspiration de moelle osseuse	
Biopsie de la moelle osseuse	
Analyse cytogénétique	
FISH	Recommandé
Immunophénotypage par cytométrie de flux	
Polymorphisme de simples nucléotides	Suggéré
Analyse de mutations de gènes impliqués	

Selon des lignes directrices qui ont été formulées par des experts britanniques et qui portent sur le diagnostic et la gestion clinique du SMD chez des adultes, il est suggéré d'effectuer une analyse mutationnelle lorsqu'une cause constitutive est suspectée, mais aucun gène n'est précisé [Killick *et al.*, 2014].

Dans le guide de pratique clinique de l'European Society of Medical Oncology, publié en 2014 et qui a pour objet le diagnostic, le traitement et le suivi des patients atteints de SMD, on suggère de vérifier l'intégrité d'une douzaine de gènes lorsque le diagnostic de SMD est incertain. Ici encore, on ne fait pas mention du gène *GATA2*. Il faut d'ailleurs préciser qu'il n'y a aucune mention des gènes dont la mutation est impliquée dans moins de 5 % des cas de SMD [Fenaux *et al.*, 2014].

Dans la version 2014 du guide sur le SMD du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) aux États-Unis, il est recommandé de considérer un dépistage génétique additionnel chez les patients avec cytopénies familiales, particulièrement chez les jeunes patients. De plus, on y mentionne spécifiquement la recherche de mutations dans *DKC1*, *TERT* ou *TERC*, *RUNX1* et *GATA2*. On y souligne l'importance clinique de repérer les cas de SMD familiaux.

De tels patients réagiraient différemment à certains traitements et les membres de leur famille ne sont pas admissibles en tant que donneurs pour les transplantations de cellules souches hématopoïétiques allogéniques [NCCN, 2014].

En raison de la rareté des familles affectées par une déficience en *GATA2*, les standards de pratique et de prise en charge thérapeutique sont surtout fondés sur des opinions d'experts [Gao *et al.*, 2014].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

La mise en évidence d'une déficience familiale en *GATA2* conduira les cliniciens à suivre plus étroitement la situation clinique des individus porteurs de mutations de *GATA2*, ce qui pourrait se traduire par des biopsies de la moelle osseuse répétées advenant la présence d'anomalies [Churpek *et al.*, 2013; Nickels *et al.*, 2013].

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

Elles n'ont pas été analysées.

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

Dans l'éventualité où la recherche de mutation germinale dans les gènes de prédisposition au SMD-LAM s'avère positive chez une personne atteinte ou un donneur potentiel, il faudrait informer cette personne ou ce donneur des risques éventuels pour sa santé, des répercussions du suivi médical accru et de la responsabilité inhérente au partage de l'information aux autres membres de sa famille [Churpek *et al.*, 2013; Nickels *et al.*, 2013].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Le séquençage du gène *GATA2* permet de confirmer un diagnostic de SMD-LAM familial. La déficience en *GATA2* se manifeste par de l'immunodéficiência, de l'anémie, de la thrombocytopénie, du lymphœdème et un risque élevé de SMD-LAM. L'identification d'une mutation dans le gène *GATA2* permet d'éviter le recours à un donneur familial de cellules souches atteint de la même prédisposition.

7.2 Validité clinique

L'ampleur du bénéfice clinique associé à l'identification d'une mutation héréditaire dominante dans le gène *GATA2* est difficilement mesurable pour le patient atteint du SMD en raison des multiples facteurs entourant la réussite du seul traitement curatif disponible, c'est-à-dire la greffe de cellules souches.

7.3 Validité analytique

La majorité des mutations documentées est repérable par le séquençage de Sanger. Toutefois, il arrive que des mutations pertinentes soient localisées dans des introns ou dans les 2 premiers exons (région non traduite) ou encore que leur taille ne permette pas de les repérer par le séquençage Sanger.

7.4 Recommandations d'autres organismes

L'European Leukemia Network propose pour le SMD une approche diagnostique dans laquelle l'analyse des mutations des gènes impliqués est suggérée lorsqu'une cause constitutive est suspectée.

Dans le guide de pratique clinique de l'European Society of Medical Oncology qui porte sur le SMD, on suggère de vérifier l'intégrité de certains gènes lorsque le diagnostic de SMD est incertain. On n'y traite toutefois pas directement de *GATA2*.

Le National Comprehensive Cancer Network souligne l'importance de repérer les cas de SMD familiaux et recommande de dépister la présence de mutations du gène *GATA2* chez les cas de SMD atteints de cytopénies familiales [NCCN, 2014].

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Séquençage du gène *GATA2* – Syndrome myélodysplasique

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

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

Recommandation additionnelle

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

RÉFÉRENCES

- Bigley V et Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2011;96(8):1081-3.
- Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson KD, Perkins AS. Master regulatory GATA transcription factors: Mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res* 2012;40(13):5819-31.
- Churpek JE, Lorenz R, Nedumgottil S, Onel K, Olopade OI, Sorrell A, et al. Proposal for the clinical detection and management of patients and their family members with familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leuk Lymphoma* 2013;54(1):28-35.
- Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, Freeman AF, Hsu AP, Zerbe CS, Calvo KR, et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Blood* 2011;118(13):3715-20.
- Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, Reynard LN, Hussain R, Haniffa M, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* 2011;118(10):2656-8.
- Fenaux P, Haase D, Sanz GF, Santini V, Buske C. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014;25(Suppl 3):iii57-69.
- Gao J, Gentzler RD, Timms AE, Horwitz MS, Frankfurt O, Altman JK, Peterson LC. Heritable GATA2 mutations associated with familial AML-MDS: A case report and review of literature. *J Hematol Oncol* 2014;7(1):36.
- Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011;43(10):1012-7.
- Holme H, Hossain U, Kirwan M, Walne A, Vulliamy T, Dokal I. Marked genetic heterogeneity in familial myelodysplasia/acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2012;158(2):242-8.
- Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, Sanalkumar R, Sanchez L, Hickstein DD, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* 2013;121(19):3830-7, S1-7.
- Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* 2011;118(10):2653-5.
- Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, Wang J, Gao X, Boyer ME, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2012;122(10):3692-704.
- Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood* 2012;119(5):1283-91.
- Killick SB, Carter C, Culligan D, Dalley C, Das-Gupta E, Drummond M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2014;164(4):503-25.

- Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Ades L, Cermak J, Del Canizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: Recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 2013;122(17):2943-64.
- Mansour S, Connell F, Steward C, Ostergaard P, Brice G, Smithson S, et al. Emberger syndrome-primary lymphedema with myelodysplasia: Report of seven new cases. *Am J Med Genet A* 2010;152A(9):2287-96.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Myelodysplastic syndromes. Version 2.2014. Fort Washington, PA : NCCN; 2014. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE, Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults. *Ther Adv Hematol* 2013;4(4):254-69.
- Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* 2011;43(10):929-31.
- Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B, Larochelle O, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(5):822-9.
- Persons DA, Allay JA, Allay ER, Ashmun RA, Orlic D, Jane SM, et al. Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* 1999;93(2):488-99.
- 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.
- Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, et al. GATA2 deficiency: A protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* 2014;123(6):809-21.
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371(6494):221-6.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.
- Vinh DC, Patel SY, Uzel G, Anderson VL, Freeman AF, Olivier KN, et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 2010;115(8):1519-29.
- West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: A review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1310:111-8.
- Zuckerman T et Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep* 2014;6:59.

ANNEXE 1

Classification de l'OMS (2008) du syndrome myélodysplasique (SMD)

Néoplasies myéloïdes	Sang périphérique	Moelle osseuse
Cytopénie réfractaire avec dysplasie d'une lignée unique (anémie, neutropénie, thrombocytopénie)	Uni ou bi-cytopénie Blastes rares (< 1 %) ou absents	Dysplasie d'une lignée unique : > 10 % de cellules d'une lignée myéloïde < 5 % de blastes < 15 % d'érythroblastes sont sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne	Anémie Absence de blastes	≥ 15 % d'érythroblastes sont sidéroblastes en couronne Dysplasie érythroïde < 5 % de blastes
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée	Cytopénie Blastes rares (< 1 %) ou absents Absence de corps d'Auer < 1x10 ⁹ /L monocytes	Dysplasie ≥ 10 % de cellules des ≥ 2 lignées cellulaires < 5 % de blastes Absence de corps d'Auer ± 15 % sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec excès de blastes-1	Cytopénie < 5 % blastes Absence de corps d'Auer < 1x10 ⁹ /L monocytes	Dysplasie uni ou multilignée 5-9 % de blastes Absence de corps d'Auer
Anémie réfractaire avec excès de blastes-2	Cytopénie < 5-19 % blastes Corps d'Auer ± < 1x10 ⁹ /L monocytes	Dysplasie uni ou multilignée 10-19 % de blastes Corps d'Auer ±
SMD avec délétion 5q isolée	Anémie Plaquettes normales ou augmentées Blastes rares (< 1 %) ou absents	Mégacaryocytes normaux ou augmentés avec noyaux hypolobés < 5 % blastes Délétion 5q isolée Absence de corps d'Auer
SMD non classé	Cytopénie < 1 % blastes	Dysplasie uni ou multilignée < 10 % cellules, accompagnée d'une anomalie cytogénétique considérée comme une preuve de présomption de diagnostic de SMD
SMD de l'enfance, incluant la cytopénie réfractaire de l'enfance	< 2 % blastes	< 5 % blastes Dysplasie en 2 lignées ou plus
	Si de 2 % à 19 % blastes en sang périphérique ou de 5 % à 19 % en moelle osseuse, la sous-classification s'applique comme pour les adultes	

Source : Vardiman *et al.*, 2009.

QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY - LAC-SAINT-JEAN – RECHERCHE DE MUTATIONS (REFERENCE – 2014.03.02)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeurs : Demande conjointe du CHU de Québec et du CHU Sainte-Justine

1.2 Dates de transmission des demandes d'examen au MSSS

- 11 août 2014 (Ataxie spastique)
- 24 octobre 2014 (Acidose lactique et neuropathie sensitivomotrice)
- 27 octobre 2014 (Tyrosinémie héréditaire de type I)

1.3 Date de réception des demandes à l'INESSS : 3 novembre 2014

1.4 Date de transmission de l'avis au ministre : 27 février 2015

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.

Conflit d'intérêts

Le Dr François Rousseau du CHU de Québec se retire au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie : SNaPshot® multiplex PCR

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le but de la présente analyse est d'évaluer l'utilisation de la technologie susmentionnée relativement au dépistage de porteurs pour l'une des quatre maladies récessives du Saguenay - Lac-Saint-Jean (SLSJ), soit l'acidose lactique congénitale (ALC-SLSJ), la tyrosinémie héréditaire type I (TH1), la neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux (NSM/ACC) et l'ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS). Cinq mutations sont recherchées pour les 4 maladies, l'ARSACS ayant 2 mutations spécifiques.

Concernant le SNaPshot® multiplex PCR, la discrimination allélique repose directement sur l'activité de synthèse 5'→3' de l'ADN polymérase Taq⁴. Comme dans le cas du séquençage de type Sanger, l'élongation de l'amorce s'arrête si le nucléotide à incorporer dans la chaîne n'est pas disponible ou si ce dernier ne contient pas d'extrémité 3'OH (didésoxynucléotide-

⁴ La synthèse d'un nouveau brin d'ADN par la Taq polymérase nécessite : 1) une extrémité 3'OH fournie par le dernier nucléotide de l'amorce PCR, 2) un gabarit d'ADN nécessaire à l'assignation du bon nucléotide à la bonne position et 3) des désoxynucléotides triphosphates (dNTP).

ddNTP) [Sanger *et al.*, 1977]. Dans ce cas-ci, on parle de mini séquençage car l'extension de l'amorce (non marquée) se fait sur une seule base (*single-base extension* ou *minisequencing*). L'amorce doit donc s'apparier juste en amont du polymorphisme visé. L'ADN polymérase Taq insère un seul ddNTP marqué par un fluorophore unique à chacune des bases [Pastinen *et al.*, 1996] (voir l'annexe A). Le demandeur réalise deux amplifications indépendantes avec deux paires d'amorces différentes. La lecture du nucléotide fluorescent incorporé peut s'effectuer sur les 2 brins des 2 amplifications pour un total de 4 lectures (SNaPshot 4X).

2.3 Société ou développeur

ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystem, Californie, É.-U.) MasterMix PCR et contrôles (n° cat. 4323151, 4323159, 4323161 ou 4323163 selon les volumes).

2.4 Brevet, le cas échéant : Ne s'applique pas.

2.5 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) : Ne s'applique pas.

2.6 Valeurs pondérées :

- détection unidirectionnelle : 23;
- détection bidirectionnelle : 35.

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

3.1 Patients ciblés

- **Identification du statut de porteur en situation préconceptionnelle** : pour les personnes ou les couples âgés de 18 ans et plus qui habitent au Saguenay - Lac-Saint-Jean et qui ont au moins un grand-parent né dans l'une de ces régions : Saguenay - Lac-Saint-Jean, Charlevoix ou Haute-Côte-Nord;
- **Identification du statut de porteur en situation prénatale** : pour les femmes ou les couples dont la grossesse en cours est de moins de 14 semaines et qui habitent au Saguenay - Lac-Saint-Jean **et** qui ont au moins un grand-parent né dans l'une de ces régions : Saguenay - Lac-Saint-Jean, Charlevoix ou Haute-Côte-Nord;
- **Diagnostic prénatal** : lorsque les deux parents sont confirmés porteurs de la même mutation et qu'il y a une grossesse en cours;
- **Confirmation diagnostique** : pour les cas suspectés d'être atteints d'une de ces quatre maladies.

3.2 Description des maladies visées

Le tableau 1 présente les faits saillants et les caractéristiques des quatre maladies visées.

3.2.1 L'acidose lactique congénitale type Saguenay - Lac-Saint-Jean (ALC SLSJ)

L'ALC SLSJ ou syndrome de Leigh avec déficience en cytochrome c oxydase (OMIM 220111) est caractérisée par une acidose métabolique chronique, une hypotonie, une dysmorphie faciale, ainsi qu'un retard de développement psychomoteur et une déficience intellectuelle modérée [Mootha *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 1993]. Au SLSJ, l'incidence de la maladie est d'une naissance sur 2063 alors que la fréquence des porteurs est de 1 sur 23 [Morin *et al.*, 1993]. En 2011, une revue médicale exhaustive des 56 cas d'ALC SLSJ identifiés avant 2007 a

été publiée [Debray *et al.*, 2011]. Selon les données disponibles, les premiers symptômes surviennent vers l'âge de 5 mois (de 0 à 24 mois) et sont de nature variable : détresse néonatale (20 %), retard psychomoteur (45 %), retard de croissance (10 %), ataxie (4 %) et acidose métabolique aiguë (21 %) [Debray *et al.*, 2011]. Les nouveau-nés peuvent présenter de l'hypotonie (58 %), de la tachypnée transitoire (47 %), un faible réflexe de succion (44 %), des trémulations (28 %), de l'hypoglycémie (17 %) ou une crise acidotique sévère (17 %). Une dysmorphie cranio-faciale distinctive a été constatée chez plusieurs cas (front proéminent, sourcils arqués, visage moins mobile que la normale et hirsutisme). Relativement à la survenue de crises métaboliques aiguës, 10 % (5/50) des cas n'en avaient jamais subies et étaient toujours vivants (âge moyen de 8,3 ans). Vers l'âge de 14-15 mois, 68 % des patients étaient décédés des suites d'au moins une (22 enfants) ou deux (13 enfants) crises acidotiques aiguës. Globalement, 82 % des patients évalués sont décédés de la maladie. La médiane de survie était de 1,6 ans [Debray *et al.*, 2011].

Le gène responsable de l'ALC SLSJ, *LRPPRC* (leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein), a été identifié en 2003 [Mootha *et al.*, 2003]. La mutation fréquente, 1061C>T située sur l'exon 9 du gène, cause la substitution d'un seul acide aminé (A354V) et explique plus de 98 % de tous les cas atteints recensés en 2011 [Debray *et al.*, 2011]. Un patient est démontré hétérozygote composite : 1061C>T sur un allèle de l'exon 9 et une mutation de l'exon 35 sur l'autre copie du gène (c.3830_3837del + T3839G, C1277Xdel8) [Debray *et al.*, 2011]. Aucun traitement n'est disponible.

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

La TH1 (OMIM 276700) est une maladie métabolique résultant d'un déficit de la fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), dernière enzyme du sentier catabolique de la tyrosine. La prévalence mondiale varie entre 1 / 1 000 000 naissances et 1/120 000 naissances [De Braekeleer et Larochelle, 1990]. Au SLSJ, la prévalence est beaucoup plus élevée, soit 1/1846 naissances, alors que 1/20 personnes porte un allèle muté du gène *FAH* [De Braekeleer et Larochelle, 1990]. Une seule mutation présente dans l'intron 12 (IVS12+5G>A-splice mutation) explique 90 % des cas au SLSJ [Poudrier *et al.*, 1996; Grompe *et al.*, 1994].

Deux formes cliniques ont été décrites. La forme aiguë, grave et fréquente, apparaît souvent dans les premières heures de vie. Elle se caractérise par une nécrose hépatocellulaire et une dysfonction rénale tubulaire qui progresse rapidement [Baumann *et al.*, 2005; Croffie *et al.*, 1999]. Lorsque la TH1 est non traitée, cette détérioration rapide entraîne le décès à l'intérieur de 2 ans [Russo et O'Regan, 1990]. L'autre forme est chronique et touche 37 % des patients de plus de 2 ans. Une cirrhose mixte et un risque élevé de carcinome hépatocellulaire la caractérisent [Russo et O'Regan, 1990; Weinberg *et al.*, 1976]. Certaines manifestations neurologiques très graves contribuent à augmenter la morbidité lorsque le traitement est suboptimal [Mitchell *et al.*, 1990]. Le traitement inclut une diète pauvre en tyrosine, en phénylalanine et en méthionine. Depuis 1994, la nitisinone (Orfadin®), un médicament qui inhibe le catabolisme de la tyrosine et empêche l'accumulation des métabolites toxiques, est offerte aux patients TH1 du Québec [Larochelle *et al.*, 2012]. Utilisée fréquemment dans le passé, la transplantation hépatique est maintenant réservée aux cas suivants : 1) cas avec une cirrhose précoce sévère, 2) cas réfractaires à la nitisinone ou 3) cas avec carcinome hépatique [Bartlett *et al.*, 2014; Mohan *et al.*, 1999].

3.2.3 Neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux (NSM/ACC)

La NSM/ACC ou syndrome d'Andermann (OMIM 218000) est une maladie neuro-

dégénérative caractérisée par l'agénésie du corps calleux et la dégénérescence progressive des nerfs périphériques [Dupré *et al.*, 2003]. La maladie touche 1/2117 naissances et la fréquence de porteurs a été calculée à 1/23 habitants du Nord-Est Québécois [De Braekeleer *et al.*, 1993a]. Les symptômes qui en résultent sont un retard de développement, de l'aréflexie, de l'amyotrophie et de l'hypotonie, une déficience intellectuelle variable, de même que des épisodes de psychose chez certains adolescents [Dupré *et al.*, 2003; Mathieu *et al.*, 1990]. Certains cas peuvent présenter une dysmorphie faciale. Concernant le corps calleux, une étude radiologique réalisée sur 64 cas a montré une agénésie complète ou partielle de la structure chez 58 % et 9 % des cas respectivement [Mathieu *et al.*, 1990]. L'évolution de la maladie se caractérise par un retard important du début de la marche (vers 3,8 ans), d'une scoliose (vers 10 ans) et d'une perte de l'autonomie ambulatoire (vers 14 ans) [Howard *et al.*, 2003; Mathieu *et al.*, 1990]. La survie globale moyenne est de 33 ans [Dupré *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2003]. Les analyses moléculaires ont démontré que tous les patients québécois atteints présentaient une mutation ponctuelle dans l'exon 18 (2436ΔG, T813fsX813) du gène *SLC12A6* codant pour un cotransporteur K⁺/Cl⁻ [Howard *et al.*, 2003; 2002]. Un patient québécois est démontré hétérozygote composite : 2436ΔG sur un allèle de l'exon 18 et une mutation de l'exon 11 sur l'autre copie du gène (1584-1585ΔCTinsG, F529fsX531) [Howard *et al.*, 2003; 2002]. La maladie est incurable.

3.2.4 Ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix - Saguenay (ARSACS)

L'ARSACS (OMIM 270550) est une maladie neuro-dégénérative homogène caractérisée par une ataxie cérébelleuse précoce avec spasticité, un syndrome pyramidal et une neuropathie périphérique [Bouchard *et al.*, 1978]. L'incidence de la maladie est de 1/ 1932 naissances et la fréquence de porteurs est de 1/22 [De Braekeleer *et al.*, 1993b].

La maladie se manifeste entre l'âge de 12 et 18 mois par un manque d'équilibre marqué à l'initiation de la marche et une démarche altérée [Bouchard *et al.*, 1998]. Certains signes sont précoces et s'aggravent avec le temps tels que l'ataxie spastique des quatre membres, la dysarthrie, l'amyotrophie distale et la perte du réflexe du tendon d'Achille vers 25 ans. D'autres manifestations non progressives comme le mouvement involontaire des globes oculaires, le signe de Babinski et l'augmentation des réflexes tendineux profonds sont classiques [Bouchard *et al.*, 1998]. L'examen de la rétine montre systématiquement une hyper myélinisation des fibres nerveuses chez les patients québécois, mais sans perte de vision [Fontaine, 2008]. L'ARSACS est attribuable à des mutations du gène *SACS* codant pour une protéine de haut poids moléculaire nommée SACSIN [Engert *et al.*, 2000]. La saccin possède une activité de chaperonne moléculaire importante au mécanisme de défense contre l'agrégation protéique [Girard *et al.*, 2012; Kozlov *et al.*, 2011; Parfitt *et al.*, 2009]. Les deux mutations signalées sont : 6594ΔT (majeure) et 5254C>T (mineure) et représentent plus de 97 % des cas d'ARSACS [Mercier *et al.*, 2001]. À noter que Thiffault et ses collaborateurs ont identifié une douzaine de mutations supplémentaires expliquant du même coup la variabilité clinique et l'absence d'un diagnostic précis chez certains cas d'ARSACS au Québec [Thiffault *et al.*, 2013]. La maladie évolue très lentement, l'espérance de vie est d'une soixantaine d'années [Fontaine, 2008].

3.3 Nombre de patients visés

Pour le CHU de Québec, les demandeurs estiment le volume annuel de tests pour les RUIS Laval et Sherbrooke à environ 2000 par année, et autant pour les RUIS McGill et Montréal qui seront analysés au CHU Ste-Justine; donc 4000 au total.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Tous les professionnels de la santé qui participent aux suivis prénataux, dont les infirmières en prénatal, les médecins obstétriciens (médecins de famille et spécialistes), les pédiatres et les conseillers en génétique.

3.5 Modalités d'administration du test

Prélèvement sanguin sur papier buvard ou sang total-EDTA. Dans tous les cas, les 5 mutations peuvent être analysées sur un même échantillon. La demande de codésignation vise entre autres à faciliter la trajectoire des échantillons (1 tube de prélèvement).

Tableau 1 Faits saillants et caractéristiques des 4 maladies

NOM DE LA MALADIE	ACIDOSE LACTIQUE CONGÉNITALE TYPE SAGUENAY - LAC-SAINT- JEAN (ALC SLSJ)	TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE CONGÉNITALE DE TYPE I (TH1)	NEUROPATHIE SENSITIVOMOTRICE AVEC OU SANS AGÉNÉSIE DU CORPS CALLEUX (NSM/ACC)	ATAXIE RÉCESSIVE SPASTIQUE AUTOSOMIQUE DE CHARLEVOIX - SAGUENAY (ARSACS)
Incidence	1/2063 (1979-1990)	1/1846 (1970-1988)	1/2117 (1956–1985)	1/1932 (1941–1985)
Fréquence de porteurs	1/23	1/20	1/23	1/22
Gène responsable	<i>LRPPRC</i>	<i>FAH</i>	<i>SLC12A6 (KCC3)</i>	<i>SACS</i>
Fonction du gène	Métabolisme des ARNm mitochondriaux (probable)	Catabolisme de la tyrosine	K ⁺ /Cl ⁻ co-transporteur, réponse aux changements osmotiques	Chaperone moléculaire Recrutement Hsp70 (probable)
Mutation(s) dépistée(s)	1061C>T (A354V) : 99 %	1062+5G>A (IVS12+5G>A) : 90 %	2436ΔG (T813fsX813) : > 99 %	6594ΔT (I2949FfsX) : 93,8 % 5254C>T (R2502X) : 3,4 %
Conséquences biochimiques	Activité COX ↓ Acidose lactique	Activité FAH ↓ Métabolites de la tyrosine ↑	Volume neurones et cellules gliales ↑ : neuro-dégénération	Mécanisme de protection contre l'agrégation protéique ↓
Âge apparition	5 mois (0-24 mois)	Forme précoce : < 3 mois Forme tardive : > 1 an	< 1 an	12-18 mois
Symptômes	Retard croissance et développement, dysmorphie faciale, crises métaboliques et neurologiques (syndrome de Leigh)	Nécrose et carcinome hépatocellulaire, tubulopathie rénale et crises neurologiques aiguës.	Neuropathie sensorimotrice progressive, hypotonie, aréflexie, amyotrophie, scolioses, dysmorphie, retard intellectuel, psychoses.	Ataxie, dysarthrie, nystagmus, amyotrophie distale, hyperréflexie, spasticité, pes cavus, rétinopathie.
Pronostic	Taux de mortalité : 82 % Incidence crises fatales : 52 % Survie : 1,6 ans (5 j à > 30 ans)	Si non traitée, décès < 2 ans ou < 12 ans pour formes aiguë et chronique, respectivement.	Marche vers 4 ans Arrête de marcher vers 14 ans Survie globale moyenne : 33 ans	Fauteuil roulant 41 ans (17-57 ans) Survie < 60 ans
Traitements	Diète spéciale	Diète, Nitisinone (Orfadin®) Transplantation hépatique	Symptômes seulement	Symptômes seulement

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Concernant le SNaPshot® multiplex, il s'agit d'une demande de codésignation impliquant un rehaussement technologique des analyses réalisées au CHU de Québec et au CHU Sainte-Justine depuis plus de 10 ans.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Actuellement, le CHU Sainte-Justine est désigné pour les analyses suivantes : 50010 ARSACS (VP : 21) et 50051 COX (VP : 39). La technologie employée est le TaqMan®.

Le CHU de Québec, pour sa part, est désigné pour les analyses suivantes : 50252 NSM/ACC (VP : 31) et 50313 TH1 (VP : 31). La technologie employée est l'amplification PCR avec des amorces spécifiques aux allèles sauvages et mutés, respectivement.

4.3 Description des avantages évoqués des technologies proposées

L'essai SNaPshot® d'Applied Biosystem a été récemment mis de l'avant dans plusieurs laboratoires cliniques en raison de ses performances analytiques, notamment concernant la mise en évidence de mutations somatiques faiblement représentées dans un échantillon complexe comme une tumeur. Effectivement, Dias-Santagata et ses collaborateurs signalent la capacité d'utilisation de la technologie en multiplex, le faible niveau de fluorescence de base (bruit de fond), la sensibilité très élevée et la robustesse sur des tissus archivés en paraffine [Dias-Santagata *et al.*, 2010]. De plus, l'essai SNaPshot est simple et ne nécessite qu'un séquenceur automatique à capillaires comme équipement spécialisé [Dias-Santagata *et al.*, 2010]. Les codemandeurs souhaitent implanter cette technologie afin de se prémunir du phénomène de perte artéfactuelle d'un allèle (allèle *dropout*-ADO) [Taberlet *et al.*, 1996]. L'utilisation de deux amplifications indépendantes avec des paires d'amorces non chevauchantes en plus d'une double détection (sur les deux brins) permettrait de contrôler le phénomène d'ADO.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

La pertinence clinique d'un test diagnostique fait référence à sa capacité à générer une information utile afin de clarifier ou de confirmer un diagnostic; de choisir ou de modifier un traitement; de choisir ou d'adapter une prise en charge; de même que de prévenir ou d'anticiper un changement futur dans un état de santé.

Au Québec, les personnes nées au SLSJ ou celles dont les parents rapprochés y sont nés présentent un risque anormalement élevé de transmettre un allèle responsable d'une des quatre maladies visées ici en raison d'un effet fondateur. En effet, quelle que soit la maladie, le statut de porteur est présent chez environ 1/22 personnes, alors qu'environ 1/2000 enfants en est atteint [De Braekeleer *et al.*, 1993a; De Braekeleer *et al.*, 1993b; Morin *et al.*, 1993; De Braekeleer et Larochelle, 1990].

Les analyses proposées ici visent à mettre en évidence, chez un individu à risque, la présence d'un ou de plusieurs allèles spécifiques à ces quatre maladies autosomiques récessives afin d'établir le statut de porteur. La confirmation d'un couple de porteurs permettra un conseil génétique adéquat, que ce soit lors de la planification d'une grossesse ou au cours du premier trimestre de celle-ci. Indépendamment de la technique employée pour déceler un porteur, chacune de ces quatre maladies est grave et débilitante avec un pronostic très sombre en termes de mortalité ou de morbidité (voir le tableau 1).

5.2 Validité clinique

La validité clinique d'un test génétique repose sur sa capacité à mettre en évidence la présence (sensibilité) ou l'absence (spécificité) d'un phénotype clinique observé [Zimmern et Kroese, 2007]. Or, en raison du caractère récessif des maladies visées ici, les tests proposés ont pour but d'identifier une composante moléculaire présente chez un individu qui n'a pas le phénotype clinique observable. La sensibilité clinique du test de porteur est donc dépendante de l'hétérogénéité génétique, c'est-à-dire le nombre de gènes impliqués, les mutations causales et la variabilité ethnique de la population cible [Watson *et al.*, 2004]. Concernant les quatre maladies du SLSJ, la validité clinique des tests de porteurs est bien établie car :

- la population cible est connue et homogène;
- les gènes en cause sont connus et uniques;
- la fréquence des allèles causals est connue et élevée (voir le tableau 2);
- le nombre de mutations responsables est restreint et leur pénétrance est élevée.

Considérant la corrélation élevée entre les génotypes recherchés et les phénotypes visés, la sensibilité du test de porteur sera surtout influencée par sa robustesse analytique, c'est-à-dire sa capacité à identifier correctement la présence ou l'absence de la bonne séquence d'ADN [Burke, 2009]. En admettant que la sensibilité analytique du test de porteur est de 100 %, la sensibilité clinique est théoriquement équivalente à celle de la fréquence allélique.

Tableau 2 Corrélation entre les 5 génotypes testés et les 4 phénotypes propres à la population du Saguenay - Lac-Saint-Jean

ÉTUDE	PHÉNOTYPES	CAS (n ^{bre})	MÉTHODE	GÉNOTYPES TESTÉS	FRÉQUENCE ALLÉLIQUE (%)
Debray <i>et al.</i> , 2011	ALC SLSJ	56	PCR ASO	<i>LRPPRC</i> : C1061T [A354V]	111/112 (99,1)
Mercier <i>et al.</i> , 2001	ARSACS	129	PCR ASO	<i>SACS</i> : 6594ΔT (I2949FfsX) <i>SACS</i> : 5254C>T (R2502X)	196/209 (93,8) 7/209 (3,4)
Howard <i>et al.</i> , 2002	NSM/ACC	81	PCR	<i>SLC12A6</i> : 2436ΔG [T813fsX813]	161/162 (99,4)
Grompe <i>et al.</i> , 1994	TH1	25	PCR ASO	<i>FAH</i> : IVS12+5G>A [épissage]	45/50 (90)

Abréviations : ALC SLSJ : acidose lactique congénitale Saguenay - Lac-Saint-Jean; ARSACS : ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay; ASO : allèle spécifique oligonucléotide; n^{bre} : nombre; NSM/ACC : neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux; PCR : polymérase chain reaction; TH1 : tyrosinémie héréditaire de type 1.

5.3 Validité analytique (ou technique)

SACS (50010) et *LRPPRC* (50051) étaient analysés par une méthode TaqMan® (une amplification et une détection) au CHU Sainte-Justine. *SLC12A6* (50252) et *FAH* (50313) étaient analysés par une méthode de quadruple ASO indépendants (deux allèles sur chaque brin dans des tubes séparés) au CHU de Québec. Les deux demandeurs ont conjointement mis au point une méthode qui permet l'analyse des mêmes mutations par le principe d'extension d'amorce à partir de deux amplifications PCR indépendantes et d'une double détection du polymorphisme visé, soit quatre lectures différentes pour chaque mutation. Comme mentionné à la section 4.3, le rehaussement technologique proposé ici vise à se prémunir contre le phénomène de dropout allélique (voir ci-après).

Les demandeurs ont réanalysé les échantillons de 469 porteurs hétérozygotes ou homozygotes connus de l'une ou l'autre des 5 mutations d'intérêt, en plus de 297 non-porteurs connus. Des échantillons provenant de 1000 nouveau-nés ont également été analysés. Les résultats sont résumés ci-dessous.

Sensibilité analytique⁵

50010 – *SACS* 6594ΔT : 100 % concordance : 104/104 = > 99 %; IC 95 % : > 97 %

50010 – *SACS* 5254C>T : 100 % concordance : 45/45 = > 99 %; IC 95 % : > 93 %

50051 – *LRPPRC* C1061T : 100 % concordance : 107/107 = > 99 %; IC 95 % : > 97 %

50252 – *SLC12A6* 2436ΔG : 100 % concordance : 109/109 = > 99 %; IC 95 % : > 97 %

50313 – *FAH* IVS12+5G>A : 100 % concordance : 130/130 = > 99 %; IC 95 % : > 98 %

Spécificité analytique

50010 – *SACS* 6594ΔT : 100 % concordance : 1633/1633 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50010 – *SACS* 5254C>T : 100 % concordance : 1633/1633 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50051 – *LRPPRC* C1061T : 100 % concordance : 1740/1740 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50252 – *SLC12A6* 2436ΔG : 100 % concordance : 1494/1494 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50313 – *FAH* IVS12+5G>A : 100 % concordance : 1444/1444 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

Fiabilité (bon résultat/total des résultats)

50010 – *SACS* 6594ΔT : 100 % concordance : 1737/1737 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50010 – *SACS* 5254C>T : 100 % concordance : 1640/1640 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50051 – *LRPPRC* C1061T : 100 % concordance : 1847/1847 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50252 – *SLC12A6* 2436ΔG : 100 % concordance : 1603/1603 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

50313 – *FAH* IVS12+5G>A : 100 % concordance : 1574/1574 = > 99,99 %; IC 95 % : > 99,8 %

⁵ Les données de validation ont été fournies séparément pour chaque gène au moyen des formulaires d'ajout d'analyse tels que demandés par le MSSS à l'automne 2014. Les Dr François Rousseau, M.D., FRCPC, médecin biochimiste du CHU de Québec, et le Dr Grant Mitchell, M.D., FRCPC, médecin généticien du CHU Sainte-Justine, ont fait parvenir à l'INESSS un texte reprenant la description de ces résultats (28 novembre 2014).

Reproductibilité

Soixante-dix-huit échantillons ont été analysés à deux reprises et ils étaient concordants pour toutes les mutations étudiées : 100 % concordance : 78/78 = > 99 %; IC 95 % > 96 %.

Limite de détection

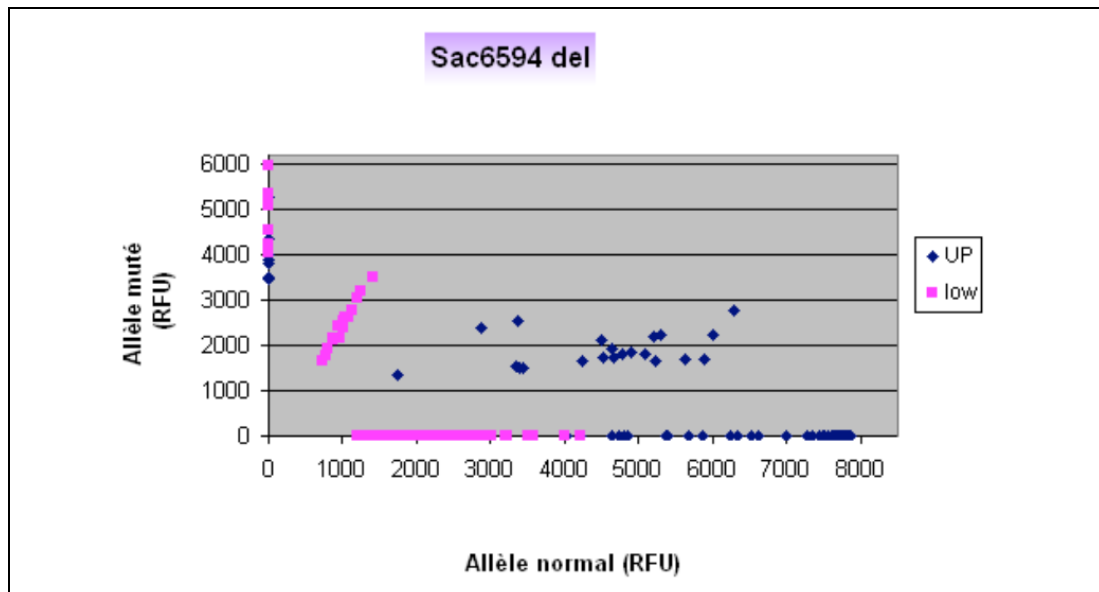
Quatre nanogrammes d'ADN génomique.

Taux de succès et interprétation des résultats

Le taux de résultats concluants à la première analyse est de plus de 98 %. Environ 2 % des échantillons ne présentent pas de résultats concluants lors de la première analyse et doivent être repris.

« Pour être considéré comme concluant, le génotype établi selon toutes les différentes réactions d'amplification et de détection sur un même échantillon doit être concordant. Le rapport signal/bruit de la méthode SNaPshot® (calculé comme le ratio du signal spécifique en présence d'un allèle/le signal des échantillons ne portant pas cet allèle) est de plus de 100 (estimé conservateur), ce qui est de 30 à 50 fois supérieur au TaqMan® et 10 fois mieux que la méthode à ASO multiples en place au CHU de Québec. En fait, habituellement, avec la méthode SNaPshot®4X, il n'y a aucun signal détecté pour un échantillon en absence de l'allèle (signal brut = 0 RFU [*Relative Fluorescence Units*]), alors que les signaux bruts spécifiques en présence d'un allèle vont de 500 RFU à 5000 RFU avec une médiane de 1500 RFU pour les hétérozygotes et 3000 RFU pour les homozygotes. Enfin, la hauteur des pics est proportionnelle au nombre d'allèles avec un signal chez les hétérozygotes d'environ la moitié du signal chez les homozygotes (voir la figure 1) »⁶.

Figure 1 Résultats typiques de signal spécifique par SNaPshot®



Résultats typiques de signal spécifique (exprimé ici en hauteur du pic en RFU brute) pour chaque allèle (Normal = axe des X; Muté = axe des Y) pour la détection du génotype avec la sonde du brin codant et non codant (Up et Low). Le signal nul (0 RFU) lorsque l'allèle est absent et le plus petit signal positif (> 1000 RFU ici, peu importe l'allèle et le brin), d'où le ratio signal/bruit très élevé.

⁶ Texte cité et figure 1 : Communications personnelles avec le Dr François Rousseau, M.D., FRCPC, médecin biochimiste du CHU de Québec (28 novembre 2014).

Phénomène d'allèle *dropout* (ADO)

L'ADO est un terme utilisé pour décrire la non-amplification stochastique d'un allèle sur deux, présents au même locus (hétérozygote) [Pompanon *et al.*, 2005]. Donc, toutes les techniques de génotypage qui reposent sur une amplification PCR initiale de l'ADN gabarit cible sont sensibles au phénomène d'ADO. En face d'un génotype hétérozygote vrai, le génotype erroné issu de l'ADO non décelé pourrait être interprété comme un résultat homozygote de bonne qualité. Pompanon et ses collaborateurs classent les causes possibles pouvant résulter en un ADO et ultimement en un génotype erroné. Parmi celles-ci se retrouvent : les variations de séquences adjacentes au polymorphisme visé ou aux sites d'appariement des amorces PCR, la qualité de l'ADN extrait des échantillons, la qualité des réactifs, la précision des appareils de mesure et les erreurs humaines.

Variations de séquences aux sites d'appariement des amorces PCR

À l'état hétérozygote, ces variations peuvent conduire à une réduction considérable de l'efficacité d'amplification d'un des deux allèles et donc, masquer le signal de détection provenant de l'allèle modifié [Ikegawa *et al.*, 2002]. Au moment du design de l'amplification PCR, une attention particulière au choix des amorces permet d'éviter les effets délétères de ce type de variations. Évidemment, le design rigoureux d'un couple d'amorces ne protège pas des variations potentielles encore inconnues [Tebbutt et Ruan, 2008]. Selon différentes sources de données, l'ADO causée par des variations aux sites d'appariement des amorces PCR est responsable d'une importante fraction de génotypes erronés et la plupart de ces erreurs peuvent être détectées par une double amplification [Quinlan et Marth, 2007].

Variations de séquences adjacentes au SNP d'intérêt

Ces variations peuvent réduire considérablement l'appariement d'une sonde ou la liaison d'un enzyme, utilisés pour la détection d'un signal allèle-spécifique. Le tableau 3 résume les différentes méthodes de génotypage sensibles aux variations nucléotidiques supplémentaires adjacentes au SNP d'intérêt. L'ADO a été signalé, entre autres, pour le TaqMan et le PCR allèle-spécifique (ASO) [Freedman *et al.*, 2005; Teupser *et al.*, 2001]. Aucune erreur de typage n'a été répertoriée pour l'extension d'amorce [Hawkins *et al.*, 2002]. Toutefois, ces études n'ont pas présenté de données permettant d'évaluer précisément le lien entre la méthode employée et le taux d'erreur observé [Kirsten *et al.*, 2007]. Kirsten et ses collaborateurs ont mené des expériences de mutagenèse dirigée afin de tester la robustesse de la détection par extension d'amorce. Ils ont démontré que seul un mésappariement du dernier nucléotide en 3' de la sonde d'extension causait l'ADO, alors qu'un mésappariement de la deuxième avant-dernière base (position 3) pouvait grandement affecter l'efficacité de la réaction [Kirsten *et al.*, 2007]. Dans leurs conclusions, les auteurs mentionnent qu'un essai SBE très robuste inclurait une détection du SNP d'intérêt sur les deux brins.

Tableau 3 Méappariements nucléotidiques et erreurs de génotypes rapportées dans la littérature (adapté de Kirsten et al., 2007)

TECHNIQUE DE GÉNOTYPAGE	GÉNOTYPE DE L'ÉCHANTILLON	DISTANCE ENTRE UNE VARIATION INCONNUE ET LE SNP D'INTÉRÊT (PB)	ADO	RÉFÉRENCES
TaqMan	HMZ HTZ	9 6, 9	Non Oui	Teupser <i>et al.</i> , 2001 Freedman <i>et al.</i> , 2005
PCR allèle spécifique	HTZ	5	Oui	Hawkins <i>et al.</i> , 2002
Extension d'amorce	HTZ	5	Non	
	S.o.	1	Oui	Kirsten <i>et al.</i> , 2007

Abréviations : ADO : allèle *dropout*; HMZ : homozygote; HTZ : hétérozygote; S.o. : Sans objet; PB : paire de bases; SNP : *single nucleotide polymorphism*.

Données locales du CHU de Québec concernant le phénomène d'ADO

Le CHU de Québec a fait parvenir à l'INESSS⁷ un manuscrit scientifique soumis le 19 août 2014 pour publication dans *The Journal of Molecular Diagnostics*. Le but de l'article était d'évaluer l'incidence du phénomène d'ADO lors du diagnostic moléculaire de 4 maladies récessives : la TH1, la NSM ACC, l'hémochromatose héréditaire (OMIM 613609) et la fibrose kystique (OMIM 602421). La technique de double amplification avec amorces allèle-spécifiques (ASO), actuellement inscrite au *Répertoire* pour ces 4 maladies, a été utilisée.

Huit différentes mutations ont été testées dans 4 gènes (*CFTR*, *FAH*, *SLC12A6* et *HFE*) pour un total de 30769 génotypes avec entre 1188 et 6618 génotypes par mutation. La fréquence de l'allèle rare muté variait entre 1:769 et 1:5. Au total, il y a eu 434 génotypes homozygotes mutés, 3321 hétérozygotes et 27014 homozygotes normaux, tous locus confondus.

Pour chaque série d'amorces ASO (n=16), la borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la fréquence de résultats non concluants a varié entre 1:1000 et 1:100 avec une médiane de 1:250. Sur les 61538 réactions, le taux de réaction nulle était de 1:250 alors que le taux de drop-out ou drop-in était de 1:450 (IC à 95 % : de 1:526 à 1:384). Le taux de génotypes erronés a été établi à 1:225.

Erreur de génotype et risque de naissance d'un enfant atteint

À partir des données disponibles, il est possible d'estimer la probabilité qu'un individu vraiment porteur et dont la recherche de mutation s'est avérée négative transmette un allèle causal. Bien que ce risque soit également dépendant de la couverture génétique du test, seule la probabilité liée aux erreurs de génotypes a été estimée. La probabilité (*a priori*) de donner naissance à un enfant atteint pour un couple non testé issu de la population cible est équivalente au carré de la fréquence des porteurs multiplié par le risque d'une double transmission de l'allèle causal [p. ex. $(1/22)^2 * 1/4 = 1/1936$]. Le tableau 4 présente les probabilités d'une naissance atteinte si la méthode utilisée pour tester un ou deux parents est sensible aux erreurs de génotypes, telle que décrite par les demandeurs.

⁷ Communications électroniques personnelles avec le Dr François Rousseau, M.D., FRCPC, médecin biochimiste du CHU de Québec, (11 décembre 2014).

Tableau 4 Probabilité de naissance d'un enfant atteint et erreurs de génotypes

PROBABILITÉ	ALC SLSJ	TH1	NSM/ACC	ARSACS
Porteur (A)	1/23	1/20	1/23	1/22
Non porteur ($\bar{A}$)	22/23	19/20	22/23	21/22
Génotype erroné (B)	1/225			
Faussement testé non porteur ($\bar{A}*B$)	1/235	1/237	1/235	1/236
Si un des parents est testé négatif et l'autre non testé ($\bar{A}*B$)*A*1/4	1/21 620	1/18 960	1/21 620	1/20 768
Si les deux parents sont testés négatifs ($\bar{A}*B$) ² *1/4	1/220 900	1/224 676	1/220 900	1/222 784

Abréviations : ALC SLSJ : acidose lactique congénitale Saguenay - Lac-Saint-Jean; ARSACS : ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay; NSM/ACC : neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux; TH1 : tyrosinémie héréditaire de type 1.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Le *Registre des tests génétiques*⁸ approuvés par le CLIA fait mention de 22 tests effectués par extension d'amorce allèle spécifique pour des tests de porteurs pour 17 conditions :

« Gene sight psychotropic » (Dépression) au laboratoire AssureRx Health, Inc., Ohio, É.-U.

Hémochromatose, Déficience en sphingomyélinase acide, Mucopolidose IV, Maladie du sirop d'érable 1B, Maladie du sirop d'érable 1A, Maladie du stockage du glycogène 1a, Maladie de Gaucher, Anémie de Fanconi FANCC, Dysautonomie familiale, Maladie de Canavan, Déficience en hexosaminidase A, Maladie Tay-Sachs, Fibrose kystique, Syndrome de Bloom, Gangliosidose, au laboratoire Molecular Genetics Laboratory Genetrack Biolabs Inc. Vancouver, Colombie-Britannique, Canada.

Déficience en sphingomyélinase acide, Mucopolidose IV, Maladie de Gaucher, Anémie de Fanconi FANCC, Dysautonomie familiale, Maladie de Canavan, Fibrose kystique, Syndrome de Bloom, au laboratoire de génétique moléculaire du SickKids Hospital de Toronto, Ontario, Canada.

Les lignes directrices du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2012, relativement aux tests de génétique moléculaire s'appuyant sur une amplification PCR initiale, soulignent l'importance de prendre en considération le phénomène d'allèle *dropout* lors de la validation analytique du test [CLSI, 2012].

⁸ National Center for Biotechnology Information (NCBI). Genetic Testing Registry (GTR) [site Web]. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

Les codemandeurs du CHU de Québec/CHU Sainte-Justine mentionnent dans les informations complémentaires transmises à l'INESSS que : « un des aspects de la validité/sécurité d'une méthode est le nombre de médecins avec formation complémentaire post-spécialité reconnue en diagnostic moléculaire et qui sont en place (au CHU) pour superviser et interpréter les analyses »⁹.

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

Elles n'ont pas été évaluées.

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

D'un point de vue organisationnel, la nouvelle méthode implantée dans les deux Centres facilitera la trajectoire des échantillons et ne nécessitera qu'un tube de prélèvement. La disponibilité du dépistage de ces quatre maladies pour tout le Québec requiert des ressources accrues en conseil génétique. Les enjeux éthiques associés ont été abordés dans un avis du Comité d'éthique de santé publique de juillet 2007 [Comité d'éthique de santé publique (CESP), 2007].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les quatre maladies héréditaires récessives visées dans le présent avis sont spécifiques aux personnes dont les origines sont dans la région du Saguenay - Lac-Saint-Jean ou de Charlevoix. Dans cette population, le statut de porteur se retrouve chez 1/20-23 personnes alors que 1/2000 enfants naîtra atteint d'une de ces maladies débilitantes. Le pronostic des personnes atteintes est très sombre en termes de mortalité ou de morbidité.

7.2 Validité clinique

La validité clinique des tests de porteurs relativement aux quatre maladies récessives du Saguenay - Lac-Saint-Jean est bien établie car la population cible est connue et homogène, les gènes en cause sont connus et uniques, la fréquence des allèles causals est connue et élevée et le nombre de mutations responsables est restreint et leur pénétrance est élevée.

7.3 Validité analytique

Les codemandeurs sont désignés pour ces analyses depuis 10 ans, et un rehaussement technologique a été proposé. Le SNaPshot®4X inclut une double amplification du même locus suivie d'une détection bi-caténaire selon le principe d'extension d'amorce. L'analyse est conçue pour détecter les erreurs de génotypes documentées à la fois par les demandeurs et dans la littérature. Ils ont fourni les données de validation analytique requises. Les mesures de contrôle de qualité ont fait l'objet de procédures opératoires normalisées développées par les requérants. Les contrôles de qualité interne sont décrits.

⁹ Communications électroniques personnelles avec le Dr François Rousseau, M.D., FRCPC, médecin biochimiste du CHU de Québec (30 novembre 2014).

Il y a concordance complète (100 %) entre les analyses effectuées avec la nouvelle méthode et celles déjà inscrites. Selon les données fournies par les demandeurs, la technique est robuste, précise et spécifique. Le SNaPshot®4X confère donc une sensibilité analytique accrue.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Selon le Genetic Testing Registry, les deux méthodes proposées sont actuellement utilisées en génétique moléculaire clinique. Toutefois, davantage de conditions sont testées par le principe d'extension d'amorce sur un seul nucléotide. Le CLSI souligne l'importance de considérer le phénomène d'ADO lors de la validation analytique d'un nouveau test moléculaire qui s'appuie sur une amplification initiale de l'ADN cible.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Quatre maladies du Saguenay - Lac-Saint-Jean – Recherche de mutations

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

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

Recommandation additionnelle

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

RÉFÉRENCES

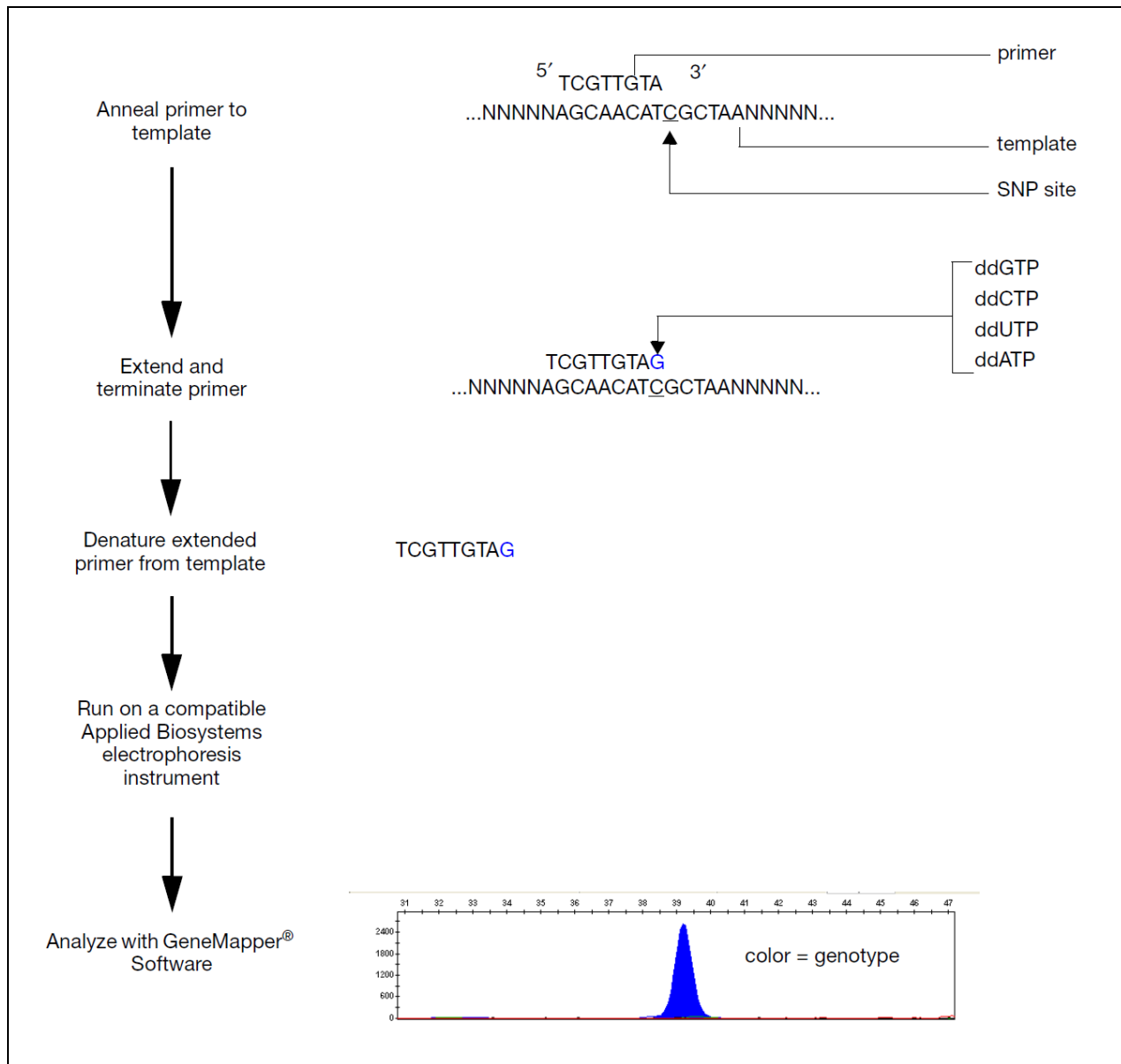
- Applied Biosystems. SNaPshot® Kit Analysis Getting Started Guide: GeneMapper® Software Version 4.1. Foster City, CA : Applied Biosystems; 2009. Disponible à : https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_070182.pdf.
- Bartlett DC, Lloyd C, McKiernan PJ, Newsome PN. Early nitisinone treatment reduces the need for liver transplantation in children with tyrosinaemia type 1 and improves post-transplant renal function. *J Inherit Metab Dis* 2014;37(5):745-52.
- Baumann U, Preece MA, Green A, Kelly DA, McKiernan PJ. Hyperinsulinism in tyrosinaemia type I. *J Inherit Metab Dis* 2005;28(2):131-5.
- Bouchard JP, Richter A, Mathieu J, Brunet D, Hudson TJ, Morgan K, Melançon SB. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul Disord* 1998;8(7):474-9.
- Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, Bouchard RW. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci* 1978;5(1):61-9.
- Burke W. Clinical validity and clinical utility of genetic tests. *Curr Protoc Hum Genet* 2009;Chapter 9:Unit 9.15.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality management for molecular genetic testing; Approved guideline. CLSI document MM20-A. Wayne, PA : CLSI; 2012.
- Comité d'éthique de santé publique (CESP). Avis sur le Projet-pilote d'offre de tests de porteur pour quatre maladies héréditaires récessives au Saguenay-Lac-St-Jean. Montréal, Qc : CESP; 2007. Disponible à : <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/1853297>.
- Croffie JM, Gupta SK, Chong SK, Fitzgerald JF. Tyrosinemia type 1 should be suspected in infants with severe coagulopathy even in the absence of other signs of liver failure. *Pediatrics* 1999;103(3):675-8.
- De Braekeleer M et Larochelle J. Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Saguenay-Lac-St-Jean. *Am J Hum Genet* 1990;47(2):302-7.
- De Braekeleer M, Dallaire A, Mathieu J. Genetic epidemiology of sensorimotor polyneuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in northeastern Quebec. *Hum Genet* 1993a;91(3):223-7.
- De Braekeleer M, Giasson F, Mathieu J, Roy M, Bouchard JP, Morgan K. Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec. *Genet Epidemiol* 1993b;10(1):17-25.
- Debray FG, Morin C, Janvier A, Villeneuve J, Maranda B, Laframboise R, et al. LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* 2011;48(3):183-9.
- Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, Vernovsky K, Kuhlmann G, Boisvert SL, et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: A clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2010;2(5):146-58.
- Dupré N, Howard HC, Mathieu J, Karpati 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.

- Engert JC, Bérubé P, Mercier J, Doré C, Lepage P, Ge B, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000;24(2):120-5.
- 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.
- Freedman ML, Penney KL, Stram DO, Riley S, McKean-Cowdin R, Le Marchand L, et al. A haplotype-based case-control study of BRCA1 and sporadic breast cancer risk. *Cancer Res* 2005;65(16):7516-22.
- 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 U S A* 2012;109(5):1661-6.
- Grompe M, St-Louis M, Demers SI, al-Dhalimy M, Leclerc B, Tanguay RM. A single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I. *N Engl J Med* 1994;331(6):353-7.
- Hawkins JR, Khripin Y, Valdes AM, Weaver TA. Miniaturized sealed-tube allele-specific PCR. *Hum Mutat* 2002;19(5):543-53.
- Howard HC, Dupré N, Mathieu J, Bouchard JP, Rouleau GA. La neuropathie sensitivo-motrice héréditaire avec agénésie du corps calleux. *Med Sci (Paris)* 2003;19(4):414-6.
- Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 2002;32(3):384-92.
- Ikegawa S, Mabuchi A, Ogawa M, Ikeda T. Allele-specific PCR amplification due to sequence identity between a PCR primer and an amplicon: Is direct sequencing so reliable? *Hum Genet* 2002;110(6):606-8.
- Kirsten H, Teupser D, Weissfuss J, Wolfram G, Emmrich F, Ahnert P. Robustness of single-base extension against mismatches at the site of primer attachment in a clinical assay. *J Mol Med (Berl)* 2007;85(4):361-9.
- Kozlov G, Denisov AY, Girard M, Dicaire MJ, Hamlin J, McPherson PS, et al. Structural basis of defects in the sacsin HEPN domain responsible for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *J Biol Chem* 2011;286(23):20407-12.
- Larochelle J, Alvarez F, Bussi res JF, Chevalier I, Dallaire L, Dubois J, et al. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Quebec. *Mol Genet Metab* 2012;107(1-2):49-54.
- Mathieu J, Bédard F, Prévost C, Langevin P. Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire avec ou sans agénésie du corps calleux :  tude radiologique et clinique de 64 cas. *Can J Neurol Sci* 1990;17(2):103-8.
- Mercier J, Prévost C, Engert JC, Bouchard JP, Mathieu J, Richter A. Rapid detection of the sacsin mutations causing autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Genet Test* 2001;5(3):255-9.
- Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Michaud J, Grenier A, Ogier H, et al. Neurologic crises in hereditary tyrosinemia. *N Engl J Med* 1990;322(7):432-7.

- Mohan N, McKiernan P, Preece MA, Green A, Buckels J, Mayer AD, Kelly DA. Indications and outcome of liver transplantation in tyrosinaemia type 1. *Eur J Pediatr* 1999;158(Suppl 2):S49-54.
- Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(2):605-10.
- Morin C, Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, De Braekeleer M. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet* 1993;53(2):488-96.
- Parfitt DA, Michael GJ, Vermeulen EG, Prodromou NV, Webb TR, Gallo JM, et al. The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum Mol Genet* 2009;18(9):1556-65.
- Pastinen T, Partanen J, Syvanen AC. Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation. *Clin Chem* 1996;42(9):1391-7.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 2005;6(11):847-59.
- Poudrier J, St-Louis M, Lettre F, Gibson K, Prévost C, Larochelle J, Tanguay RM. Frequency of the IVS12 + 5G-->A splice mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in carriers of hereditary tyrosinaemia in the French Canadian population of Saguenay-Lac-St-Jean. *Prenat Diagn* 1996;16(1):59-64.
- Quinlan AR et Marth GT. Primer-site SNPs mask mutations. *Nat Methods* 2007;4(3):192.
- Russo P et O'Regan S. Visceral pathology of hereditary tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet* 1990;47(2):317-24.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 1996;24(16):3189-94.
- Tebbutt SJ et Ruan J. Combining multiple PCR primer pairs for each amplicon can improve SNP genotyping accuracy by reducing allelic drop-out. *Biotechniques* 2008;45(6):637-8, 40, 42 passim.
- Teupser D, Rupprecht W, Lohse P, Thiery J. Fluorescence-based detection of the CETP TaqIB polymorphism: False positives with the TaqMan-based exonuclease assay attributable to a previously unknown gene variant. *Clin Chem* 2001;47(5):852-7.
- Thiffault I, Dicaire MJ, Tetreault M, Huang KN, Demers-Lamarche J, Bernard G, et al. Diversity of ARSACS mutations in French-Canadians. *Can J Neurol Sci* 2013;40(1):61-6.
- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6(5):387-91.
- Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J Pediatr* 1976;88(3):434-8.
- Zimmern RL et Kroese M. The evaluation of genetic tests. *J Public Health (Oxf)* 2007;29(3):246-50.

ANNEXE A

Essai SNaPshot®



Source : Applied Biosystems, 2009, p. 3.

GÉNOTYPAGE HLA-A, B, C, DRB1 ET DQB1 EN HAUTE RÉOLUTION PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (RÉFÉRENCE – 2014.03.04)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur :** Hôpital Maisonneuve-Rosemont
- 1.2 Date de transmission de la demande d'examen au MSSS :** 26 août 2014
- 1.3 Date de réception de la demande à l'INESSS :** 1^{er} novembre 2014
- 1.4 Date de transmission de l'avis au ministre :** 27 février 2015

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.

Conflit d'intérêts

Le Dr Lambert Busque et la Dr^{re} Annie-Claude Labbé, de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, se retirent au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Séquençage de nouvelle génération (massivement parallèle) des loci HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'analyse proposée par le demandeur vise à séquencer les loci HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 grâce à une approche de nouvelle génération (NGS) pour déterminer les allèles présents chez le receveur et les donneurs potentiels de façon à identifier le meilleur donneur pour une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSC).

L'approche technique est constituée des étapes suivantes et schématisée à l'annexe A :

- Une amplification spécifique des gènes du locus HLA est effectuée par PCR à grande échelle (*Long Range PCR*) avec la trousse NGSgo®-AmpX. La longueur des fragments obtenus se situe entre 0,4 et 5,8 kilobases (kb). Les amorces permettent l'amplification du gène entier de la majorité des HLA de classes I et II (HLA-A, B, C, DQA1, DPA1 et DPB1) à l'exception des gènes HLA-DRB1, DRB3/4/5 et DQB1 dont les exons 2 à 4 (incluant les introns) seulement sont amplifiés.
- La librairie est construite en fragmentant les amplicons générés à l'étape 1. Les fragments sont liés à des adaptateurs de séquences : X-adapters et P-adapters. Les premiers, qui sont biotinylés, contiennent des séquences spécifiques permettant d'associer les fragments à un individu particulier et rendent possible le séquençage

subséquent de plusieurs individus simultanément sur une même micropuce. Les P-adapters permettent la liaison aux IPS (*Ion Sphere Particle*) lors de l'amplification en émulsion. Par la suite, les fragments avec une taille minimale de 400 pb sont sélectionnés à l'aide de billes magnétiques.

- Chaque molécule d'ADN est liée à un IPS par l'intermédiaire du P-adapter. Une amplification clonale en émulsion est effectuée grâce à l'Ion One Touch 2 system™.
- Un enrichissement des IPS couplés à des fragments d'ADN est réalisé par purification sur billes magnétiques recouvertes de streptavidine.
- Chaque IPS individuel est distribué dans un des puits retrouvés sur une micropuce. Les fragments d'ADN recouvrant l'IPS sont ensuite séquencés selon un principe de base similaire à l'approche de Sanger. La séquence nucléotidique de chaque fragment est identifiée au cours de la synthèse cyclique d'un brin complémentaire à la matrice. Par vagues successives, chaque type de nucléotides est mis en contact avec les brins naissant de l'ADN. Si un nucléotide est incorporé dans un puits en particulier, le relâchement d'ion H⁺ est détecté sous la forme d'un changement de pH par le PGM (Personal Genome Machine®). La mesure est quantitative et permet de détecter le nombre d'un même nucléotide incorporé. L'ensemble des cibles pour différents patients sont amplifiées simultanément.
- Finalement, les séquences consensus obtenues sont assemblées et comparées à la banque de données IMGT¹⁰/HLA [Robinson *et al.*, 2013] et le type HLA est assigné. L'analyse bioinformatique est effectuée en parallèle par le logiciel NGSengine® et l'Omixon Target.

2.3 Société ou développeur

La compagnie GenDx produit les trousse HLA-NGS Go® (AmpX, FragX, LibrX et IndX), de même que le logiciel NGSengine® utilisés par le demandeur.

La plateforme de séquençage PGM est fabriquée par Ion Torrent et distribuée par LifeTechnologies. Elle est constituée du PGM, de l'Ion OneTouch2 System® et du Qubit®. Les trousse utilisées pour l'amplification et le séquençage sont produites par la compagnie Ion Torrent et distribuées par LifeTechnologies

Omixon produit le deuxième logiciel bioinformatique (Target) utilisé pour l'assignation des allèles HLA.

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les trousse NGS Go® utilisées par le demandeur sont homologuées CE-IVD par l'Union Européenne (2014-06-24).

2.7 Valeur pondérée : 619,4 (123,9 par locus).

¹⁰ IMGT : International ImMunoGeneTics databases, disponible à : <http://www.imgt.org/>.

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

3.1 Patients ciblés

Les patients en attente d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques et leurs donneurs potentiels.

3.2 Description de la maladie visée

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) est la forme d'immunothérapie tumorale la plus efficace disponible jusqu'à présent. Elle est utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hématologiques ou maladies hématologiques bénignes telles que les aplasies médullaires et les déficits immunitaires. Plusieurs facteurs influencent le succès de la HSCT allogénique; un facteur essentiel étant la compatibilité du système HLA.

Les gènes HLA codent pour des glycoprotéines de surface impliquées dans la présentation des antigènes au système immunitaire (cellules T et NK). Ils constituent donc une composante importante du système immunitaire et sont impliqués dans la réponse aux infections, diverses maladies monogéniques, la susceptibilité aux maladies autoimmunes, les cancers, les effets adverses à certains médicaments et l'induction d'une réponse allo-immune dans un contexte de transfusion et de transplantation [Orange 2008; Gao *et al.*, 2005; Lie et Thorsby, 2005; Mallal *et al.*, 2002; Klein et Sato, 2000; Grakoui *et al.*, 1999].

Le système HLA permet au système immunitaire de distinguer entre les organes et tissus du corps et les substances ou organismes étrangers. Une compatibilité du système HLA est donc essentielle lors d'une HSCT allogénique pour éviter des complications cliniques, telles que le rejet du greffon par l'hôte ou la maladie du greffon versus l'hôte (GVHD) [Eapen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007]. La GVHD (aiguë ou chronique) est une cause majeure de morbidité et de mortalité chez 20 - 80 % des patients et est caractérisée par l'attaque des tissus de l'hôte, particulièrement la peau, le foie et le système gastro-intestinal, par le greffon [revue par Petersdorf, 2013; Horan *et al.*, 2012].

Le locus HLA est une région chromosomique d'environ 4 Mb située sur le chromosome 6p21.3. Les gènes HLA de classes I et II codent respectivement pour les HLA-A, B, C et HLA-DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 [MHC Sequencing Consortium, 1999]. La FACT et l'ASHI¹¹ recommandent le typage des gènes HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 dans un contexte de HSCT.

3.3 Nombre de patients visés

Entre 800 et 1000 analyses devraient être effectuées annuellement. Cette évaluation inclut les génotypages du patient (receveur) et des donneurs potentiels (apparentés).

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Diagnostic moléculaire et hématologie-greffe de cellules souches.

¹¹ FACT : Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy; ASHI : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

3.5 Modalités d'administration du test

Cette analyse est effectuée seulement chez les patients admissibles à une HSCT selon les guides de pratique établis. Elle ne sera donc prescrite que par les hématologues.

Les prélèvements de sang des receveurs et donneurs sont effectués au centre demandeur. L'analyse est effectuée dans le laboratoire de biologie moléculaire par le personnel spécialisé pour le typage HLA. Les résultats sont validés par la direction scientifique et technique et la direction médicale-HLA. Ils sont par la suite révisés et le choix du donneur est effectué par les cliniciens de l'équipe de greffe.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Cette analyse peut être complémentaire au séquençage par Sanger.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le typage des allèles HLA utilise actuellement des approches basées sur l'ADN : le PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*), le PCR-SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotide Probes*) et le SBT (*Sequence Based Typing* ou en français, séquençage de type Sanger) [Erlich, 2012; Dunn, 2011]. Le séquençage de type Sanger est actuellement considéré comme la méthode de référence (*gold standard*). Elle présente toutefois des lacunes ayant un effet potentiellement négatif sur le patient. En effet, des ambiguïtés d'allèles sont retrouvées dans une proportion importante des individus. Ces ambiguïtés proviennent de la restriction des régions investiguées et de l'incapacité à distinguer indépendamment la séquence de chaque allèle (ambiguïté de phase). Elles résultent en une incapacité à assigner un allèle précis, rendant la tâche d'identification d'un donneur compatible plus longue, complexe et coûteuse puisque le laboratoire doit alors avoir recours à l'utilisation de séquençages supplémentaires, de PCR-SSOP, et occasionnellement, à l'envoi de séquençage des locus HLA par NGS (hors Québec) de façon à résoudre les ambiguïtés cliniquement significatives.

Actuellement, seules les séquences les plus polymorphiques codant pour le site de reconnaissance des antigènes (ARS) des molécules HLA sont déterminées de façon routinière (les exons 2 et 3 des HLA de classe I et l'exon 2 des HLA de classe II). Le ciblage de ces régions a été établi en fonction de leur association avec le pronostic de la greffe, de même que des considérations de temps de réponse et budgétaires.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les méthodes de typage actuelles fournissent des résultats ambigus occasionnés par la couverture incomplète des gènes et l'incapacité à déterminer la phase des séquences. Le séquençage selon l'approche par NGS permet de couvrir la quasi-totalité des gènes HLA de classes I et II (introns et exons) par un seul séquençage. De plus, il permet d'obtenir la séquence de chaque allèle indépendamment. Ainsi, la majorité des ambiguïtés est éliminée. Les résultats plus précis et le temps de réponse amélioré engendrés par cette approche permettent une orientation plus rapide du patient vers la greffe.

Les autres avantages du séquençage par NGS proviennent de la réduction du risque d'erreurs de typage dues à une diminution des étapes de manipulation et au fait que tous les gènes ciblés sont séquençés simultanément, de la réduction du temps technique et de la

diminution significative du coût de l'analyse (valeur pondérée 619,4 versus 1175,0 selon l'approche de Sanger)¹².

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement par un autre test : Cette analyse ne remplace aucun test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Les disparités (*mismatches*) entre les typages HLA des donneurs et des receveurs sont associées à une mortalité et à un risque de GVHD accrus [Eapen *et al.*, 2011; Woolfrey *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007; Greinix *et al.*, 2005]. Une amélioration du taux de survie a pu être démontrée par suite de l'introduction de techniques de résolution des allèles à haute résolution [Spellman *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007].

La compatibilité du typage HLA augmente la probabilité de la prise du greffon, réduit les taux de GVHD aiguë et chronique et réduit la mortalité. Le typage à haute résolution par SBT est associé à un meilleur taux de survie et est déjà implanté chez le demandeur. Le changement de technologie demandé vise à réduire le nombre important d'ambiguïtés dans les séquences (chez 51 % des individus) et à réduire le temps de réponse tout en assurant un typage précis permettant un appariement donneur-receveur approprié.

L'analyse proposée n'est pas associée à une valeur diagnostique.

5.1.3 Valeur thérapeutique

La HSCT est indiquée pour plusieurs cancers hématopoïétiques et un certain nombre de maladies hématologiques bénignes. Cette option thérapeutique ne peut toutefois être considérée sans qu'un typage des gènes HLA de classes I et II ne soit effectué et que la compatibilité entre le receveur et le donneur potentiel n'ait été évaluée [FACT, 2015; ASHI, 2014; Bray *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Petersdorf *et al.*, 2007; Petersdorf, 2004].

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			

La validité clinique associée à l'utilisation d'une approche de typage à haute résolution et, plus particulièrement au séquençage de type Sanger, a été démontrée précédemment,

¹² Information transmise par le demandeur.

établissant cette technologie comme méthode de référence au Québec et à l'échelle internationale. Les organismes de réglementation des standards de pratique dictent que, dans la mesure du possible, un typage en haute résolution pour les loci HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 devrait être effectué [FACT, 2015; ASHI, 2014; Spellman *et al.*, 2012].

Le séquençage selon l'approche de Sanger comporte toutefois des lacunes importantes pour le typage HLA en particulier. Une de celles-ci provient du fait que ce type de séquençage fournit des résultats ambigus chez une proportion importante des individus. Ces ambiguïtés rendent complexe l'assignation d'allèles précis et donc l'évaluation de la compatibilité entre le donneur potentiel et le receveur.

Récemment, Ehrenberg et ses collaborateurs [2014] rendaient compte des ambiguïtés dans 50 allèles sur 760 séquencés chez 95 patients (6,6 %). Or, comme 8 allèles avaient été séquencés par patient, l'ensemble de ces ambiguïtés réparties dans la cohorte résulte en un typage imprécis dans au moins un allèle chez 41 individus (43,2 %). Donc, près de la moitié des patients et de leurs donneurs potentiels ne peuvent se faire assigner un typage précis et leur compatibilité ne peut pas être déterminée. Des délais sont donc nécessaires pour résoudre ces ambiguïtés par des séquençages supplémentaires ou d'autres approches résultant en un report du moment de la greffe ou de l'initiation de la recherche d'un donneur approprié (si non apparenté).

Le demandeur rapporte des ambiguïtés de séquences qui rendent incertain le typage de 51 % des 50 échantillons analysés par Sanger contre 1 % de ceux séquencés sur une plateforme PGM de Ion Torrent avec la trousse NGSgo® (GenDx), et ce, malgré le fait que 75-90 % des typages par Sanger avaient subi des manipulations supplémentaires pour diminuer le nombre d'ambiguïtés, contrairement aux séquences NGS. Des taux similaires d'ambiguïtés affectant 41-51 % des patients ont été également signalés par d'autres [Lange *et al.*, 2014; Adams *et al.*, 2004].

En accord avec ces données, dans une étude comparative de séquençage de 37 975 échantillons par Sanger et par séquençage NGS sur une plateforme MiSeq, Lange et ses collaborateurs [2014] ont obtenu un taux d'assignation des allèles moyen de 95,0 % avec l'approche de Sanger contre 98,8 % grâce au NGS (voir la figure 1).

Figure 1 Taux d'assignation des allèles dans 37 975 échantillons

Table 1 Resolution in comparison with Sanger based sequencing		
Locus	Sanger	NGS
A	90.4%	99.8%
B	95.0%	97.6%
C	92.3%	95.7%
DPB1	99.8%	99.9%
DQB1	95.7%	100.0%
DRB1	96.6%	100.0%
Average	95.0%	98.8%
Rate of high resolution typing results. Resolution of 37,975 samples typed by the proposed NGS approach in September 2013 was compared with 145,932 samples analyzed by Sanger sequencing in 2012. In accordance with the standards of the European Federation for Immunogenetics (EFI), we refer to allele typing results with no ambiguities in the antigen recognition site as "high resolution".		

Source : Lange *et al.*, 2014.

Aucune étude officielle démontrant un avantage clinique de l'approche NGS n'a été repérée. L'application de cette technologie au séquençage des locus HLA est un développement récent. Toutefois, plusieurs grands centres ont implanté ou sont en voie d'implanter du séquençage par NGS comme en témoignent la littérature scientifique publiée et les données de validation présentées lors de rencontres scientifiques [Zhou *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012¹³]. Le NMDP (National Marrow Donor Program), l'American Red Cross, le registre du China Marrow Donor Program (CMDP) et le DKMS (German Bone Marrow Donor Center) figurent parmi les centres ayant implanté le NGS pour le typage HLA.

5.3 Validité analytique (ou technique)

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

Le système HLA est un des plus polymorphiques retrouvé chez l'humain; plus de 12 540 allèles ont été décrits jusqu'à présent¹⁴. Les polymorphismes sont constitués de polymorphisme d'un nucléotide (SNP), de substitutions, de délétions/d'insertions, de séquences courtes répétées en tandem (*short tandem repeats*, microsatellites) et de variations dans le nombre de copies (CNV) [revue par Petersdorf, 2013; Robinson *et al.*, 2013]. De plus, cette région contient des duplications segmentales et plusieurs pseudogènes. La détermination des allèles présents nécessite donc, lors d'une approche par séquençage, une taille minimale de fragment qui permet l'appariement des séquences et l'obtention d'une séquence consensus. Les études de faisabilité de l'implantation de séquençage NGS pour le génotypage HLA sont récentes et en ont démontré la faisabilité. Depuis, une évolution rapide des chimies, des plateformes et des outils de bioinformatique a permis d'améliorer la performance du séquençage des gènes HLA sur différentes plateformes dont le MiSeq d'Illumina et le PGM de Ion Torrent. La méthodologie a également été simplifiée et standardisée, et le coût est maintenant inférieur à celui de la SBT, facilitant l'implantation du NGS en clinique. Devant les progrès et développements rapides qui se poursuivent, les études retrouvées dans la littérature scientifique font état fréquemment des performances de technologies vétustes au moment de leur publication. Toutefois, elles peuvent fournir une indication sur la performance de l'approche. Le tableau 1 contient les critères évalués dans le cadre de différentes études récentes de validation présentées au dernier congrès de l'ASHI¹³.

¹³ American Society of Histocompatibility and Immunogenetics: 40th Annual Meeting Abstracts, October 20-24, 2014, Denver, Colorado. Human Immunology 2014;75(Suppl):1-148 (les résumés sont aussi disponibles à : <http://www.ashi-hla.org/abstracts/2014/>).

¹⁴ EMBL-EBI. IPD – IMGT/HLA: Statistics [site Web]. Disponible à : <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (consulté le 24 janvier 2015).

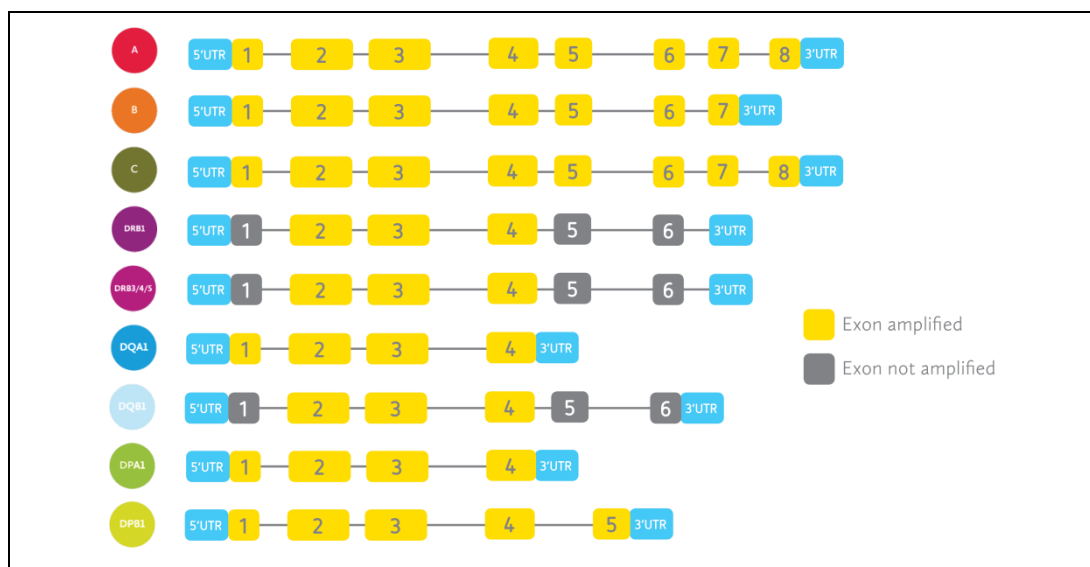
Tableau 1 Études de validation du typage HLA sur plateforme NGS (présentées au congrès de l'ASHI en 2014)

ÉTUDES	TROUSSE AMPLIFICATION	PLATEFORME	LOGICIEL	GÈNES SÉQUENCÉS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	CRITÈRE ÉVALUÉ
Ozaki <i>et al.</i> , OR02			GenDx (NGSengine v.1.2) Omixon (Target v.1.6.0) SeaBass	HLA-A, B, C DRB1, 3, 4, 5' DQA1 DQB1 DPA1 DPB1	300	Concordance : 100 % avec les techniques : SBT, PCR-SSOP, etc.
Lind <i>et al.</i> , OR04		MiSeq (Illumina)	Omixon (Target) GenDx (NGSengine)	HLA-A, B, C DRB1 DQB1	16 dans 6 laboratoires indépendants	Reproductibilité : 99,4 %
Davis <i>et al.</i> , OR03		PGM (Ion Torrent)	Omixon (Target) ThermoFisher (prototype)	HLA-A, B, C DRB1 DPB1 DQB1	122	Reproductibilité intra-essai : 98 % Reproductibilité inter-essai : 100 % Concordance avec SBT : Assignment avec logiciel seul : 85-95 % Assignment avec vérification manuelle : HLA-A et C : 100 % HLA-B : 98,6 % DPB1 : 99,5 % DQB1 : 96,6 %
Jabara <i>et al.</i> , P092	GenDx	MiSeq (Illumina)	GenDx (NGSengine v1.4.0) Omixon (Target v 1.8.0)	HLA-A, B, C DRB1 DQB1 DPB1	30	Concordance : 99,7 %
Yamamoto <i>et al.</i> , P113	maison	454 (Roche Diagnostic)		HLA-A, B, C (exons 2,3) DRB1 (exon 2) DRB3/4/5 DQB1	59	Concordance : 100 % avec SSP et SSOP
Yin <i>et al.</i> , P100		MiSeq (Illumina)	Omixon (Target)	HLA-A, B, C DRB1 DQB1 DPB1	72	Concordance : 99,1 % avec SBT

Abréviations : OR : présentation orale; P : présentation par affiche; PCR-SSP : sequence specific primers; PCR-SSOP : sequence specific oligonucleotide probes; SBT : sequence based typing ou séquençage de type Sanger.

Le demandeur prévoit utiliser la trousse NGSgo qui permet l'amplification des différents gènes HLA. Le séquençage est effectué sur la plateforme PGM d'ionTorrent et l'assignation des allèles est effectuée à l'aide de 2 logiciels suivants : NGSengine et Omixon Target. Selon les informations fournies par GenDx, la trousse permet l'amplification des gènes entiers de la classe I (introns et exons) et d'une région plus restreinte des HLA de classe II (Figure 2). Les régions amplifiées excèdent les recommandations minimales de l'European Federation of Immunogenetics Standards for histocompatibility and immunogenetics testing (version 6.0) [EFI, 2012] et de l'ASHI.

Figure 2 Régions amplifiées par la trousse NGSgo (GenDx)



Source : GenDx. Ion Torrent Workflow: Target generation (NGSgo®-AmpX) [site Web]. Disponible à : <http://www.gendx.com/it-target-generation>.

L'analyse a été mise au point et validée par le demandeur selon les normes de l'ASHI [Hahn *et al.*, 2000].

Reproductibilité

Déjà en 2011, Holcomb et ses collaborateurs [2011] ont évalué la reproductibilité du séquençage de 20 échantillons dans 8 centres possédant des niveaux variables d'expérience avec la plateforme GSFLX de 454 Life Sciences (Roche Diagnostics). Quatre-vingt-cinq pourcent des allèles ont pu être assignés et 3,7 % des loci ont dû subir une assignation manuelle. La concordance moyenne a été évaluée à 97,2 % (95,3-99,4 %).

Lors du congrès de l'ASHI à Denver en 2014), Lind et ses collaborateurs [2014, OR04] ont présenté une étude de concordance des résultats obtenus pour 16 échantillons analysés dans 6 laboratoires en double aveugle sur la plateforme MiSeq. Une concordance de 99,4 % a été obtenue. Une contamination croisée d'un exon était à l'origine de la seule discordance.

Le demandeur a effectué une évaluation de la reproductibilité de l'analyse en comparant les résultats obtenus pour 21 échantillons entre leur laboratoire et le laboratoire de référence (Héma-Québec). L'étude a été effectuée à l'aveugle. Ils ont obtenus une concordance de 100 %.

Sensibilité analytique

L'approche par NGS permet la détection de variations ponctuelles ainsi que de délétions et d'insertions mineures. Le demandeur a évalué la sensibilité de la technique grâce à un test de dilutions sériées. Le seuil de détection d'allèles variants est d'environ 3,5 %. Les proportions des allèles détectés lors d'un typage HLA se situent généralement à 50 % ou à 100 % (présence hétérozygote ou homozygote). La sensibilité est donc suffisante pour établir un génotype. Le demandeur mentionne que les allèles considérés lors de l'analyse sont ceux constituant entre 20 % et 100 % des allèles de façon à pallier à l'amplification préférentielle de certaines séquences.

Aucune recommandation sur la profondeur de lecture nécessaire pour un séquençage NGS n'a été formulée par les organismes réglementaires. Toutefois, Gabriel et ses collaborateurs [2014] et Wang et ses collaborateurs [2012] recommandent 20 lectures par séquence. Le demandeur a établi à 50 le nombre minimal acceptable de lectures.

Spécificité analytique

Le demandeur a effectué l'analyse de 50 échantillons. Parmi les 496 allèles analysés (5 locus, 248 typages après exclusion de 2 typages HLA-DRB1, 2 allèles par typage, 496 allèles au total), aucun allèle erroné ou faux variant n'a été identifié lors du processus d'assignation des allèles utilisant la base de données internationales IMGT/HLA. La spécificité a donc été évaluée à 100 %.

Concordance

Une étude de concordance effectuée par le demandeur a permis de déterminer que les séquences obtenues pour 50 échantillons (5 locus, 248 typages après exclusion de 2 typages HLA-DRB1, 2 allèles par typage, 496 allèles au total) par NGS concordaient avec les résultats obtenus précédemment par Sanger. Les échantillons présentaient des typages variés, incluant des allèles peu communs ou des homozygotes à plusieurs loci. La concordance était de 100 % (voir le tableau ci-dessous).

Le tableau 2 contient certaines études de concordance effectuées au cours des 2 dernières années.

Tableau 2 Études de concordance de typage HLA publiées au cours des 2 dernières années

ÉTUDE	PLATEFORME	TROUSSE D'AMPLIFICATION	GÈNES ANALYSÉS	APPROCHE INITIALE	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	CONCORDANCE	COMMENTAIRES
Wang <i>et al.</i> , 2012	GA-Ilx (Illumina) HiSeq (Illumina) MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DRB1	IHWG*	40 (lignées cellulaires)	99 %	Lors de discordance, validation par Sanger des résultats NGS
Cao <i>et al.</i> , 2013	MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DQB1 DRB1	SBT	96	100 %	
Danzer <i>et al.</i> , 2013	454 – GSJunior (Roche Diagnostics)	Maison	HLA-A, B, C DPB1 DRB DQB1	SBT	173 (1273 loci)	100 %	Red Cross Transfusion Services for Upper Austria Une réduction des ambiguïtés de 93,5 % est précisée
Ehrenberg <i>et al.</i> , 2014	MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DRB1	SBT	96	100 %	
Lange <i>et al.</i> , 2014	MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DRB1 DQB1 DPB1	SBT	1140	100 %	DKMS (German Bone Marrow Donor Center)
Smith <i>et al.</i> , 2014	MiSeq (Illumina)	Scisco Genetics	DRB1 DRB3/4/5, DQA1 DQB1 DPA1 DPB1	SSOP SSP SBT	2523	99,5 %	
Zhou <i>et al.</i> , 2015	HiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, -B, -C DRB1 DQB1	SBT	> 1500	99,7 %	Registre du China Marrow Donor Program (CMDP)
					470	100 %	

Abréviations : PCR-SSP : sequence specific primers; PCR-SSOP : sequence specific oligonucleotide probes; SBT : sequence based typing ou séquençage de type Sanger.

*International Histocompatibility Working Group (<http://www.ihwg.org/>).

Contrôles de qualité externe

Le laboratoire participe au programme de qualité externe offert par l'ASHI. Les épreuves de génotypage à haute résolution sont bisannuelles.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation officielle ne promeut l'implantation du NGS comme technique de typage à haute résolution actuellement. Toutefois, l'ASHI a émis ses normes de validation de la technologie.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : Il n'a pas été analysé.

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

L'introduction de la technologie proposée par le demandeur pour effectuer le typage à haute résolution aurait le potentiel de réduire les coûts associés à cette analyse dont la valeur pondérée est presque la moitié de l'analyse faite par Sanger.

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

Ils n'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La compatibilité HLA entre le donneur et le receveur est essentielle pour favoriser l'implantation de la greffe et limiter la GVHD ainsi que les autres morbidités et la mortalité associées à la greffe. Le demandeur propose un changement de technologie permettant d'obtenir le séquençage des gènes HLA, dans un contexte de HSCT, par NGS plutôt que selon l'approche de Sanger tel qu'il est effectué actuellement. Cette dernière génère des ambiguïtés qui rendent complexe le typage HLA précis chez environ la moitié des individus. Des analyses et donc des coûts et des délais supplémentaires sont nécessaires pour résoudre les ambiguïtés significatives d'un point de vue clinique. Il en résulte des délais pour l'orientation du patient vers la greffe.

7.2 Validité clinique

Le séquençage selon l'approche NGS permet de réduire à environ 1 % la proportion des individus chez lesquels des ambiguïtés sont détectées. La technologie proposée favorise donc un meilleur temps de réponse et une plus grande précision en ce qui concerne la compatibilité entre un receveur et un donneur potentiel.

7.3 Validité analytique

Une validation extensive effectuée par le demandeur a permis de déterminer une performance similaire ou supérieure de la nouvelle technologie sur les divers critères évalués.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation officielle ne promeut l'implantation du NGS comme technique de typage à haute résolution actuellement. Toutefois, l'ASHI a émis ses normes de validation de la technologie.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Génotypage HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 en haute résolution par séquençage de nouvelle génération

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

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

Recommandation additionnelle

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

RÉFÉRENCES

- Adams SD, Barracchini KC, Chen D, Robbins F, Wang L, Larsen P, et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: When precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *J Transl Med* 2004;2(1):30.
- American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI). Standards for accredited laboratories: 2014 revised standards approved by the ASHI Board of Directors. Mt. Laurel, NJ : ASHI; 2014. Disponible à : <http://www.ashi-hla.org/images/uploads/2014ASHIStandardsandGuidance.pdf>.
- Bray RA, Hurley CK, Kamani NR, Woolfrey A, Muller C, Spellman S, et al. National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(9 Suppl):45-53.
- Cao H, Wang Y, Zhang W, Chai X, Zhang X, Chen S, et al. A short-read multiplex sequencing method for reliable, cost-effective and high-throughput genotyping in large-scale studies. *Hum Mutat* 2013;34(12):1715-20.
- Danzer M, Niklas N, Stabentheiner S, Hofer K, Proll J, Stuckler C, et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: A transition from research to diagnostics. *BMC Genomics* 2013;14:221.
- Davis K, Saito Y, Barone J, Johnson ES, Beutner K, Dong W, et al. HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):3 [abstract OR03].
- Dunn PP. Human leucocyte antigen typing: Techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet* 2011;38(6):463-73.
- Eapen M, Klein JP, Sanz GF, Spellman S, Ruggeri A, Anasetti C, et al. Effect of donor-recipient HLA matching at HLA A, B, C, and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: A retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011;12(13):1214-21.
- Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: A comparison study. *Lancet* 2007;369(9577):1947-54.
- Ehrenberg PK, Geretz A, Baldwin KM, Apps R, Polonis VR, Robb ML, et al. High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. *BMC Genomics* 2014;15:864.
- Erlich H. HLA DNA typing: Past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012;80(1):1-11.
- European Federation of Immunogenetics (EFI). Standards for histocompatibility and immunogenetics testing. Version 6.0. EFI; 2012. Disponible à : <http://www.efiweb.eu/index.php?id=102>.

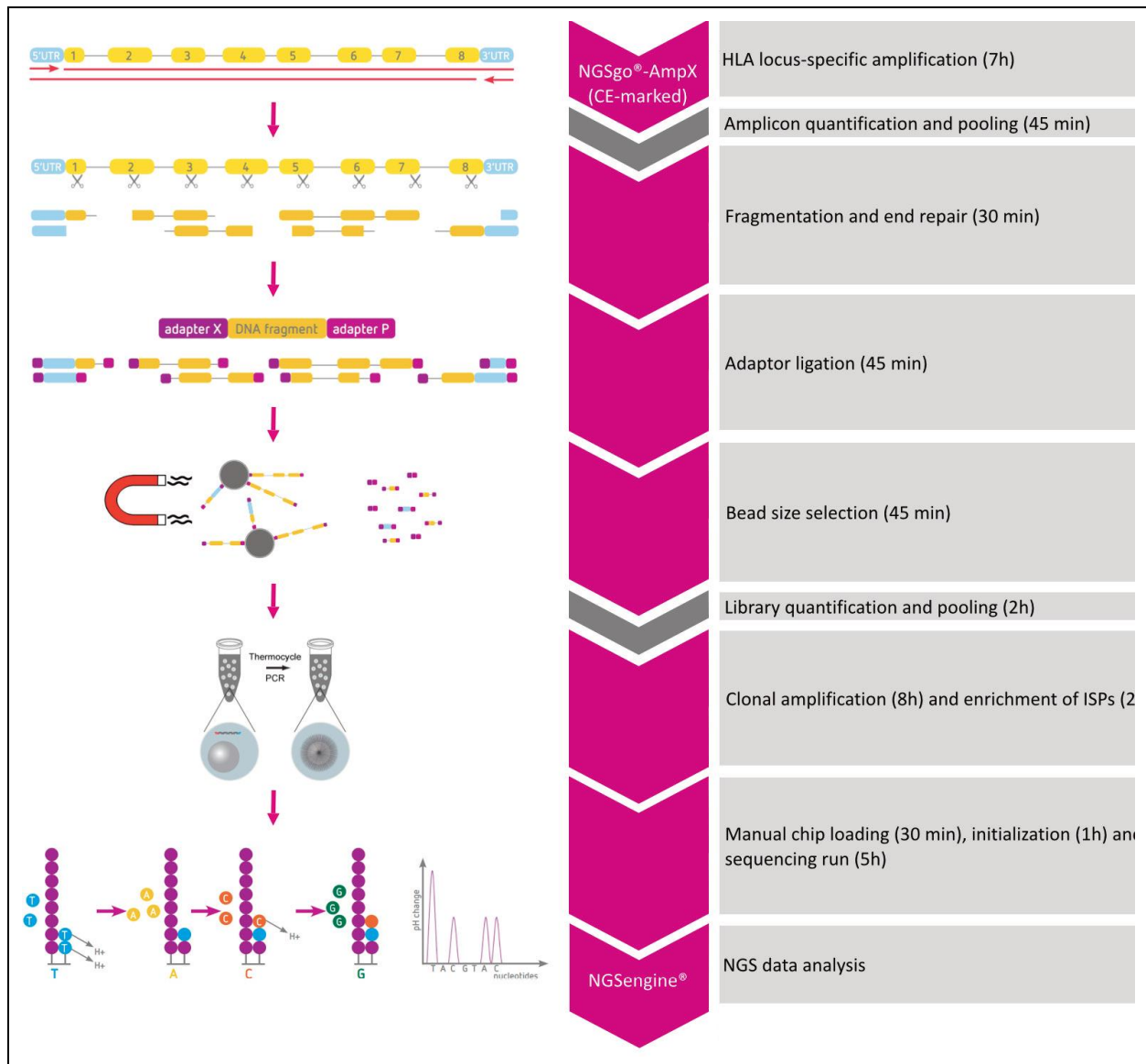
- Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT). FACT-JACIE international standards for hematopoietic cellular therapy product collection, processing, and administration. Sixth edition. Omaha, NE : FACT; 2015. Disponible à : <http://www.jacie.org/standards/6th-edition-2015>.
- Gabriel C, Furst D, Fae I, Wenda S, Zollkofer C, Mytilineos J, Fischer GF. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens* 2014;83(2):65-75.
- Gao X, Bashirova A, Iversen AK, Phair J, Goedert JJ, Buchbinder S, et al. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2005;11(12):1290-2.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285(5425):221-7.
- Greinix HT, Fae I, Schneider B, Rosenmayr A, Mitterschiffthaler A, Pelzmann B, et al. Impact of HLA class I high-resolution mismatches on chronic graft-versus-host disease and survival of patients given hematopoietic stem cell grafts from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(1):57-62.
- Hahn AB, Land GA, Strothman RM. ASHI laboratory manual. Fourth edition. Mt. Laurel, NJ : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI); 2000.
- Holcomb CL, Hoglund B, Anderson MW, Blake LA, Bohme I, Egholm M, et al. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens* 2011;77(3):206-17.
- Horan J, Wang T, Haagenson M, Spellman SR, Dehn J, Eapen M, et al. Evaluation of HLA matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for nonmalignant disorders. *Blood* 2012;120(14):2918-24.
- Jabara C, Domanus M, Kim DH, Ho S, Adema J, Westerink N, Marlowe N. Performance evaluation of high resolution 11 loci HLA-typing prototype assay using NGS technology. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):116 [abstract P092].
- Klein J et Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(11):782-6.
- Lange V, Bohme I, Hofmann J, Lang K, Sauter J, Schone B, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* 2014;15:63.
- Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110(13):4576-83.
- Lie BA et Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2005;17(5):526-31.

- Lind C, Ferriola D, Huynh A, Duke J, Papazoglou A, Aska M, et al. A multi-center study using next-generation sequencing (NGS) for HLA genotyping. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):4 [abstract OR04].
- Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 2002;359(9308):727-32.
- MHC Sequencing Consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC Sequencing Consortium. *Nature* 1999;401(6756):921-3.
- Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):713-25.
- Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Ito S, Okudaira Y, Masuya A, et al. Development of advanced NGS based HLA DNA typing method: SS-SBT. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):2 [abstract OR02].
- Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: A model for understanding graft-versus-host disease. *Blood* 2013;122(11):1863-72.
- Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2004;11(6):386-91.
- Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med* 2007;4(1):e8.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004;104(9):2976-80.
- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D1222-7.
- Smith AG, Pyo CW, Nelson W, Gow E, Wang R, Shen S, et al. Next generation sequencing to determine HLA class II genotypes in a cohort of hematopoietic cell transplant patients and donors. *Hum Immunol* 2014;75(10):1040-6.
- Spellman S, Setterholm M, Maier M, Noreen H, Oudshoorn M, Fernandez-Vina M, et al. Advances in the selection of HLA-compatible donors: Refinements in HLA typing and matching over the first 20 years of the National Marrow Donor Program Registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(9 Suppl):37-44.
- Spellman SR, Eapen M, Logan BR, Mueller C, Rubinstein P, Setterholm MI, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood* 2012;120(2):259-65.
- Wang C, Krishnakumar S, Wilhelmy J, Babrzadeh F, Stepanyan L, Su LF, et al. High-throughput, high-fidelity HLA genotyping with deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(22):8676-81.

- Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(6):885-92.
- Yamamoto F, Holcomb CL, Goodridge D, Anderson MW, Erlich HA, Tyan DB, Fernandez-Vina MA. HLA high resolution genotyping using 454 NGS and GS GType HLA assay. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):129 [abstract P1-13].
- Yin Y, Lan JH, Reed EF, Zhang Q. Long range NGS HLA typing is accurate in the identification of common, rare, and novel alleles. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):120 [abstract P1-00].
- Zhou M, Gao D, Chai X, Liu J, Lan Z, Liu Q, et al. Application of high-throughput, high-resolution and cost-effective next generation sequencing-based large-scale HLA typing in donor registry. *Tissue Antigens* 2015;85(1):20-8.

ANNEXE A

Processus de séquençage des gènes HLA par NGS



Source : GenDx. Accurate HLA typing by NGS using the IonTorrent PGM with a platform specific developed and tested workflow [affiche présentée au congrès de l'ASHI à Denver en 2014]. Disponible à : <http://www.gendx.com/downloads/posters/GenDx%20ASHI%20posters%202014%20Ion%20Torrent.pdf>.

STATUT MUTATIONNEL DU *FGFR3* DANS LES CAS D'ACHONDROPLASIE-HYPOCHONDROPLASIE (EXONS 10 ET 13) ET DE DYSPLASIE THANATOPHORE DE TYPE I ET II (EXONS 7, 10, 15, 19) PAR SÉQUENÇAGE DE TYPE SANGER (RÉFÉRENCE – 2014.03.06)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission des demandes d'examen au MSSS** : 1^{er} octobre 2014
- 1.3 **Date de réception des demandes à l'INESSS** : 1^{er} novembre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

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 cyclique de type Sanger des exons 10 et 13 du gène du récepteur 3 du facteur de croissance des fibroblastes (*FGFR3*) dans les cas d'achondroplasie (Ach) ou d'hypochondroplasie (Hch) ou des exons 7, 10, 15 et 19 dans les cas de dysplasie thanatophore (TD) de types I et II.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le séquençage de certains exons ciblés du gène *FGFR3* permet de détecter la présence de variations associées à l'étiologie génétique de l'Ach, de l'Hch et des TD de types I et II (TDI et TDII).

Les régions d'intérêt sont amplifiées par réaction de PCR à l'aide d'une trousse maison. Par suite de la purification du produit grâce à la trousse ExoSAP-IT®, une réaction de séquence cyclique de type Sanger est effectuée (trousse Big Dye Terminator v3.1). Les produits de réaction purifiés à l'aide de la trousse BigDye XTerminator sont alors séparés selon leur taille par électrophorèse sur capillaire et la séquence est résolue et analysée. Les variations observées sont classifiées selon les recommandations de l'ACMG et du CCMG¹⁵.

¹⁵ American College of Medical Genetics et Collège canadien de généticiens médicaux.

2.3 Société ou développeur

La réaction de PCR est effectuée à l'aide d'un essai maison et la réaction de séquençage est effectuée grâce à la trousse Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies).

La trousse de purification des produits de PCR est produite par USB et distribuée par Affimetrix (ExoSAP-IT). La purification de la réaction de séquence est effectuée grâce à la trousse XTerminator produite par Applied Biosystems (Life Technologies).

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les réactifs, trousse et appareillage utilisés dans le cadre de cette analyse n'ont pas fait l'objet d'homologation de la part de Santé Canada ou de la FDA.

2.7 Valeur pondérée

- Dysplasie thanatophore de types I et II : 198,17;
- Achondroplasie-hypochondroplasie : 157,19.

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

3.1 Patients ciblés

Ces analyses seront effectuées chez les adultes, enfants ou fœtus en présence de caractéristiques cliniques (physiques, échographiques ou radiologiques) suggérant la présence de l'Ach, de l'Hch ou des TD. Les parents d'enfants ou de fœtus atteints seront occasionnellement soumis à cette analyse.

3.2 Description des maladies visées

L'Ach, l'Hch et les TDI et TDII font partie de plus de 450 types de dysplasies squelettiques (DS ou ostéochondrodysplasies) qui affectent le développement du tissu chondro-osseux. L'International Skeletal Dysplasia Society (ISDS)¹⁶ a proposé une classification des DS selon leurs caractéristiques cliniques, radiologiques et moléculaires [Warman *et al.*, 2011]. Dans le cadre de cette classification, l'Ach, l'Hch et les TD font partie du premier sous-groupe constitué des chondroplasies causées par des mutations dans le gène *FGFR3* (MIM 134934). Le tableau 1 contient l'ensemble des maladies regroupées dans cette catégorie.

¹⁶ Site Web de l'ISDS : <http://www.isds.ch/>.

Tableau 1 Groupe d'osteocondroplasies associées à *FGFR3*

NOM DE LA MALADIE*	MIM	PRÉVALENCE PAR NOMBRE DES NAISSANCES	COMMENTAIRE
Dysplasie Thanatophore de type I	187600	0,09 à 0,43/10 000 (1/111 111-1/23 256)‡	
Dysplasie Thanatophore de type II	187601		
SADDAN (Achondroplasie sévère- délai développemental-acanthosis nigricans)	Voir 187600	< 1/1 000 000§	
Achondroplasie	100800	0,13 à 0,64/10 000 (1/77 000 – 1/15 625)‡	
Hypochondroplasie	146000	0,30 à 0,45/10 000 (1/33 000-1/22 222)‡§	
Dysplasie de type hypochondroplasie			Similaire à Hch mais non associée à <i>FGFR3</i> et sans critères diagnostiques précis
Syndrome CATSHL (camptodactylie- grande taille- déficience auditive)	610474	< 1/1 000 000§	

Adapté de Warman *et al.*, 2011.

* Toutes ces maladies sont transmises selon un mode autosomique dominant.

‡ Barbosa-Buck *et al.*, 2012; Stevenson *et al.*, 2012; Waller *et al.*, 2008; Orioli *et al.*, 1986.

§ Le Merrer, 2008.

L'Ach, l'Hch et les TD I et II se caractérisent par une petite taille disproportionnée (la longueur des membres étant disproportionnée par rapport à la longueur du tronc). Ces maladies peuvent avoir une composante héréditaire et sont alors transmises selon un mode autosomique dominant avec une pénétrance complète. Toutefois, la vaste majorité des cas résulte de mutations *de novo*; 80-85 % des cas d'achondroplasie sont sporadiques, tout comme la quasi-totalité des cas de TD [Horton *et al.*, 2007; Vajo *et al.*, 2000; Bellus *et al.*, 1995].

Achondroplasie

Plus de 90 % des cas de nanisme de forme disproportionnée sont atteints d'Ach [Vajo *et al.*, 2000; Orioli *et al.*, 1995]. Un ensemble de critères cliniques, échographiques, radiologiques et moléculaires permettent de reconnaître la maladie lors du suivi prénatal (généralement à l'échographie de 3^e trimestre) ou à la naissance [Alanay et Lachman, 2012]. Ces critères comprennent une réduction de la longueur des membres (particulièrement de la partie proximale), une macrocéphalie avec front proéminent et une hypoplasie de la partie moyenne du visage.

Au cours de la petite enfance, une hypotonie est typique avec développement moteur anormal. Plusieurs comorbidités sont associées à l'Ach : lordose lombaire, compression de la moelle épinière au niveau de la jonction crano-cervicale, apnée du sommeil et apnée centrale, sténose spinale pouvant provoquer des déficits neurologiques et signes pyramidaux. Des otites moyennes chroniques récurrentes peuvent occasionner des troubles de l'audition [Laederich et Horton, 2012; Carter *et al.*, 2007; Hall, 1988; Hecht *et al.*, 1987].

L'espérance de vie de ces patients a été évaluée inférieure à la normale de 10 ans en 1987 (61 ans versus 71 ans) et les taux de mortalité sont supérieurs à tous les âges. Une prévalence accrue d'accidents mortels, de maladies cardiovasculaires et d'incidents neurologiques semblent être à l'origine de cette tendance. Chez l'adulte âgé de 25 à 35 ans, le risque de décès des conséquences de maladies cardiovasculaire est 10 fois celui de la population générale [Wynn *et al.*, 2007 ; Hecht *et al.*, 1987].

Hypochondroplasie

Quoiqu'elle soit apparentée à l'Ach, l'Hch représente une forme généralement plus légère de DS. Toutefois, une hétérogénéité dans sa présentation clinique, radiologique et moléculaire est signalée et certaines caractéristiques phénotypiques recoupent celles de l'Ach [Song *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2003; Lemyre *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 1998; Prinster *et al.*, 1998; Wynne-Davies *et al.*, 1981]. Certains cas se présentent avec une gravité similaire à l'Ach alors que d'autres ne sont diagnostiqués qu'à la naissance d'un enfant plus gravement atteint. Elle diffère de l'Ach par l'absence de dysmorphisme facial, une taille moins réduite et des disproportions squelettiques moins prononcées. Les comorbidités telles la sténose spinale, l'incurvation du tibia et l'apnée du sommeil obstructive sont moins fréquentes que dans l'Ach. Toutefois, la déficience intellectuelle, les problèmes d'apprentissage et l'épilepsie pourraient être plus prévalents [Linnankivi *et al.*, 2012].

Les caractéristiques moins prononcées que celles de l'Ach, l'hétérogénéité phénotypique et l'absence de critères diagnostiques bien établis rendent parfois le diagnostic complexe et certains cas légers peuvent être sous-diagnostiqués et considérés comme des cas de petite taille constitutionnelle [Song *et al.*, 2012; Appan *et al.*, 1990]. Ainsi, alors que les cas les plus graves peuvent être diagnostiqués en période prénatale au 3^e trimestre, d'autres ne le seront que vers l'âge de 2 à 4 ans [Panda *et al.*, 2014; Maroteaux et Falzon, 1988].

Dysplasie thanatophore de types I et II (TDI et TDII)

La TD est une forme de DS, létale en période périnatale dans la presque totalité des cas. Une insuffisance respiratoire secondaire en raison de la réduction de la capacité thoracique ou de la compression du tronc cérébral est généralement en cause. Selon la littérature, quelques individus ont survécu jusqu'à l'enfance, grâce à des interventions médicales extensives [Kuno *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 1997].

La TD est généralement diagnostiquée lors d'échographies prénatales de 2^e trimestre. Récemment, avec une augmentation des échographies de fin de premier trimestre, plusieurs cas ont été diagnostiqués à cette période et quelques études suggèrent une association entre la clarté nucale accrue et la TD [Zhen *et al.*, 2015; Chitty *et al.*, 2013].

Deux formes distinctes de TD ont été décrites. La présence de micromélie¹⁷, d'hypoplasie thoracique (poitrine étroite) et de macrocéphalie, un faciès distinctif, des plis de peau redondants et la présence d'hypotonie sont communs aux 2 types [Wilcox *et al.*, 1998]. La TDI, la forme la plus fréquente, est associée à la présence de fémurs recourbés et d'un crâne en forme de trèfle (*cloverleaf*) plus ou moins marqué dans certains cas. Dans la TDII, les fémurs sont droits mais courts et le crâne en trèfle de modéré à sévère.

¹⁷ Raccourcissement de tous les segments du membre.

3.3 Nombre de patients visés

Pour desservir sa clientèle, le demandeur prévoit effectuer 20 séquençages des exons 7, 10, 15 et 19 du gène *FGFR3* annuellement et 20 séquençages des exons 10 et 13.

L'introduction de ces analyses au *Répertoire québécois* pourrait augmenter le volume annuel à 40 pour chacune des analyses.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Génétique médicale, pédiatrie, orthopédie, imagerie médicale, physiatrie, gynécologie/obstétrique.

3.5 Modalités d'administration du test

Le demandeur n'a pas établi un algorithme de prescription. Toutefois, il spécifie que dans la totalité des cas de diagnostic prénatal et dans la très grande majorité des cas pédiatriques, les requêtes pour ces analyses sont présentées par un médecin généticien. Des demandes proviennent également d'orthopédistes ou de physiatres qui assurent le suivi de patients pédiatriques.

Le type d'échantillon testé dépend du patient (sang, fluide amniotique, biopsies chondriales). Le traitement préanalytique, le test et son interprétation seront effectués dans le laboratoire de diagnostic moléculaire du demandeur.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : Unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Les dysplasies squelettiques (DS) sont généralement diagnostiquées par des caractéristiques cliniques, échographiques et radiologiques [Panda *et al.*, 2014; Alanay et Lachman, 2011; Krakow *et al.*, 2009; Schramm *et al.*, 2009]. Dans certains cas, l'analyse du statut mutationnel de certains gènes peut contribuer à la confirmation du diagnostic de la TD, de l'Ach et de l'Hch [Alanay et Lachman, 2011; Trotter et Hall, 2005].

Diagnostic prénatal

Plusieurs DS peuvent être soupçonnées lors des examens d'échographie effectués en cours de grossesse. La sensibilité et la spécificité de détection est dépendante du type de la maladie et de la présence d'antécédents familiaux.

Quelques études rétrospectives ont évalué la précision du diagnostic prénatal. Une étude prospective de 500 cas provenant de l'International Skeletal Dysplasia Registry a évalué à 96,8 % la capacité à prédire avec exactitude la létalité [Krakow *et al.*, 2008]. D'autres études récentes estiment l'exactitude de ces prédictions entre 81 % et 100 %. Toutefois, l'obtention d'un diagnostic exact ou partiel est observée dans 31-78 % des cas en considérant l'ensemble des dysplasies. Un taux de faux positifs de 0,07 % a également été noté [Stevenson *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2011; Schramm *et al.*, 2009; Witters *et al.*, 2008; Krakow *et al.*, 2008; Ngo *et al.*, 2007; Doray *et al.*, 2000; Tretter *et al.*, 1998]. Schramm [2009] et Witters [2008] et leurs collaborateurs rendent compte d'un diagnostic prénatal correct dans 78-100 % des cas d'Ach et 87-100 % dans les cas de TD. Les taux précisés reflètent le chevauchement phénotypique observé entre certaines DS; comme l'Ach et la TD lors d'examens prénataux et l'Hch et l'Ach chez les enfants et adultes [Panda *et al.*, 2014].

La TD est fréquemment soupçonnée au 2^e trimestre [Di Biasio *et al.*, 2000] alors que l'Ach et certains cas graves d'Hch le seront au 3^e trimestre [Baujat *et al.*, 2008]. L'observation de membres courts (< au 5^e percentile), d'un diamètre bipariétal > 95^e percentile et d'un pont nasal abaissé orienteront le diagnostic vers l'Ach. Les cas les moins graves d'Hch ne sont pas détectés en prénatal.

Les tests moléculaires, comme l'analyse du statut mutationnel de gènes ciblés, le caryotype ou l'hybridation génomique comparative (CGH), peuvent également être effectués pour confirmer le diagnostic. Ils nécessitent toutefois le recours à des procédures invasives telles que l'amniocentèse et la biopsie chorale.

Il est intéressant de noter que certaines études ont rapporté avoir eu recours à l'ADN fœtal circulant chez la mère pour évaluer le statut mutationnel de *FGFR3* chez le fœtus, évitant ainsi le recours à des approches invasives et comportant certains risques [Lewis *et al.*, 2014; Chitty *et al.*, 2013; Lim, 2011 *et al.*; Li *et al.*, 2007].

Diagnostic de la population pédiatrique ou adulte

Le diagnostic de l'Ach et de la TD, s'il n'a pas été effectué en prénatal, serait effectué à la naissance; la présentation clinique étant caractéristique. Le moment du diagnostic de l'Hch est variable en fonction de la gravité du cas et est parfois effectué seulement vers 2 à 4 ans ou même plus tard [Saito *et al.*, 2012].

Diagnostic moléculaire

Actuellement, les analyses du statut mutationnel du gène *FGFR3* à des fins de confirmation de diagnostic sont effectuées hors Québec.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

L'analyse proposée vise à confirmer les diagnostics dans tous les cas de TD, d'Ach ou d'Hch soupçonnés chez des patients pédiatriques ou adultes ou en prénatal.

Les analyses proposées sont actuellement effectuées hors Québec pour un coût supérieur à celui proposé par le demandeur. Les statistiques obtenues auprès du MSSS révèlent que 41 analyses ont été demandées hors Québec au cours de l'année 2013-2014 à un coût total de 32 062 \$, soit 782 \$ en moyenne par analyse.

De plus, le demandeur estime que l'implantation de ces analyses dans son centre permettra une amélioration du temps de réponse, un élément important dans le cas de diagnostic prénatal de maladies graves ou létales. Le temps de réponse prévu est de 5 jours pour un diagnostic prénatal et de 2 semaines de routine. The Hospital for Sick Children de Toronto, qui effectue actuellement les analyses pour le CHU Ste-Justine, a un délai de réponse de 2 semaines pour un diagnostic prénatal et de 4 à 6 semaines de routine.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement par un autre test

Les analyses proposées ne remplacent aucun autre test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Les DS constituent environ 5 % des maladies génétiques observées dans la période néonatale [Orioli *et al.*, 1986]. Elles représentent, dans leur ensemble, un poids significatif pour les familles à cause du potentiel de létalité, des complications médicales à court et à long termes et du risque de récurrence.

L'analyse proposée par le demandeur permet donc de préciser le diagnostic dans ces cas, chez certains cas atypiques et chez les patients atteints d'Hch lorsque les disproportions squelettiques et les caractéristiques radiologiques sont moins prononcées.

Morbidité et qualité de vie

L'établissement d'un diagnostic permet, dans les cas d'Ach et d'Hch, la mise en place d'un programme de prise en charge préventif assuré par une équipe multidisciplinaire. Les complications observées dans les cas d'Ach sont une conséquence d'anomalies de la croissance linéaire des os. Plusieurs de ces complications se présentent à des moments précis au cours du développement ou de l'âge adulte et peuvent fréquemment être minimisés lorsqu'elles sont détectées de façon précoce. Des guides de pratiques sur le suivi de patients atteints d'Ach ont été élaborés dans plusieurs pays [Carter *et al.*, 2007; Horton *et al.*, 2007; Trotter et Hall, 2005; Hunter *et al.*, 1998]. Le suivi inclut les complications neurologiques et respiratoires dans la première année de vie et dans l'âge adulte ainsi que des interventions comme le traitement des infections auriculaires et des otites moyennes séreuses, la correction chirurgicale de la courbure des jambes et une laminectomie lombaire pour traiter la sténose vertébrale. Un soutien psychologique et social doit également être proposé; les individus présentant une petite taille font face, entre autres, à plusieurs problématiques fonctionnelles au sein de la société.

Mortalité et récurrence

La confirmation du diagnostic peut également contribuer à la prise de décisions concernant la continuation de la grossesse en cours et l'étendue des interventions médicales qui seront pratiquées à la naissance.

Le diagnostic permet également de fournir des conseils sur le risque de récurrence et d'orienter les choix reproductifs pour les grossesses ultérieures.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif des conditions médicales concernées par ces analyses. La stratégie de traitement actuelle est basée sur les manifestations cliniques du patient.

Toutefois, chez les individus atteints d'Ach et d'Hch, certains essais cliniques visant à déterminer l'efficacité de certaines molécules à promouvoir la croissance linéaire des os (tels le peptide natriurétique type C, l'hormone de croissance et la somatotropine) sont en cours (essais NCT01541306, NCT01111019, NCT01435629, NCT01516229¹⁸).

¹⁸ ClinicalTrials.gov [site Web], disponible à : <https://clinicaltrials.gov/>.

5.2 Validité clinique

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

FGFR3

FGFR3 fait partie d'une famille de 4 récepteurs transmembranaires (FGFR1-4) pour les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). Le gène localisé sur le chromosome 4p16.3 et constitué de 19 exons code pour une protéine constituée d'une région extracellulaire comprenant 3 domaines immunoglobuline-like, 1 domaine transmembranaire hydrophobe et 2 domaines tyrosine –kinase intracellulaires.

L'activation du récepteur par un des différents FGF conduit à sa dimérisation assistée par une interaction avec des molécules d'héparans sulfate protéoglycans et la phosphorylation des résidus tyrosine dans son domaine intracellulaire [Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.*, 2005; Spivak-Kroizman *et al.*, 1994; Ullrich et Schlessinger, 1990]. Les résidus tyrosine kinase phosphorylée activent alors les différents effecteurs de la voie de signalisation pour réguler la prolifération et la différenciation cellulaire contrôlant la structure et la croissance des os [revue par Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2012].

L'association de la région 4p16.3, puis du gène *FGFR3* à l'étiologie génétique de l'Ach, a été initialement effectuée par Shiang [1994] et Le Merrer [1994] et leurs collaborateurs respectifs. Les variations génétiques ont, par la suite, été jugées pathogéniques dans d'autres DS apparentées dont l'Hch et la TD [Waller *et al.*, 2008; Tavormina *et al.*, 1999; Tavormina *et al.*, 1995; Bellus *et al.*, 1995; Prinos *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 1994]. Les tableaux 2, 3 et 4 résument certaines études d'association entre le *FGFR3* et l'Ach, l'Hch et la TD. De façon générale, les variations identifiées sont associées à l'une ou l'autre des DS et l'hétérogénéité phénotypique observée entre les différentes ostéochondroplasies du groupe 1 semble principalement dépendante du variant observé et de son impact sur la fonctionnalité de la protéine. Une contribution par d'autres éléments génétiques ou épigénétiques est suggérée, du moins dans certains cas.

L'ensemble des mutations identifiées à ce jour agissent de façon dominante et sont *de novo* chez la majorité des individus atteints. L'étude de l'effet de diverses mutations identifiées dans les cas d'Ach, d'Hch et de TD a permis de poser l'hypothèse que les phénotypes observés résultent en l'activation excessive du récepteur. Différents mécanismes ont été mis en cause, notamment la stabilisation indépendante du ligand des dimères *FGFR3* par ponts hydrogène ou lien disulfure et le changement conformationnel de la protéine [D'Avis *et al.*, 1998; Naski *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 1996].

L'étiologie génétique de l'ACH et de l'Hch

L'Ach possède des caractéristiques cliniques et radiologiques permettant un diagnostic précis. À ce jour, seul le *FGFR3* est associé à cette maladie. La majorité des individus atteints d'Ach (environ 93-99 %) possède une substitution p.G380R dans le gène de *FGFR3* résultante des variants c.1138 G>A dans 94-98 % des cas ou c.1138 G>C chez environ 1-6 % des patients [voir les tableaux 2 et 4; Passos-Bueno *et al.*, 1999]. Ces variations, initialement décrites par Shiang et ses collaborateurs [1994], ont été définies comme étiologie génétique de l'Ach [Bellus *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 1994]. La spécificité de ces mutations a été décrite dans diverses populations américaines, européennes, chinoises, japonaises et turques (voir les tableaux 2 et 4) [Pehlivan *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2002; Katsumata *et al.*, 2000].

Les mutations sont généralement acquises par la transmission de mutation *de novo* du père et le risque de transmission augmente avec l'âge paternel. Toutefois, environ 10-20 % des cas sont familiaux et sont transmis de façon autosomique dominante avec pénétrance complète [Horton *et al.*, 2007; Bellus *et al.*, 1995].

La présence de mutation homozygote confère un phénotype sévère qui s'apparente avec la TD et est létale en période périnatale [Rousseau *et al.*, 1994]. Aucun cas de mosaïcisme somatique n'a été signalé jusqu'à présent, mais Natacci et ses collaborateurs [2008] ont décrit un cas de mosaïcisme germlinal. Rarement, d'autres variations, dont p.G375C, ont été associées à l'Ach [Addor *et al.*, 2000; Ikegawa *et al.*, 1995; Superti-Furga *et al.*, 1995].

Environ 50-70 % des cas d'Hch seraient causés par la substitution p.N540K (c.1620C>A ou c.1620C > G) (voir les tableaux 3 et 4). Toutefois, plusieurs autres variants ont été décrits comme étant pathogéniques et à l'origine de l'Hch. Dans leur ensemble, ces autres variations sont observées dans environ 3- 16 % des cas [Hasegawa et Tanaka, 2014] (voir les tableaux 3 et 4). Diverses études d'association génétique dans des familles atteintes de l'Hch ont permis de déterminer que d'autres gènes sont à l'origine de l'Hch. L'étude de Song et ses collaborateurs [2012] suggère l'implication de *SHOX* dans environ 10 % des cas d'Hch, en accord avec des travaux préalables [Tan et Loke, 2005; Grigeliuniene *et al.*, 2000]. Aucun autre gène n'a pu être ciblé jusqu'à présent.

L'étude de familles a également permis de déterminer que la maladie est transmise selon un mode autosomique dominant avec une pénétrance de 100 % et qu'elle comporte une hétérogénéité phénotypique. Almeida [2009] et Song [2012] et leurs collaborateurs ont décrit le cas d'une mère chez qui le diagnostic et la mutation pathogénique ont été trouvés après le diagnostic de son enfant atteint présentant un phénotype plus grave. Tout comme pour l'Ach, l'homozygosité ou la présence de mutations composées semblent associées avec un phénotype plus grave s'apparentant à l'Ach [De Rosa *et al.*, 2014].

Le recoupement de caractéristiques cliniques entre l'Ach et l'Hch, l'hétérogénéité importante entre les différents cas et une absence de critères stricts pour le diagnostic de l'Hch pourraient contribuer à l'obtention d'une population hétérogène résultant en une sensibilité clinique sous-évaluée et variable. Ainsi, diverses études de séries d'individus portant un diagnostic d'Ach ou d'Hch ont révélé qu'entre 7 % et 40 % des cas d'Hch sont porteurs d'une variation associée à l'Ach alors qu'entre 8 % et 10 % des cas d'Ach présentent un variant pathogénique de l'Hch. Ces discordances génotype-phénotype ont été rapportées comme une erreur diagnostique initiale sur révision des cas et en fonction de leur évolution (voir le tableau 4) [Hasegawa et Tanaka, 2014; Xue *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2009].

Rarement, la littérature fait état de la détection de variant chez un individu porteur d'un diagnostic différent de celui associé à la mutation. Cette situation est généralement associée à une prévalence faible du variant qui n'a pas permis d'établir une corrélation génotype-phénotype précise ou à la présentation atypique du patient.

Tableau 2 Quelques études d'association entre *FGFR3* et l'Ach

ÉTUDE	TECHNOLOGIE DIAGNOSTIQUE	NBRE D'INDIVIDUS OU DE FAMILLES	COHORTE	MUTATIONS		
				NBRE	%	TYPE (DISTRIBUTION)
Shiang <i>et al.</i> , 1994	DGGE* Séquençage‡ PCR-RFLP§	16	Ach sporadique	16	100	c.1138G>A (p.G380R) (93,7 %) c.1138G>C (p.G380R) (6,3 %)
		50	Témoins non apparentés	0		
Rousseau <i>et al.</i> , 1994	SSCP† Séquençage‡ (domaine transmembranaire)	17	Ach sporadique	17	100	c.1138G>A (p.G380R) (95,7 %) c.1138G>C (p.G380R) (4,3 %)
		6	Ach familial	6	100	
		NS	Témoins apparentés	0	0	
		NS	Hch	0	0	
		120	Témoins non apparentés	0	0	
Bellus <i>et al.</i> , 1995	PCR- RFLP§	114	Ach sporadique	113	99.1	c.1138G>A (p.G380R) (97,4 %) c.1138G>C (p.G380R) (2,6 %)
		40	Ach familial (79 individus)	40	100	
		147	Témoins apparentés	0	0	
Ikegawa <i>et al.</i> , 1995	PCR- RFLP§ Séquençage‡ du domaine transmembranaire	1	Ach familial	1	100	c.1123G>T (p.G375C) (100 %)
		6	Ach sporadique	6	100	c.1138G>A (p.G380R) (100 %)
		1	Hch sporadique	0		
		1	pseudoAch sporadique	0		
	PCR- RFLP§ Pour tester pour le variant p.G375C	95	Témoins non apparentés	0		

NS : non spécifié dans la référence.

* Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant.

‡ Séquençage cyclique de type Sanger.

§ Polymorphisme par taille des fragments de restriction. Dans ces cas, seule la recherche des mutations c.1138G>A et c.1138G>C a été effectuée.

† Polymorphisme de conformation simple-brin.

|| Le seul cas non muté présente un phénotype atypique.

Tableau 3 Quelques études d'association entre le *FGFR3* et l'Hch

ÉTUDE	TECHNOLOGIE	NBRE D'INDIVIDUS	COHORTE	MUTATIONS
-------	-------------	------------------	---------	-----------

	DIAGNOSTIQUE	OU DE FAMILLES		NBRE	%	TYPE (DISTRIBUTION)
Bellus <i>et al.</i> , 1995	MDE* Séquençage† ASO‡	11	Hch sporadique	8	72,7	c.1620C>A (p.N540K)
		3	Hch familial	3	100	
			Témoins apparentés aux cas sporadiques (parents et fratrie) ou fratrie non atteinte de cas familiaux	10	0	
		164 chromosomes	Témoins	0	0	
Rousseau <i>et al.</i> , 1996	SSCP§ Séquençage†	16	Hch familial	8	50	p. N540K, le locus sur le chromosome 4 n'est pas associé pour au moins 3 familles
		13	Hch sporadique	13	100	c.1620C>A (p.N540K)
Heuertz <i>et al.</i> , 2006	Séquençage†	64	Hch sporadique	55	74,3	c.1620C>A (p.N540K) (63,5 %) c. 1949A>T (p.K650Q) (1,5 %) c.983A>T (p.N328I) (1,5 %) c.829A >G (p.Y278C) c.801G >T (p.G268C) c.597C >T (p.R200C) c.783 A >C (p.N262H) c. 1142 T >A (p.V381E) c.250 C >T (p.S84L)
		11	Hch familial			
		16	Parents des cas porteurs des mutations Y278C, G268C, R200C, N262H, V381E et 4 membres de la famille porteuse de S84L	0		
		70	Témoins non apparentés	0		

* Électrophorèse de détection de mutation améliorée (*mutation detection enhancement electrophoresis* ou MDE); 90 % de la région codante a été investiguée par MDE puis par séquençage.

† Séquençage cyclique de type Sanger.

‡ Sonde spécifique d'allèle.

§ Polymorphisme de conformation simple-brin.

Tableau 4 Quelques études de prévalence de mutations dans *FGFR3* dans des cohortes supérieures à 20

ÉTUDE	POPULATION	TECHNOLOGIE DIAGNOSTIQUE	NBRE D'INDIVIDUS OU DE FAMILLES	COHORTE	MUTATIONS		
					NBRE	%	TYPE (DISTRIBUTION)
Stoilov <i>et al.</i> , 1995	États-Unis	PCR- RFLP* Séquençage†	19	Ach familial	21/23 chromosomes testés	91	c. 1138 G>A (p.G380R)
			3	Ach sporadique			
			1	Hch familial	0		Pas d'association avec cette région chromosomique
			8	Hch sporadique	0		
Bonaventure <i>et al.</i> , 1996	France	Séquençage† SSCP§	6	Ach familial	6	100	c.1138G>A (p.G380R) (100 %)
			44	Ach sporadique	43	100	c.1138G>A (p.G380R) (95,5 %) c.1138G>C (p.G380R) (4,5 %)
			19	Hch familial	8	42,1	c. 1659C>A (p.N540K) (50 %) c. 1659C>G (p.N540K) (50 %)
			19	Hch sporadique	15	78,9	c. 1659C>A (p.N540K) (60 %) c. 1659C>G (p.N540K) (40 %)
Ramaswami <i>et al.</i> , 1998	R.-U.	PCR- RFLP* Séquençage† ASO‡ SSCP§	65	Hch sporadiques et familiaux	28	43	c.1620C>A (p.N540K)
Seino <i>et al.</i> , 1999	Japon		75	Ach	72	96	c. 1138 G>A (p.G380R) (97,2 %) c. 1138 G>C (p.G380R) (2,7 %)
Falik-Zaccai <i>et al.</i> , 2000	Israël	PCR- RFLP* Seuls les variants (c.1138 G>A et G>C (p.G380R) et p.G375C étaient recherchés	31	Ach sporadique	31	100	c. 1138 G>A (p.G380R) (96,8 %) c. 1138 G>C (p.G380R) (3,2 %)
			2	Ach atypique	0		
Katsumata <i>et al.</i> , 2000	Japon	PCR- RFLP* Séquençage† du domaine transmembranaire	24	Ach sporadique	24	100	c. 1138 G>A (p.G380R) (96,1 %)
			2	Ach familial	2	100	c. 1138 G>C (p.G380R) (3,8 %)
			14	Hch	8	57,1	c. 1659C>A (p.N540K) (75 %) c. 1659C>G (p.N540K) (25 %)

ÉTUDE	POPULATION	TECHNOLOGIE DIAGNOSTIQUE	NBRE D'INDIVIDUS OU DE FAMILLES	COHORTE	MUTATIONS		
					NBRE	%	TYPE (DISTRIBUTION)
Nahar <i>et al.</i> , 2009	Inde	PCR- RFLP*; (les mutations 1138GA et 1138 GC ont été recherchées)	130	Ach	53	40,8	c. 1138 G>A (p.G380R) (94,7 %) c. 1138 G>C (p.G380R) (5,3 %)
Almeida <i>et al.</i> , 2009	Portugal	Séquençage†	24	Ach	20	83,3	p.G380R (90 %) p.N540K (10 %)¶
			46	Hch	16	34,8	p.N540K (43,8 %) p.R200C (6,3 %) p.G380R (18,7 %)** p.G380K (12,5 %)** p.E360K (18,4 %)**
Song <i>et al.</i> , 2012	Corée	Séquençage† toute région codante et jonctions	58	Hch	19	32,8	FGFR3 (32,8 %) : p.N540K (52,6 %) p.Y278C (5,3 %) p.T264M (15,8 %) p.G65R (5,3 %) p.Q115L (21,1 %)
			68	Témoins	0	0	
			49	Ach	49	100	p.G380R (100 %)
Xue <i>et al.</i> , 2014	International Skeletal Dysplasia Registry, États-Unis	Diverses	79	Ach	79	100	c. 1138 G>A (p.G380R) (73,4 %) c. 1138 G>C (p.G380R) (16,5 %) c. 1620C>A (p.N540K) (6,3 %) c.1620C>G (p.N540K) (3,8 %)
			29	Hch	27	93,1	c. 1620C>A (p.N540K) (48,1 %) c.1620C>G (p.N540K) (33,3 %) c. 1138 G>A (p.G380R) (7,4 %) c.1949A>C (p.K650Q) (7,4 %) c.829A>G (p.Y279C) (3,4 %)

* Polymorphisme par taille des fragments de restriction. † Séquençage cyclique de type Sanger. ‡ Sonde spécifique d'allèle. § Polymorphisme de conformation simple-brin. || Des variants pathogéniques probables ont été détectés chez 6 patients dans le gène SHOX. ¶ Le diagnostic d'achondroplasie de ces patients a été modifié à hypochondroplasie par suite de l'identification de la variation présente. ** Le diagnostic d'hypochondroplasie de ces patients a été changé à achondroplasie par suite de l'identification de la variation présente.

TD de types I et II

Les variants décrits et associés, jusqu'à présent, à la TD de types I et II sont spécifiques à l'une ou l'autre des formes (voir les tableaux 5 et 6). Les variations peuvent être classifiées en deux catégories : les faux-sens et celles modifiant le codon stop. L'ensemble des variants non-sens mène à l'ajout, en C-terminal, de 141 acides aminés lors de la traduction de la protéine [Brodie *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 1995; Tavormina *et al.*, 1995]. Plus de 11 variants ont été associés à TDI jusqu'à présent alors que seule p.K650E (c.1948A>G) a été précisé dans l'ensemble des cas de TDII décrits [Karczeski et Cutting, 2004; Wilcox *et al.*, 1998]. Les trois mutations les plus communes (p.R248C, p.Y373C et p.X807) constituent environ 90 % des mutations associées à TDI.

La quasi-totalité des cas signalés de TD sont issus de mutations *de novo*. Quelques cas de mosaïsme germlinal ont été signalés [Hurst *et al.*, 2005; Hyland *et al.*, 2003] et Takagi et ses collaborateurs [2012] ont décrit un cas de mosaïsme somatique se manifestant sous une forme apparentée à la présentation clinique et radiologique de l'Ach.

Jusqu'à présent, l'étiologie génétique de l'ensemble des cas de TD est associée au gène *FGFR3* avec une pénétrance complète du phénotype.

Tableau 5 Mutations répertoriées et associées à la dysplasie thanatophore

MUTATION	EXON	DISTRIBUTION APPROXIMATIVE	PHÉNOTYPE ALTERNATIF DÉCRIT*
TDI			
c.742C>T (p.R248C)	7	60-99 %	Ach, PLSD-SD
c.746C>G (p.S249C)	7	5-8 %	PLSD-SD
c.1108G>T (p.G370C)	10	1-4 %	
c. 1111A>T (p.S371C)	10	4 %	
c. 1118A>T (p.Y373C)	10	24-31 %	
c. 1949A>T (p.K650M)	15	≈1 %	Hch, Ach
c. 2420G>T (p.X807L)	19	7-33 %	
c. 2419T>G (p.X807G)	19		
c. 2419T>A (p.X807R)	19		
c. 2421A>C ou A>T (p.X807C)	19		PLSD-SD
c. 2421A>G (p.X807W)	19		PLSD-SD
c. 2420G>C (p.X807S)	19		
TDII			
p.K650E	15	100 %	SADDAN

* Ach : achondroplasie; PLSD-SD : dysplasie squelettique platyspondylique létale de type San Diego; SADDAN : Achondroplasie sévère-délai développemental-acanthosis nigricans.

Tableau 6 Quelques études d'association entre *FGFR3* et la dysplasie thanatophore de types I et II

ÉTUDE	TECHNOLOGIE DIAGNOSTIQUE	NBRE D'INDIVIDUS OU DE FAMILLES	COHORTE	MUTATIONS		
				NBRE	%	TYPE (DISTRIBUTION)
Tavormina <i>et al.</i> , 1995	DGGE* Séquençage† PCR-RFLP‡	16	TDII	16	100	p.K650E
		39	TDI	23	59,0	c.742C>T (p.R248C) (95,7 %) c. 1111A>T (p.S371C) (4,3 %)
		50	Témoins non apparentés	0		
		6	Témoins : parents de 3 cas	0		
Rousseau <i>et al.</i> , 1995	SSCP§ Séquençage†	15	TDI	5	33,3	Codon stop¶ c. 2421A>T (p.X807C) c. 2419T>A (p.X807R) c. 2419T>G (p.X807G)
			Témoins : parents	0		
Rousseau <i>et al.</i> , 1996	SSCP§ Séquençage†	26	TDI	25	96,1	c. 1118A>T (p.Y373C) (30,7 %) c.1108G>T (p.G370C) (3,8 %) c.742C>T (p.R248C) (34,6 %) c.746C>G (p.S249C) (7,7 %) Codon stop¶ (19,2 %)
		60	Témoins	0		
Bonaventure <i>et al.</i> , 1996	SSCP§ Séquençage†	26	TDI	25	96,1	c.742C>T (p.R248C) (36 %) c.746C>G (p.S249C) (8 %) c.1108G>T (p.G370C) (4 %) c. 1118A>T (p.Y373C) (32 %) c.2416T>G ou T>A (16 %) c.2418A>T (4 %)
Yang et Li, 2009	Séquençage† (exons 7, 10, 15, 19)	10	TDI**	9	90	c.742C>T (p.R248C)
		18	Témoins : parents	0		

ÉTUDE	TECHNOLOGIE DIAGNOSTIQUE	NBRE D'INDIVIDUS OU DE FAMILLES	COHORTE	MUTATIONS		
				NBRE	%	TYPE (DISTRIBUTION)
Liu <i>et al.</i> , 2011	Séquençage† Analyse à haute résolution de courbe de fusion (Exon7)	10	TD1	10	100	c.742C>T (p.R248C)
		30	Témoins	0	0	
Wilcox <i>et al.</i> , 1998††	DGGE* Séquençage† PCR- RFLP‡	74	TDI	74	100	c.742C>T (p.R248C) (60,8 %) c.746C>G (p.S249C) (5,4 %) c.1108G>T (p.G370C) (1,4 %) c. 1118A>T (p.Y373C) (24,3 %) c. 1949A>T (p.K650M) (1,4 %) Codon stop¶ (6,8 %)
		17	TDII	17	100	p.K650E

* Électrophorèse sur gel de gradient dénaturant.

† Séquençage cyclique de type Sanger.

‡ Polymorphisme par taille de fragments de restriction.

§ Polymorphisme de conformation simple-brin.

|| Seules les mutations de leurs enfants ont été investiguées.

¶ La substitution de base dans le codon stop résulte, lors de la traduction, en un ajout de 141 acides aminés.

** Diagnostiqués par échographie prénatale.

†† Cas du registre de l'International Skeletal Dysplasia Registry. Ces cas comprennent 42 cas de Tavormina et ses collaborateurs [1995].

Spécificité

Certaines variations dans le gène *FGFR3* ont été associées à d'autres maladies héréditaires ou somatiques. Les variants associés à des maladies héréditaires telles que les craniosynostoses de type Muenke (MIM 602849), le syndrome de Crouzon avec acanthosis nigricans (MIM 612247) et le syndrome lacrimo-auriculo-dento-digital (LADD) (MIM 149730) sont distincts des mutations associées aux DS du groupe 1. En effet, le syndrome de Muenke est généralement associé à la variation p.P250R et les syndromes Crouzon avec acanthosis nigricans et LADD respectivement à p.A391E et à p.D513N. A l'inverse, les variants acquis de façon somatique et associés avec le nevi épidermal (MIM 1629000) et la kératose séborrhéique (MIM 182000), de même que ceux associés à certains types de cancers dont le cancer colorectal, le cancer cervical, le myélome multiple, le cancer de la prostate et le carcinome de la vessie peuvent être communs ou non à ceux observés dans la TD et l'Ach [Goriely *et al.*, 2009; Hafner *et al.*, 2006; Logie *et al.*, 2005; Cappellen *et al.*, 1999; Chesi *et al.*, 1997]. Les caractéristiques phénotypiques associées à chacune des maladies somatiques sont dépendantes du tissu dans lequel la mutation s'est produite, du type de mutation présente et des autres mutations collaboratrices, s'il y a lieu.

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			

Plusieurs approches techniques ont été utilisées pour caractériser le génotype de patients atteints d'Ach, d'Hch et de TD depuis leur association initiale avec des variations génétiques observées dans le gène *FGFR3*, tant dans un contexte de recherche que dans un contexte d'analyse clinique (voir les tableaux 2, 3 et 5). L'approche privilégiée par le demandeur, le séquençage selon la méthode de Sanger, est considérée comme la méthode de référence de séquençage pour les applications cliniques [Rehm *et al.*, 2013]. Elle permet la détection de variations ponctuelles et de délétions et d'insertions mineures.

La sensibilité liée au seuil de détection de la méthode est évaluée entre 10 % et 30 % [Querings *et al.*, 2011; Tsiatis *et al.*, 2010]. Cette approche permet donc le reséquençage et la détection de variants ponctuels homozygotes ou hétérozygotes. Dans ce contexte, une sensibilité et spécificité analytique de 99 % ont été signalés [Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Aucune délétion ou insertion majeure ou duplication de *FGFR3* n'a été signalée jusqu'à présent dans l'ACH, l'Hch ou la TD, ce qui appuie l'utilisation de cette approche analytique.

Le séquençage de type Sanger et de nouvelle génération (massivement parallèle ou NGS) sont actuellement les seules approches permettant à la fois de détecter et de caractériser l'ensemble des mutations associées aux maladies visées par les analyses proposées par le demandeur. Certains fournisseurs de services cliniques utilisent une combinaison

d'approches techniques comme la PCR avec sonde et le séquençage cyclique de type Sanger pour améliorer le temps de réponse tout en maintenant la qualité de l'analyse (voir le tableau 7). Certaines stratégies de d'établissement des priorités en matière de criblage accompagnées de tests réflexes sont également mises de l'avant.

Tableau 7 Approche analytique d'un échantillonnage représentatif de fournisseurs d'analyses cliniques

FOURNISSEUR	APPROCHE TECHNIQUE UTILISÉE (RÉGIONS EXAMINÉES)		
	ACHONDROPLASIE	HYPOCHONDROPLASIE	DYSPLASIE THANATOPHORE
Prevention Genetics*	Séquençage Exon 10	Séquençage Exons 7, 9, 10, 13 et 15	Séquençage Exons 7, 10, 15, 19
Connective Tissue Gene Test (www.ctgt.net)†	Séquençage Exons 3, 5, 7, 9, 10, 13 et 15 Test réflexe avec les autres exons au besoin	Séquençage Exons 3, 5, 7, 9, 10, 13 et 15 Test réflexe avec les autres exons au besoin	Séquençage Exons 7, 10, 15, 19
Hospital for Sick Children, Toronto‡	PCR avec sonde : c.1138G>A c.1138G>C c.1123G>T	PCR avec sonde c.1620 C>A c.1620 C>G c.1619A>C c.1612A>G	Type I : Séquençage des 11 mutations Type II : PCR avec sonde c.1948A>G et séquençage du gène entier
BC Children's Hospital and BC Women's Hospital	Séquençage de la région du codon 380	Séquençage de la région du codon 540	Séquençage des 12 mutations décrites
Stanford Laboratories	PCR avec sonde Courbe de fusion c.1138G>A c.1138G>C	PCR avec sonde Courbe de fusion c.1620 C>A c.1620 C>G c.1619A>C	S.o.
Baylor College of Medicine	Génotypage d'allèles par MALDI-TOF : c.1138G>A c.1138G>C	S.o.	S.o.
ARUP Laboratories	PCR avec sonde : c.1138G>A c.1138G>C	PCR avec sonde c.1620 C>A c.1620 C>G	PCR avec sonde 13 mutations [ajout de c.2420G>C (p.X807S)]
Johns Hopkins Hospital	Séquençage Exons 10, 13, 15	Séquençage Exons 10, 13, 15	Séquençage Exons 7, 10, 15, 19
Saint Francis Center for Genetic Testing	PCR-RFLP c.1138G>A c.1138G>C	Séquençage des mutations communes (non spécifiées)	S.o.

FOURNISSEUR	APPROCHE TECHNIQUE UTILISÉE (RÉGIONS EXAMINÉES)		
	ACHONDROPLASIE	HYPOCHONDROPLASIE	DYSPLASIE THANATOPHORE
Genetics Center	Approche non spécifiée c.1138G>A c.1138G>C	Séquençage Exons 9, 13, 15	Séquençage Exons 7, 10, 15 et 19

S.o. : le service n'est pas offert. Séquençage : séquençage de type Sanger. * Séquençage de la séquence de *FGFR3* entière est disponible. † Un échantillon de gènes pour DS est également disponible par NGS. ‡ Test pour le diagnostic d'Ach et d'Hch combinées.

Le demandeur propose d'investiguer le statut mutationnel des exons 7, 10, 15 et 19 du gène *FGFR3* dans les cas de TD et des exons 10 et 13 chez les patients atteints d'Ach ou d'Hch. Selon la littérature disponible à ce jour, les variants associés à la TD I sont confinés aux exons 7, 10, 15 et 19, alors que celui associé à la TD II est retrouvé dans l'exon 15 (voir le tableau 5). Dans environ 99 % des cas, l'étiologie génétique de l'Ach a été associée à la mutation p.G380R retrouvée dans l'exon 10 avec quelques cas répartis dans les autres exons. Plusieurs variations réparties dans les exons 3, 5, 7, 9, 10, 13 et 15 ont été décrites chez des individus atteints d'Hch. Toutefois, la mutation p.N540K (c.1620 C>A ou c.1620 C>G) constitue environ 50-70 % des mutations associées au *FGFR3* dans l'Hch et p.V381E (C.1142T>A), environ 8 %. Ces variations se retrouvent respectivement dans les exons 13 et 10.

Les analyses ont été mises au point par le demandeur et ont fait l'objet d'une validation selon les recommandations d'organisations professionnelles internationales telles que le CCMG, l'ABMG et le CMGS¹⁹. Le demandeur a évalué à 100 % la sensibilité et la spécificité de son approche à l'aide de 4 patients atteints d'Ach, 1 cas de TD et des témoins normaux.

Les analyses font l'objet d'une épreuve de contrôle de qualité externe de séquençage général bisannuelle offerte par le CAP²⁰ et à laquelle le demandeur participe.

5.4 Recommandations d'autres organismes

L'analyse génétique des patients atteints de DS sporadique demeure une question controversée [Krakow *et al.*, 2009]. Toutefois, l'ACMG [Krakow *et al.*, 2008] suggérait, dans une série de recommandations sur le diagnostic prénatal des dysplasies squelettiques, que les tests génétiques devraient être offerts dans les cas suivants :

- Dans les cas où il y a un risque d'homozygosité ou d'hétérozygosité composée. Idéalement, le génotype parental devrait être connu préalablement à la grossesse.
- Pour les patients atteints de DS et pour lesquels l'étiologie génétique peut être déterminée (telles l'Ach, l'Hch et la TD).

¹⁹ CCMG : Collège canadien de généticiens médicaux; ABMG : American Board of Medical Genetics; CMGS : Clinical Molecular Genetics Society.

²⁰ CAP : College of American Pathologists.

Il est également précisé que l'analyse moléculaire des DS lors de grossesses en cours est controversée. Le délai entre la procédure invasive et le diagnostic peut être long et ne changera pas nécessairement l'issue de la grossesse, particulièrement si l'échographie suggère un risque de décès. Un résultat positif peut fournir une réponse et peut modifier les soins lors de l'accouchement. Toutefois, l'absence d'identification de mutation n'invalide pas les conclusions de l'échographie.

L'American Academy of Pediatrics (AAP) suggère de son côté que le génotypage du gène *FGFR3* n'est pas nécessaire chez tous les enfants porteurs d'un diagnostic d'Ach. Toutefois, la recherche de mutations devrait être effectuée dans les cas atypiques ou dont les caractéristiques cliniques ne permettent pas de distinguer entre des maladies possédant des phénotypes similaires.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : Il n'a pas été analysé.

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

Cette analyse est actuellement effectuée hors Québec à un coût supérieur à celui estimé par le demandeur.

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

Ils n'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les analyses proposées ont pour but de confirmer les diagnostics en prénatal, chez les enfants et les adultes. En effet, certaines caractéristiques phénotypiques de l'Ach, l'Hch et des TD se recoupent et une certaine variabilité phénotypique est observée surtout dans les cas d'Hch, complexifiant le diagnostic. Ces analyses pourraient également contribuer au diagnostic de cas atypiques.

L'obtention d'un diagnostic précis permet la mise en place d'un programme de soins approprié, la prise de décisions sur la continuation de la grossesse en cours et les interventions médicales nécessaires ou souhaitées au cours de la période périnatale et subséquente. Il permet également d'assurer un conseil génétique approprié.

7.2 Validité clinique

L'association du gène *FGFR3* avec l'Ach, l'Hch et la TD a été démontrée par plusieurs études effectuées dans différentes populations et par différents groupes sur des cohortes restreintes et contrôlées. Malgré l'association de ce gène avec d'autres maladies héréditaires et somatiques, le phénotype observé semble être associé au variant particulier présent et aux tissus affectés.

7.3 Validité analytique

Le séquençage de type Sanger des exons 7, 10, 15 et 19 ou 10 et 13 respectivement dans les cas de TD et dans les cas d'Ach/d'Hch permettra de détecter près de 100 % des cas de TD et d'Ach et environ 50-70 % des cas d'Hch.

7.4 Recommandations d'autres organismes

L'ACMG recommande que les tests génétiques soient offerts dans les cas où il y a un risque d'homozygosité ou d'hétérozygosité composée ou dans les cas où une étiologie génétique connue est soupçonnée (telles l'Ach, l'Hch et la TD). L'American Academy of Pediatrics (AAP) indique que le génotypage du gène *FGFR3* n'est pas nécessaire chez tous les enfants porteurs d'un diagnostic d'Ach. Toutefois, la recherche de mutations devrait être effectuée dans les cas atypiques ou dont les caractéristiques cliniques ne permettent pas le diagnostic différentiel entre des maladies possédant des phénotypes similaires.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Statut mutationnel du *FGFR3* dans les cas d'achondroplasie-hypochondroplasie (exons 10 et 13) et de dysplasie thanatophore de type I et II (exons 7, 10, 15, 19) par séquençage de type Sanger

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

- ☒ Avis de recommandation d'introduction (voir Note)
- ☐ 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

Le temps de réponse devrait être de 5 jours, quel que soit l'endroit de référence.

RÉFÉRENCES

- Addor MC, Gudinchet F, Truttmann A, Schorderet DF. An uncommon G375C substitution in a newborn with achondroplasia. *Genet Couns* 2000;11(2):169-74.
- Alanay Y et Lachman RS. A review of the principles of radiological assessment of skeletal dysplasias. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2011;3(4):163-78.
- Almeida MR, Campos-Xavier AB, Medeira A, Cordeiro I, Sousa AB, Lima M, et al. Clinical and molecular diagnosis of the skeletal dysplasias associated with mutations in the gene encoding Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) in Portugal. *Clin Genet* 2009;75(2):150-6.
- Appan S, Laurent S, Chapman M, Hindmarsh PC, Brook CG. Growth and growth hormone therapy in hypochondroplasia. *Acta Paediatr Scand* 1990;79(8-9):796-803.
- Baker KM, Olson DS, Harding CO, Pauli RM. Long-term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1. *Am J Med Genet* 1997;70(4):427-36.
- Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graca Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A* 2012;158A(5):1038-45.
- Baujat G, Legeai-Mallet L, Finidori G, Cormier-Daire V, Le Merrer M. Achondroplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22(1):3-18.
- Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, et al. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat Genet* 1995;10(3):357-9.
- Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P. Common mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor 3 account for achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Acta Paediatr Suppl* 1996;417:33-8.
- Brodie SG, Kitoh H, Lachman RS, Nolasco LM, Mekikian PB, Wilcox WR. Platyspondylic lethal skeletal dysplasia, San Diego type, is caused by FGFR3 mutations. *Am J Med Genet* 1999;84(5):476-80.
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999;23(1):18-20.
- Carter EM, Davis JG, Raggio CL. Advances in understanding etiology of achondroplasia and review of management. *Curr Opin Pediatr* 2007;19(1):32-7.
- Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM, Bergsagel PL. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997;16(3):260-4.

- Chitty LS, Khalil A, Barrett AN, Pajkrt E, Griffin DR, Cole TJ. Safe, accurate, prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and free fetal DNA. *Prenat Diagn* 2013;33(5):416-23.
- D'Avis PY, Robertson SC, Meyer AN, Bardwell WM, Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type I. *Cell Growth Differ* 1998;9(1):71-8.
- De Biasio P, Prefumo F, Baffico M, Baldi M, Priolo M, Lerone M, et al. Sonographic and molecular diagnosis of thanatophoric dysplasia type I at 18 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 2000;20(10):835-7.
- De Rosa ML, Fano V, Araoz HV, Chertkoff L, Obregon MG. Homozygous N540K hypochondroplasia—First report: Radiological and clinical features. *Am J Med Genet A* 2014;164A(7):1784-8.
- Doray B, Favre R, Viville B, Langer B, Dreyfus M, Stoll C. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. A report of 47 cases. *Ann Genet* 2000;43(3-4):163-9.
- Falik-Zaccai TC, Shachak E, Abeliovitch D, Lerer I, Shefer R, Carmi R, et al. Achondroplasia in diverse Jewish and Arab populations in Israel: clinical and molecular characterization. *Isr Med Assoc J* 2000;2(8):601-4.
- Foldynova-Trantirkova S, Wilcox WR, Krejci P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias. *Hum Mutat* 2012;33(1):29-41.
- Goriely A, Hansen RM, Taylor IB, Olesen IA, Jacobsen GK, McGowan SJ, et al. Activating mutations in FGFR3 and HRAS reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors. *Nat Genet* 2009;41(11):1247-52.
- Grigelioniene G, Eklof O, Laurencikas E, Ollars B, Hertel NT, Dumanski JP, Hagenas L. Asn540Lys mutation in fibroblast growth factor receptor 3 and phenotype in hypochondroplasia. *Acta Paediatr* 2000;89(9):1072-6.
- Hafner C, van Oers JM, Vogt T, Landthaler M, Stoeckl R, Blaszyk H, et al. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* 2006;116(8):2201-7.
- Hall JG. The natural history of achondroplasia. Dans : Nicoletti B, Kopits SE, Ascani E, McKusick VA, réd. *Human achondroplasia: A multidisciplinary approach*. New York, NY : Plenum Press; 1988 : 3-10.
- Hasegawa K et Tanaka H. Children with short-limbed short stature in pediatric endocrinological services in Japan. *Pediatr Int* 2014;56(6):809-12.
- Hecht JT, Francomano CA, Horton WA, Annegers JF. Mortality in achondroplasia. *Am J Hum Genet* 1987;41(3):454-64.

- Heuertz S, Le Merrer M, Zabel B, Wright M, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V, et al. Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet* 2006;14(12):1240-7.
- Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *Lancet* 2007;370(9582):162-72.
- Hunter AG, Bankier A, Rogers JG, Sillence D, Scott CI Jr. Medical complications of achondroplasia: A multicentre patient review. *J Med Genet* 1998;35(9):705-12.
- Hurst JA, Firth HV, Smithson S. Skeletal dysplasias. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10(3):233-41.
- Hyland VJ, Robertson SP, Flanagan S, Savarirayan R, Roscioli T, Masel J, et al. Somatic and germline mosaicism for a R248C missense mutation in FGFR3, resulting in a skeletal dysplasia distinct from thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet A* 2003;120A(2):157-68.
- Ibrahimi OA, Yeh BK, Eliseenkova AV, Zhang F, Olsen SK, Igarashi M, et al. Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization. *Mol Cell Biol* 2005;25(2):671-84.
- Ikegawa S, Fukushima Y, Isomura M, Takada F, Nakamura Y. Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in one familial and six sporadic cases of achondroplasia in Japanese patients. *Hum Genet* 1995;96(3):309-11.
- Karczeski B et Cutting GR. Thanatophoric dysplasia. Dans : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., éd. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle, WA : University of Washington; 2004. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1366/>.
- Katsumata N, Mikami S, Nagashima-Miyokawa A, Nimura A, Sato N, Horikawa R, et al. Analysis of the FGFR3 gene in Japanese patients with achondroplasia and hypochondroplasia. *Endocr J* 2000;47(Suppl):S121-4.
- Krakow D, Alanay Y, Rimoin LP, Lin V, Wilcox WR, Lachman RS, Rimoin DL. Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: A retrospective and prospective analysis. *Am J Med Genet A* 2008;146A(15):1917-24.
- Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL. Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet Med* 2009;11(2):127-33.
- Kuno T, Fujita I, Miyazaki S, Katsumata N. Markers for bone metabolism in a long-lived case of thanatophoric dysplasia. *Endocr J* 2000;47(Suppl):S141-4.
- Laederich MB et Horton WA. FGFR3 targeting strategies for achondroplasia. *Expert Rev Mol Med* 2012;14:e11.
- Le Merrer M. Hypochondroplasie. Orphanet; 2008. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=429.0.

- Le Merrer M, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Landais JC, Pelet A, Bonaventure J, et al. A gene for achondroplasia-hypochondroplasia maps to chromosome 4p. *Nat Genet* 1994;6(3):318-21.
- Lemyre E, Azouz EM, Teebi AS, Glanc P, Chen MF. Bone dysplasia series. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: Review and update. *Can Assoc Radiol J* 1999;50(3):185-97.
- Lewis C, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders: Experience of patients. *Clin Genet* 2014;85(4):336-42.
- Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn* 2007;27(1):11-7.
- Lim JH, Kim MJ, Kim SY, Kim HO, Song MJ, Kim MH, et al. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia using circulating fetal DNA in maternal plasma. *J Assist Reprod Genet* 2011;28(2):167-72.
- Linnankivi T, Makitie O, Valanne L, Toiviainen-Salo S. Neuroimaging and neurological findings in patients with hypochondroplasia and FGFR3 N540K mutation. *Am J Med Genet A* 2012;158A(12):3119-25.
- Liu YN, Li R, Li DZ. Genotyping of the C742T mutation of the FGFR3 gene causing type 1 thanatophoric dysplasia by high-resolution melting analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24(1):186-8.
- Logie A, Dunois-Larde C, Rosty C, Levrel O, Blanche M, Ribeiro A, et al. Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Hum Mol Genet* 2005;14(9):1153-60.
- Maroteaux P et Falzon P. Hypochondroplasie. Revue de 80 cas. *Arch Fr Pediatr* 1988;45(2):105-9.
- Matsui Y, Yasui N, Kimura T, Tsumaki N, Kawabata H, Ochi T. Genotype phenotype correlation in achondroplasia and hypochondroplasia. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(6):1052-6.
- Muenke M. Finding genes involved in human developmental disorders. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5(3):354-61.
- Nahar R, Saxena R, Kohli S, Puri R, Verma IC. Molecular studies of achondroplasia. *Indian J Orthop* 2009;43(2):194-6.
- Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 1996;13(2):233-7.
- Natacci F, Baffico M, Cavallari U, Bedeschi MF, Mura I, Paffoni A, et al. Germline mosaicism in achondroplasia detected in sperm DNA of the father of three affected sibs. *Am J Med Genet A* 2008;146A(6):784-6.

- Ngo C, Viot G, Aubry MC, Tsatsaris V, Grange G, Cabrol D, Pannier E. First-trimester ultrasound diagnosis of skeletal dysplasia associated with increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;30(2):221-6.
- Ni J, Lu G, Wang W, Chen F, Qin H, Wang D. [Detection of fibroblast growth factor receptor 3 gene mutation at nucleotide 1138 site in congenita achondroplasia patients]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2002;19(3):205-8 (article en chinois).
- Orioli IM, Castilla EE, Barbosa-Neto JG. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet* 1986;23(4):328-32.
- Orioli IM, Castilla EE, Scarano G, Mastroiacovo P. Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 1995;59(2):209-17.
- Panda A, Gamanagatti S, Jana M, Gupta AK. Skeletal dysplasias: A radiographic approach and review of common non-lethal skeletal dysplasias. *World J Radiol* 2014;6(10):808-25.
- Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitoh H. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 1999;14(2):115-25.
- Pehlivan S, Ozkinay F, Okutman O, Cogulu O, Ozcan A, Cankaya T, Ulgenalp A. Achondroplasia in Turkey is defined by recurrent G380R mutation of the FGFR3 gene. *Turk J Pediatr* 2003;45(2):99-101.
- Pont-Kingdon G, Gedge F, Woodechak-Donahue W, Schrijver I, Weck KE, Kant JA, et al. Design and analytical validation of clinical DNA sequencing assays. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136(1):41-6.
- Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick MW, Tsipouras P. A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum Mol Genet* 1995;4(11):2097-101.
- Prinster C, Carrera P, Del Maschio M, Weber G, Maghnie M, Vigone MC, et al. Comparison of clinical-radiological and molecular findings in hypochondroplasia. *Am J Med Genet* 1998;75(1):109-12.
- Querings S, Altmüller J, Ansen S, Zander T, Seidel D, Gabler F, et al. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One* 2011;6(5):e19601.
- Ramaswami U, Rumsby G, Hindmarsh PC, Brook CG. Genotype and phenotype in hypochondroplasia. *J Pediatr* 1998;133(1):99-102.
- 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.
- Ross JL, Bellus G, Scott CI Jr, Abboudi J, Grigeliuniene G, Zinn AR. Mesomelic and rhizomelic short stature: The phenotype of combined Leri-Weill dyschondrosteosis and achondroplasia or hypochondroplasia. *Am J Med Genet A* 2003;116A(1):61-5.
- Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al. Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in achondroplasia. *Horm Res* 1996;45(1-2):108-10.

- Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, et al. Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat Genet* 1995;10(1):11-2.
- Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 1994;371(6494):252-4.
- Saito T, Nagasaki K, Nishimura G, Takagi M, Hasegawa T, Uchiyama M. Radiological clues to the early diagnosis of hypochondroplasia in the neonatal period: Report of two patients. *Am J Med Genet A* 2012;158A(3):630-4.
- Schramm T, Gloning KP, Minderer S, Daumer-Haas C, Hortnagel K, Nerlich A, Tutschek B. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34(2):160-70.
- Seino Y, Moriwake T, Tanaka H, Inoue M, Kanzaki S, Tanaka T, et al. Molecular defects in achondroplasia and the effects of growth hormone treatment. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88(428):118-20.
- Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994;78(2):335-42.
- Song SH, Balce GC, Agashe MV, Lee H, Hong SJ, Park YE, et al. New proposed clinico-radiologic and molecular criteria in hypochondroplasia: FGFR 3 gene mutations are not the only cause of hypochondroplasia. *Am J Med Genet A* 2012;158A(10):2456-62.
- Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, et al. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 1994;79(6):1015-24.
- Stevenson DA, Carey JC, Byrne JL, Srisukhumbowornchai S, Feldkamp ML. Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *Am J Med Genet A* 2012;158A(5):1046-54.
- Stoilov I, Kilpatrick MW, Tsiouras P. A common FGFR3 gene mutation is present in achondroplasia but not in hypochondroplasia. *Am J Med Genet* 1995;55(1):127-33.
- Superti-Furga A, Eich G, Bucher HU, Wisser J, Giedion A, Gitzelmann R, Steinmann B. A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur J Pediatr* 1995;154(3):215-9.
- Takagi M, Kaneko-Schmitt S, Suzumori N, Nishimura G, Hasegawa T. Atypical achondroplasia due to somatic mosaicism for the common thanatophoric dysplasia mutation R248C. *Am J Med Genet A* 2012;158A(1):247-50.
- Tan YM et al. Loke KY. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR) for the rapid detection of SHOX haploinsufficiency in Leri-Weill Syndrome. *Diagn Mol Pathol* 2005;14(4):247-9.

- Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McIntosh I, et al. A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet* 1999;64(3):722-31.
- Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, et al. Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1995;9(3):321-8.
- Tretter AE, Saunders RC, Meyers CM, Dungan JS, Grumbach K, Sun CC, et al. Antenatal diagnosis of lethal skeletal dysplasias. *Am J Med Genet* 1998;75(5):518-22.
- Trotter TL et Hall JG. Health supervision for children with achondroplasia. *Pediatrics* 2005;116(3):771-83.
- Tsialis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: Diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010;12(4):425-32.
- Ullrich A et Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61(2):203-12.
- Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: The achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 2000;21(1):23-39.
- Waller DK, Correa A, Vo TM, Wang Y, Hobbs C, Langlois PH, et al. The population-based prevalence of achondroplasia and thanatophoric dysplasia in selected regions of the US. *Am J Med Genet A* 2008;146A(18):2385-9.
- Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 2011;155A(5):943-68.
- Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, Donoghue DJ. Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol* 1996;16(8):4081-7.
- Wilcox WR, Tavormina PL, Krakow D, Kitoh H, Lachman RS, Wasmuth JJ, et al. Molecular, radiologic, and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet* 1998;78(3):274-81.
- Witters I, Moerman P, Fryns JP. Skeletal dysplasias: 38 prenatal cases. *Genet Couns* 2008;19(3):267-75.
- Wynn J, King TM, Gambello MJ, Waller DK, Hecht JT. Mortality in achondroplasia study: A 42-year follow-up. *Am J Med Genet A* 2007;143A(21):2502-11.
- Wynne-Davies R, Walsh WK, Gormley J. Achondroplasia and hypochondroplasia. Clinical variation and spinal stenosis. *J Bone Joint Surg Br* 1981;63B(4):508-15.

Xue Y, Sun A, Mekikian PB, Martin J, Rimoin DL, Lachman RS, Wilcox WR. FGFR3 mutation frequency in 324 cases from the International Skeletal Dysplasia Registry. *Mol Genet Genomic Med* 2014;2(6):497-503.

Yang Y et Li DZ. FGFR3 gene mutations in Chinese cases of thanatophoric dysplasia type 1. *Fetal Diagn Ther* 2009;26(2):90-2.

Yeh P, Saeed F, Paramasivam G, Wyatt-Ashmead J, Kumar S. Accuracy of prenatal diagnosis and prediction of lethality for fetal skeletal dysplasias. *Prenat Diagn* 2011;31(5):515-8.

Zhen L, Pan M, Han J, Yang X, Liao C, Li DZ. Increased first-trimester nuchal translucency associated with thanatophoric dysplasia type 1. *J Obstet Gynaecol* 2015:1-3.

RECHERCHE DE MUTATIONS CIBLÉES DU GÈNE NRAS DANS LES TUMEURS COLORECTALES MÉTASTATIQUES (EXONS 2, 3 ET 4 : CODONS 12, 13, 61 ET 146) (RÉFÉRENCE – 2014.03.07)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Hôpital général juif
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 15 septembre 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 31 octobre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

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.

Conflit d'intérêts

Le Dr David S. Rosenblatt du CUSM se retire au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Analyse de mutations dans les exons 2, 3, et 4 du gène *NRAS* par TAAN en temps réel avec sondes TaqMan®.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Les demandeurs utilisent la trousse (NRAS Mutation Analysis Kit) de la compagnie EntroGen Inc. (Tarzana, CA, É.-U.). La trousse contient les amorces PCR et sondes TaqMan® nécessaires à l'amplification et à la détection spécifique de chacune des mutations à tester (*NRAS* exon 2 : G12D, G12C, G12S, G13R et G13V. *NRAS* exon 3 : Q61H, Q61L, Q61K et Q61R. *NRAS* exon 4 : A146T).

La quantité totale d'ADN nécessaire à l'amplification est vérifiée en incluant des amorces pour amplifier un gène contrôle, la $\beta 2$ microglobuline. La détection des séquences mutées amplifiées repose sur l'hydrolyse de sondes fluorescentes (TaqMan®). Chaque sonde contient un fluorophore (FAM™ ou VIC®) à l'extrémité 5'. L'autre extrémité est marquée par une molécule qui masque la fluorescence par le principe FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)²¹. Pendant l'amplification PCR, au moment de l'élongation des amorces, si

²¹ Le principe FRET repose sur la proximité physique entre un fluorophore rapporteur et une molécule qui masque la fluorescence (*quencher*) sur la sonde intacte.

l'ADN polymérase rencontre une sonde TaqMan® parfaitement hybridée en aval, celle-ci sera hydrolysée. Par contre, si l'hybridation n'est pas parfaite, la sonde sera déplacée et donc, conservée intacte [Livak, 1999]. L'hydrolyse de la sonde génère une fluorescence qui s'intensifie d'un cycle PCR à l'autre, mesurable en temps réel [De Kok *et al.*, 2002] (voir le schéma présenté à l'annexe A). Les sondes NRAS sont marquées avec FAM™, alors que la sonde contrôle $\beta 2$ microglobuline est marquée avec VIC®. Le signal VIC® devrait être détecté dans tous les échantillons, alors que celui du FAM™ devrait être détecté uniquement pour les échantillons mutés NRAS.

2.3 Société ou développeur : EntroGen Inc. (Tarzana, CA, É.-U.).

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

- Canada : Recherche seulement;
- États-Unis : Recherche seulement;
- Union Européenne : Diagnostic (CE-IVD) et recherche.

2.7 Valeur pondérée : 250.

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

3.1 Patients ciblés

Patients avec cancer colorectal métastatique réfractaires aux chimiothérapies standard, et chez qui un traitement incluant un anti-EGFR²² est envisagé : Erbitux® (cétuximab) ou Vectibix® (panitumumab).

3.2 Description de la maladie visée

Les plus récentes statistiques au Canada montrent que le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et le troisième chez les femmes. En effet, pour 2014, on estimait qu'au Québec, le nombre de nouveaux cas de CCR était de 3 600 pour les hommes et de 2 900 pour les femmes, soit 14,8 % et 11,7 % de tous les nouveaux cancers diagnostiqués. Le CCR est également parmi les cancers les plus mortels; on estime qu'en 2014, 2 450 patients sont décédés du CCR au Québec, soit l'équivalent d'environ 12 % de tous les décès par cancer pour la même période [Société canadienne du cancer (SCC), 2014].

Au moment du diagnostic, environ 25 % des patients présentent d'emblée une maladie métastatique, tandis que 50 % des patients bénéficiant d'une chirurgie à visée curative développeront des métastases à distance [Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO), 2011; Sasson et Sigurdson, 2002]. La résection chirurgicale de la tumeur primaire et des métastases hépatiques, lorsque possible, représente une composante du traitement du CCR métastatique (CCRM). Le 5-fluorouracile (5-FU) et le leucovorin (LV) combiné à

²² EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor*). L'EGFR est un récepteur à tyrosine kinase nécessaire à la croissance et à la différenciation cellulaire. L'EGFR est un proto-oncogène, c'est pourquoi il est la cible de thérapies anticancéreuses.

l'irinotécan (FOLFIRI) ou à l'oxaliplatine (FOLFOX) font partie du traitement standard à visée palliative du CCRm non résécable ou récidivant [Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO), 2011; De Gramont *et al.*, 2000; Cunningham et Glimelius, 1999].

L'EGFR est surexprimé dans environ 80 % des carcinomes colorectaux, faisant de la voie de l'EGF, une cible thérapeutique de choix [Cunningham *et al.*, 2005]. Cette surexpression est entre autres responsable de l'activation du cycle cellulaire, de l'envahissement tumoral et de la stimulation de l'angiogénèse [Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO), 2011; Mendelsohn et Baselga, 2000]. Parmi les molécules développées pour inactiver la voie de l'EGF, on compte les anti-EGFR, cétuximab (Erbix^{MC}, ImClone LLC) et panitumumab (Vectibix^{MC}, Amgen Inc.). Le cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique murin/humain qui se lie de façon spécifique à HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*), inhibant la cascade tyrosine kinase afin d'induire l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose [Saridaki *et al.*, 2010]. Le panitumumab est un anticorps monoclonal recombinant entièrement humanisé qui possède le même mode d'action que le cétuximab [Keating, 2010]. Malgré une amélioration marquée de l'arsenal chimiothérapeutique, le taux de survie à 5 ans demeure faible (13 %) pour les formes métastatiques du CCR [American Cancer Society (ACS), 2015].

3.3 Nombre de patients visés : 500 patients par année.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Anatomopathologie, hémato-oncologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Les spécimens de tumeurs colorectales sur lesquels les investigations moléculaires RAS peuvent être réalisées proviennent d'une biopsie ou d'une résection chirurgicale. Des tissus fraîchement congelés ou fixés et enrobés en paraffine peuvent être utilisés.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Complémentaire à l'analyse mutationnelle du gène *KRAS*. Actuellement, le *Répertoire* compte 2 codes, soit :

- 20067 (VP = 224) : Mutation du gène *KRAS* (Laboratoire de pathologie moléculaire – HGJ)²³
- 60152 (VP = 96) : Détection de mutation par TAAN en temps réel, analyse de fonte en haute résolution et séquençage (Laboratoire d'hématologie-biologie moléculaire – CHUM).

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Selon la liste des médicaments disponibles en établissement (14 novembre 2014), le cétuximab ou le panitumumab sont indiqués en monothérapie pour le traitement de troisième intention du CCRm exprimant l'EGFR chez les personnes :

- présentant un gène *KRAS* non muté;
- présentant un statut de performance selon l'ECOG de 0 à 2;

²³ Le laboratoire désigné utilise une trousse de la compagnie Entrogen Inc. pour détecter les mutations dans les exons 2,3, et 4 du gène *KRAS* (communications électroniques personnelles avec M. George Chong, Ph.D., 19 janvier 2015).

- réfractaires aux chimiothérapies à base d'irinotécan et d'oxaliplatine et qui ont reçu un traitement par fluoropyrimidine.

La durée initiale de traitement est de 3 mois. Lors des demandes subséquentes, le médecin doit fournir la preuve d'un effet clinique bénéfique par l'absence de progression de la maladie confirmée par imagerie. Le statut de performance selon l'ECOG doit demeurer de 0 à 2. Les durées de traitement subséquentes sont de 4 mois.

Dépendamment des études, l'évaluation du statut d'un marqueur moléculaire peut s'effectuer de différentes façons. Concernant la mise en évidence de mutations somatiques du gène *KRAS*, et plus précisément les codons 12 et 13 de l'exon 2, l'amplification PCR ciblée suivie d'un séquençage Sanger ou d'un pyroséquençage sont des techniques fréquemment utilisées.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La confirmation de l'absence de mutations somatiques aux codons 12 et 13 du gène *KRAS* est un prérequis pour que les patients aux prises avec un CCR avancé chimioréfractaire puissent bénéficier d'une thérapie avec anti-EGFR [Morton et Hammond, 2009]. Toutefois, le taux de réponse aux anti-EGFR n'est que de 20 % [Sartore-Bianchi *et al.*, 2009]. De nouvelles données cliniques suggèrent que des mutations touchant d'autres molécules de la voie de signalisation dépendante de l'EGFR pourraient être impliquées. Les demandeurs veulent donc tester le statut du gène *NRAS*, en plus du *KRAS*, afin d'exclure un traitement aux anti-EGFR chez des patients porteurs d'une mutation pour l'un ou l'autre des deux gènes.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence et validité clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : Non.

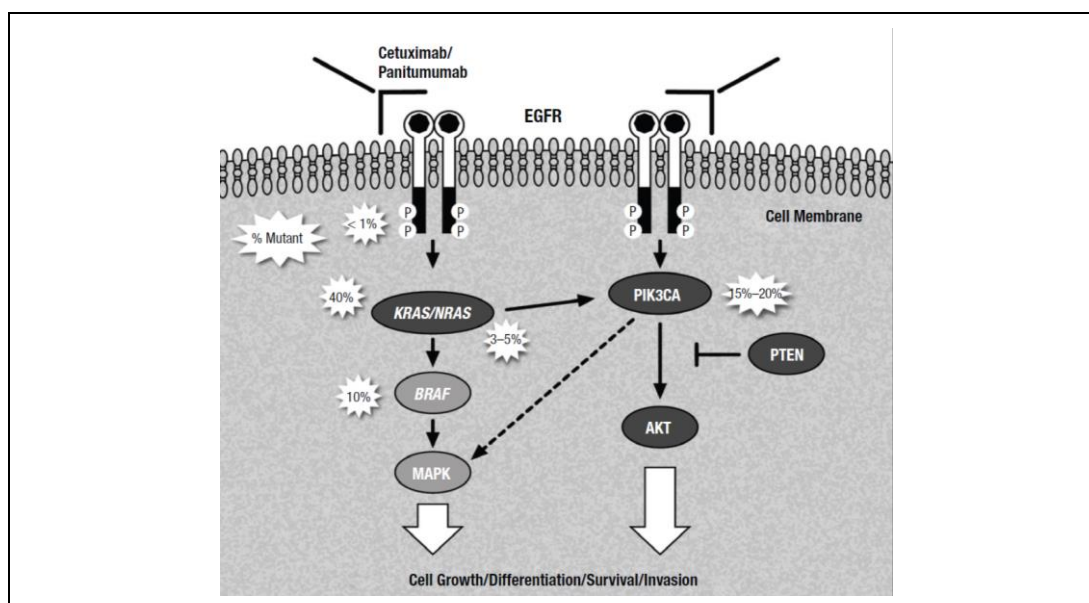
5.1.2 Valeurs prédictive et pronostique

Le génome humain contient trois gènes *RAS* très homologues, mais fonctionnellement distincts (*KRAS*, *NRAS* et *HRAS*). Les protéines *RAS* sont de petites GTPases impliquées dans un cycle alternant entre un état inactif, liées au GDP, et un état actif, liées au GTP²⁴. L'activation des protéines *RAS* déclenche un signal intracellulaire qui se propage par de multiples protéines médiatrices qui engendrent la transduction d'un signal de prolifération vers le noyau (voir la figure 1). Les résidus de la portion carboxy-terminale des protéines *RAS* sont hautement divergents, ce qui influence leurs modifications post-traductionnelles et leurs confèrent une spécificité de localisation propre [Schubbert *et al.*, 2007]. Des mutations oncogéniques touchant un des gènes *RAS* se retrouvent dans environ 30 % des cancers humains. La fréquence à laquelle les gènes sont touchés dépend du type tumoral. En effet, *KRAS* est davantage impliqué dans les tumeurs du pancréas, colorectales, de l'endomètre, des voies biliaires, du poumon et du col de l'utérus, alors que pour *NRAS*, des mutations somatiques activatrices sont plus fréquemment retrouvées chez les mélanomes et leucémies myéloïdes [Schubbert *et al.*, 2007].

²⁴ GDP : guanosine diphosphate; GTP : guanosine triphosphate.

La fréquence des mutations activatrices *KRAS* et *NRAS* parmi les tumeurs colorectales est différente. En effet, plusieurs études ont démontré que 40 % des CCR arborent des mutations somatiques aux codons 12 et 13 du gène *KRAS*, entraînant ainsi une activation constitutive de la voie des MAP kinases indépendante du récepteur des EGF. Les données issues d'analyses rétrospectives planifiées d'études randomisées de phase III évaluant l'impact du statut *KRAS* sur l'efficacité clinique du cétuximab ou du panitumumab en monothérapie, respectivement combiné aux meilleurs soins de soutien, chez des patients atteints d'un CCR avancé réfractaire, sont présentées au tableau 1 [Amado *et al.*, 2008; Karapetis *et al.*, 2008; Jonker *et al.*, 2007; Van Cutsem *et al.*, 2007].

Figure 1 Fréquences mutationnelles des gènes impliqués dans les voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT et qui affectent la réponse aux anti-EGFR



Source : De Mattos-Arruda *et al.*, 2011.

Tableau 1 Valeurs prédictive et pronostique du statut KRAS

ÉTUDES	TRAITEMENT (N)	STATUT KRAS (%)	TAUX DE RÉPONSE OBJECTIVE	SURVIE MÉDIANE SANS PROGRESSION	SURVIE GLOBALE MÉDIANE
Karapetis <i>et al.</i> , 2008	Cétuximab vs MSS (198 vs 196)	Non muté (58)	12,8 % vs 0 %	3,7 vs 1,9 mois (HR=0,40; p<0,001)	9,5 vs 4,8 mois (HR=0,55; p<0,001)
		Muté (42)	1,2 % vs 0 %	1,8 vs 1,8 mois (HR=0,99)	4,5 vs 4,6 mois (HR=0,98)
Amado <i>et al.</i> , 2008	Panitumumab vs MSS (208 vs 219)	Non muté (57)	17 % vs 0 %	12,3 vs 7,3 semaines (HR=0,45; p<0,001)	8,1 vs 7,6 mois (HR=0,99)
		Muté (43)	0 % vs 0 %	7,4 vs 7,3 semaines (HR=0,99)	4,9 vs 4,4 mois (HR=1,02)

Adapté de CEPO, 2011.

Abréviations : HR : hazard ratio; N : nombre; MSS : meilleurs soins de soutien.

Concernant les mutations somatiques *NRAS* dans les tumeurs colorectales, les fréquences observées sont beaucoup plus faibles, soit de 3 % à 9,6 %, dépendamment des études. Contrairement à *KRAS* où ce sont les glycines 12 et 13 (G12 et G13) qui sont fréquemment mutées, pour *NRAS*, il s'agit de la glutamine 61 (Q61), située dans l'exon 3, qui est le codon le plus souvent touché [De Roock *et al.*, 2010]. Les mutations *NRAS* et *KRAS* sont mutuellement exclusives. Le tableau 2 présente un résumé des principales études répertoriées. En 2011, Lin et ses collaborateurs ont publié une revue systématique dont l'objectif était d'évaluer le bénéfice clinique potentiel d'une thérapie aux anti-EGFR en fonction du statut moléculaire de gènes autres que *KRAS*, dont *NRAS*. Les auteurs ont repéré une seule étude rétrospective multicentrique de qualité acceptable menée sur des tumeurs de patients atteints d'un CCRm réfractaires aux chimiothérapies standard et ayant reçu le cétuximab combiné à de la chimiothérapie [Lin *et al.*, 2011; De Roock *et al.*, 2010]. Parmi toutes les tumeurs évaluées (n = 649), seulement 82 % (302/370) de celles confirmées non mutées pour *KRAS* avaient des informations à la fois sur le statut *NRAS* et l'issue clinique des patients. Les données de fréquence sont présentées au tableau 2, soit 4,1 % (13/315) des tumeurs non mutées *KRAS* étaient mutées pour *NRAS*. Notons que les patients de l'étude de De Roock 2010 ont reçu des régimes variés de cétuximab.

Tableau 2 Fréquence des mutations NRAS dans les tumeurs colorectales

ÉTUDES	CCR	MÉTHODE	MUTATIONS KRAS N (%)		MUTATIONS NRAS N(%)		
			CODONS 12/13	AUTRES CODONS	GLOBALE	CODONS	NOUVEL AA (N)**
Gasparini <i>et al.</i> , 2014	N = 94 KRAS G12-13 wt (Sanger)	PSQ	12/94 (13)	Q61 : 5 (5) A146 : 5 (5) K117 : 0 (0)	9/94 (9,6)	G12/13 : 3 (3) Q61 : 6 (6)	?
Di Bartolomeo <i>et al.</i> , 2014	N = 28	Sanger	11/23 (48)	0/23 (0)	1/22 (4,5)	G12 : 1 (4,5)	D(1)
Douillard <i>et al.</i> , 2013	N = 641 KRAS G12-13 wt	HRM + Sanger	0/641 (0)	Q61 : 24/638 (3,8) A146 : 28/620 (4,5) K117 : 8/620 (1,3)	48/641 (7,5)	G12 : 17/637 (2,7) G13 : 5/637 (0,8) Q61 : 26/636 (4,1)	D(10) <u>V(3)</u> C(3) <u>A(1)</u> R(5) K(14) R(7) H(3) L(2)
Peeters <i>et al.</i> , 2013	N = 288	PCR ASO + NGS	117/280 (42)	Q61 : 7/284 (2,5)	14/282 (5,0)	G12 : 7 (2,5) G13 : 1 (0,4) Q61 : 6 (2,1)	D(4) S(2) C(1) V(1) K(3) L(2) H(1)
Shen <i>et al.</i> , 2013	N = 676	Sanger	219/674 (32)	Q61 : 14/672 (2,1)	26/621 (4,2)	G12 : 8/630 (1,3) G13 : 3/630 (0,5) Q61 : 13/643 (2)	D(5) <u>V(3)</u> <u>D(2)</u> R(1) R(8) L(2) H(2) K(1)
Vaughn <i>et al.</i> , 2011	N = 2 121	PSQ	900/2121 (42,4)	Q61 : 19/513 (3,7) A146 : 17/513 (3,3)	26/513 (5,1)	G12 : 9 (1,8) G13 : 1 (0,2) Q61 : 16 (3,1)	D(6) C(2) S(1) <u>D(1)</u> K(8) R(5) L(3)
Beadling <i>et al.</i> , 2011	N = 236	Mass Array	78/236 (33 %)	A59 : 1 (0,4) Q61 : 6 (2,5)	8/236 (3,4)	G12 : 4 (1,7) G13 : 1 (0,4) Q61 : 3 (1,3)	D(3) <u>R(1)</u> R(1) K(1) R(2)
Janku <i>et al.</i> , 2011	N = 105	PSQ	49/97 (51)	?	2/31 (6)	?	?
De Roock <i>et al.</i> , 2010	N = 747	Mass Array	271/747* (36)	Q61 : 16/747 (2,1) A146 : 15/747 (2,0)	17/644 (2,6)	G12 : 4 (0,6) G13 : 1 (0,2) Q61 : 12 (1,8)	D(1) C(2) S(1) R(1) K(4) R(4) L(3) H(1)

Abréviations : AA : acide aminé; ASO : allèle spécifique PCR; CCR : cancer colorectal; HRM : high-resolution melting; N : nombre; PCR : polymerase chain reaction; PSQ : pyroséquençage; WT : wild type.

*Les fréquences spécifiques aux codons diffèrent de la fréquence globale car 4 échantillons portaient des mutations multiples : 1X(G12V+G12S), 1X(A146T+Q61L) et 2 p.G12V+p.A146T et 1 échantillon portait une mutation sur le codon 59.

**Les mutations faux-sens soulignées ne sont pas couvertes par la trousse d'EntroGen Inc.

Quelques études ont démontré un bénéfice clinique associé à l'utilisation d'un anti-EGFR chez les patients atteints d'un CCRm et dont le statut mutationnel du gène *NRAS* était négatif. Les données concernant l'ampleur de ces bénéfices cliniques sont présentées au tableau 3.

L'étude PRIME avait pour objectif principal d'évaluer les bénéfices cliniques associés à l'ajout du panitumumab au FOLFOX4 (5-fluoro-uracile, acide folinique et oxaliplatine), en première intention chez 512 patients *KRAS* et *NRAS* non mutés. L'étude a démontré que l'ajout du panitumumab a été associé à une amélioration significative des valeurs médianes de survie sans progression (10,1 versus 7,9 mois) et de survie globale (25,8 versus 20,2 mois). À l'inverse, parmi les 108 cas de statut *RAS* muté, un effet délétère statistiquement significatif a été associé à la prise du panitumumab [Douillard *et al.*, 2013].

L'étude PEAK avait pour objectif principal d'évaluer les bénéfices cliniques associés à l'ajout du panitumumab au FOLFOX6 (5-fluoro-uracile, acide folinique et oxaliplatine) par rapport à l'ajout du bévaccizumab au FOLFOX6, en première intention de traitement d'un CCRm. L'étude a démontré que les patients de statut *KRAS* et *NRAS* non muté du groupe avec panitumumab affichait une médiane de survie sans progression significativement plus élevée que celle de l'autre groupe (13,0 versus 9,5 mois). Également en termes de survie globale, les résultats se sont avérés meilleurs chez les patients *RAS* non mutés ayant reçu l'anti-EGFR (médianes de 25,8 versus 20,2 mois), sans toutefois atteindre un seuil statistiquement significatif [Schwartzberg *et al.*, 2014].

L'étude OPUS évaluait l'efficacité clinique du FOLFOX combiné au cétuximab en première ligne de traitement pour un CCRm [Bokemeyer *et al.*, 2011]. Les récents résultats concernant le rôle du statut *RAS* étendu (*KRAS* et *NRAS*) ont démontré que ce dernier était associé à une amélioration significative des valeurs médianes de survie sans progression (12,0 versus 5,8 mois; HR : 0,43; $p = 0,018$) par rapport au groupe ayant reçu le FOLFOX seulement [Tejpar *et al.*, 2014]. Ces nouvelles données représentent un gain de 6,2 mois alors que les résultats initiaux, calculés relativement au statut *KRAS* seul, montraient une amélioration de SSP de 1,1 mois (8,3 versus 7,2 mois; HR : 0,57; $p = 0,0064$) [Bokemeyer *et al.*, 2011].

L'étude CRYSTAL avait pour objectif principal d'évaluer les bénéfices cliniques associés à l'ajout du cétuximab au FOLFIRI (5-fluoro-uracile, acide folinique et irinotécan) par rapport au FOLFIRI seul, en première intention de traitement d'un CCRm. Les plus récentes analyses ont démontré que les patients de statut *KRAS* et *NRAS* non muté du groupe avec panitumumab affichait une médiane de survie sans progression significativement plus élevée que celle de l'autre groupe (11,4 versus 8,4 mois; HR : 0,56; $p = 0,0002$). Également en termes de survie globale, les résultats se sont avérés meilleurs chez les patients *RAS* non mutés ayant reçu l'anti-EGFR (médianes de 28,4 versus 20,2 mois; HR : 0,69; $p = 0,0024$) par rapport au groupe n'ayant reçu que le FOLFIRI [Ciardiello *et al.*, 2014].

Tableau 3 Bénéfice clinique d'un anti-EGFR en fonction du statut *NRAS* chez des patients atteints d'un CCRm

ÉTUDES	N PATIENTS	TRAITEMENT (INTENTION)	TAUX DE RÉPONSE OBJECTIVE	VALEUR PRONOSTIQUE/PRÉDICTIVE
Gasparini <i>et al.</i> , 2014 Rétrospectif	94	P-Mab (2 ^e et +)	Global : 17 % (16/94) Soit 3 patients avec RC dont 1 et 13 avec RP. Parmi ceux-ci, 2 patients avec <i>NRAS</i> Q61 muté (1 RC et 1 RP).	<i>RAS</i> étendu* (WT vs muté) TTP : 7,4 vs 5,2 sem. p = 0,044
Di Bartolomeo <i>et al.</i> , 2014	23	TEGAFOX-E (1 ^{ère})	<i>RAS</i> étendu (WT vs muté) : 64 % (7/11) vs 33 % (4/12) 1 patient <i>NRAS</i> G12D (NR)	<i>RAS</i> étendu (WT vs muté) SSP : 44 vs 9 semaines; HR : 4,7; p = 0,003 SG : 76 vs 54 semaines; HR : 1,5; p = NS
Schwartzberg <i>et al.</i> , 2014 Prospectif	285	FOLFOX6 + P-Mab ou B-Mab (1 ^{ère})	<i>RAS</i> étendu WT : 64 % (56/88) vs 61 % (49/82)	<i>RAS</i> étendu (WT vs muté) SSP : 13 vs 9,5 mois; HR : 0,65; p = 0,029 SG : 41,3 vs 28,9 mois; HR : 0,63; p = NS
Peeters <i>et al.</i> , 2013 Rétrospectif	288	P-Mab vs MSS (2 ^e et +)	<i>NRAS</i> (WT vs muté) : 17 % (22/126) vs 0 % (0/9)	<i>NRAS</i> WT (P-Mab vs MSS) : SSP : HR : 0,39; P < 0,001 <i>NRAS</i> muté (P-Mab + MSS vs MSS) : SSP : HR : 1,94; P = NS
Douillard <i>et al.</i> , 2013 Prospectif-Rétrospectif	656	P-Mab + FOLFOX4 vs FOLFOX4 (1 ^{ère})	Non évalué	<i>RAS</i> étendu WT (P-Mab + FOLFOX4 vs FOLFOX4) : SSP : 10,1 vs 7,9 mo; HR : 0,72; p = 0,004 SG : 25,8 vs 20,2 mo; HR : 0,77; p = 0,009 <i>RAS</i> étendu muté (P-Mab + FOLFOX4 vs FOLFOX4) : SSP : 7,3 vs 8,7 mo; HR : 1,31; p = 0,008 SG : 15,5 vs 18,7 mo; HR : 1,21; p = 0,04
De Roock <i>et al.</i> , 2010 Rétrospectif	649	C-Mab + chimio. (2 ^e et +)	<i>NRAS</i> (muté vs WT) : 7,7 % (1/13) vs 38,1 % (110/289) OR : 0,14; p = 0,013	<i>NRAS</i> (muté vs WT) : SSP : 14 vs 26 semaines; HR : NS SG : 38 vs 50 semaines; HR : NS

Abréviations : ASO : allèle spécifique oligo; B-Mab : bévaccizumab; chimio. : chimiothérapie; C-Mab : cétuximab; HR : hazard ratio; M : masculin; mo : mois; MSS : meilleurs soins de soutien; N : nombre; NGS : next-generation sequencing; NS : non significatif; OR : odds ratio; PCR : polymerase chain reaction; P-Mab : panitumumab; PSQ : pyroséquençage; RC : réponse complète; RP : réponse partielle; SG : survie globale; SSP : survie sans progression; TEGAFOX-E : cétuximab, oxaliplatine et UFT; TTP : time to progression; WT : wild type.

* Le terme « *RAS* étendu » fait référence au regroupement des deux gènes *RAS*, soit *KRAS* et *NRAS*. Les études ayant fourni des données de bénéfices cliniques pour un *RAS* étendu n'ont pas de données propres au statut *NRAS*.

5.2 Validité clinique

Aucune étude réalisée spécifiquement avec la trousse proposée par les demandeurs ou la technologie TaqMan® n'a été répertoriée dans la littérature. Il est donc impossible de déterminer précisément l'ampleur du bénéfice clinique associé à l'identification des mutations NRAS par cette technique. Toutefois, sur la base d'une validité analytique démontrée, il est possible d'extrapoler un bénéfice clinique minimalement équivalent à celui présenté dans la section sur la pertinence clinique et ce, peu importe la technique moléculaire employée.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Les données de validité analytique provenant de la compagnie Entrogen Inc. sont présentées ci-dessous. Les performances analytiques de la trousse ont été validées pour les appareils PCR en temps réel suivants : ABI StepOne, 7500 Fast, Qiagen Rotor-Gene® Q et Roche LightCycler 480.

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité (<i>accuracy</i>)	X		
Reproductibilité (précision)	X		
Sensibilité analytique (limite de détection)	X		
Spécificité analytique (réactions croisées)	X		
Effet de matrice			X
Concordance	X		
Corrélation entre test et comparateur	X		

Limite de détection

Il est nécessaire d'effectuer la réaction PCR avec approximativement 20 ng d'ADN. Le contrôle interne devrait donner une valeur Ct entre 26 et 31. Une mutation présente dans seulement 1 % des séquences pourrait ne pas être détectée si la valeur Ct du contrôle interne de l'échantillon est supérieure à 31.

Répétabilité

La répétabilité de l'essai a été établie en utilisant des échantillons contrôles conservés en paraffine et synthétiques. Les expériences ont été réalisées à partir de dilutions indépendantes de l'échantillon et de deux lots de réactifs différents. Le tableau 4 présente les valeurs Ct moyennes obtenues sur 18 répétitions en 3 jours.

Tableau 4 Répétabilité de la trousse « NRAS Mutation Analysis Kit » telle que signalée par le fabricant EntroGen Inc.

MUTATION	VALEUR Ct FAM (ÉCART-TYPE)	VALEUR Ct VIC (ÉCART-TYPE)
G12D	26,88 (0,0301)	24,34 (0,0453)
G12S	27,36 (0,0548)	24,24 (0,0895)
G12C	26,97 (0,0429)	24,33 (0,0156)
G13R	27,37 (0,1671)	24,30 (0,0632)
G13V	27,37 (0,121)	24,36 (0,0115)
Q61K	27,47 (0,0325)	24,35 (0,0613)
Q61L	27,87 (0,0815)	24,40 (0,0438)
Q61R	26,74 (0,0632)	24,33 (0,0349)
Q61H	27,24 (0,1354)	24,54 (0,033)
A146T	27,84 (0,8917)	24,35 (0,0158)

Précision (*accuracy*)

La précision de l'essai a été établie à partir de l'ADN isolé de 121 échantillons de tumeurs colorectales conservées dans la paraffine et de 5 lignées cellulaires avec mutations KRAS ou BRAF connues DNA. L'expérience a été répétée 2 fois et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par séquençage bidirectionnel du même échantillon. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 Précision de la trousse « NRAS Mutation Analysis Kit » telle que signalée par le fabricant EntroGen Inc.

MUTATION	PCR EN TEMPS RÉEL (N = 121)	SÉQUENÇAGE (N = 121)
Aucune	91	91
G12D	2	2
G12S	1	1
G12C	0	0
G13R	1	1
G13V	1	1
Q61K	10	10
Q61L	2	2
Q61R	13	13
Q61H	0	0
A146T	0	0

Réactivité croisée

Pour déterminer la réactivité croisée des amorces PCR, celles-ci ont été testées sur des contrôles synthétiques dilués à 20 % par la mesure des valeurs Ct sur un appareil ABI 7500 Fast (voir le tableau 6).

Tableau 6 Réactivité croisée des amorces de la trousse « NRAS Mutation Analysis Kit » telle que signalée par le fabricant EntroGen Inc.

Amorce	G12D	G12S	G12C	G13R	G13V	Q61K	Q61L	Q61R	Q61H	A146T
G12D	29,85									
G12S		32,73								
G12C			31,63							
G13R				30,15						
G13V					31,62					
Q61K						32,38				
Q61L							29,85		35,73	
Q61R								33,05		
Q61H									30,9	
A146T										31,29

Note : La réactivité croisée peut différer si l'ADN gabarit a été isolé d'échantillons tumoraux conservés en paraffine.

Limite des blancs

Plusieurs lots de réactifs ont été utilisés au cours d'essais conçus pour évaluer l'ampleur du signal émis en absence d'ADN gabarit (bruit de fonds). Aucun signal en provenance des amorces destinées à l'amplification du gène contrôle ou de NRAS n'a été enregistré.

Les demandeurs²⁵ ont également fourni des données internes de validation. Celles-ci sont présentées en annexe (voir l'annexe B)

5.4 Recommandations d'autres organismes

Le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recommande de tester les statuts de *KRAS* et de *NRAS* sur le tissu tumoral des patients avec CCRm. Ceux-ci ne devraient pas être traités avec un anti-EGFR (cétuximab ou panitumumab) [NCCN, 2015].

L'EGAPP (Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention) en 2013 concluait que les preuves entourant l'évaluation du statut NRAS chez les patients atteints d'un cancer colorectal sont insuffisantes relativement aux bénéfices cliniques recherchés d'un traitement avec anti-EGFR [EGAPP, 2013].

²⁵ Transmis à l'INESSS par M. George Chong, Ph. D., 27 janvier 2015.

Selon l'European Medicines Agency (2014), la détermination du statut NRAS non muté est requise pour un traitement incluant un anti-EGFR (cétuximab et panitumumab)²⁶.

La Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO, 2014) recommande de tester les statuts de KRAS et de NRAS parmi les patients atteints d'un CCRm chez qui un traitement aux anti-EGFR est envisagé. Seuls les patients dont ces 2 gènes ne portent pas de mutations devraient recevoir le traitement [Garcia-Alfonso *et al.*, 2015].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

Considérant l'introduction potentielle de ce test au *Répertoire*, davantage d'échantillons tumoraux à tester seraient à prévoir. À titre indicatif, pour 2013-2014, le *KRAS* a été testé à 677 reprises par le code 20067 et à 342 reprises par le code 60152²⁷. Étant donné que 60 % des échantillons tumoraux sont déclarés non mutés pour le *KRAS*, ceux-ci pourraient être testés *NRAS*.

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

Une étude sur les conséquences économiques montre que l'évaluation du statut RAS étendu (*KRAS* et *NRAS* exons 2, 3 and 4) a un coût très faible par rapport aux économies réalisées en ne traitant pas les 18 % de patients porteurs des mutations RAS (sans compter *KRAS* exon 2) avec une thérapie anti-EGFR (aussi bien Erbitux et Vectibix) [Kircher *et al.*, 2015], ce qui pourrait se traduire par des économies substantielles pour le système de santé québécois.

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

Actuellement, au Québec, les critères d'admissibilité à un traitement aux anti-EGFR pour un CCR avancé ne prennent en considération que le statut *KRAS* non muté (aucun codon spécifié) [Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ), 2014].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les personnes atteintes d'un cancer colorectal métastatique réfractaire à la chimiothérapie standard peuvent bénéficier d'une thérapie ciblée anti-EGFR. Il a été démontré que les 40 % des patients dont la tumeur est *KRAS* mutée (exon 2) n'ont aucun bénéfice clinique associé à la prise d'un traitement. Toutefois, la voie de signalisation dépendante de l'EGFR implique d'autres molécules effectrices, dont la protéine *NRAS*, hautement homologue à *KRAS*. Environ 5 % des personnes atteintes d'un CCRm, arborent des mutations somatiques dans le gène *NRAS*, ce qui expliquerait l'absence de bénéfices cliniques associés à la prise d'un anti-EGFR chez ceux-ci, et ce, même dans un contexte où le gène *KRAS* est non muté.

²⁶ European Medicines Agency. Erbitux, cetuximab [Product information]. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf ; Vectibix, panitumumab [Product information]. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf.

²⁷ Communications électroniques personnelles avec Mme Johanne Nicole du MSSS, 19 janvier 2014.

7.2 Validité clinique

Très peu d'études ont fourni des données de bénéfices cliniques uniquement pour le statut du gène *NRAS*. Des études rétrospectives ont montré qu'une thérapie incluant un anti-EGFR chez des patients de statut mutationnel RAS étendu négatif, c'est-à-dire *KRAS* et *NRAS* (exons 2, 3 et 4) non mutés, est associé à un bénéfice clinique significatif en termes de réponse tumorale objective, de survie sans progression et de survie globale. Cependant, quelques cas issus des cohortes *KRAS* négatif et *NRAS* positif semblent avoir bénéficié d'une thérapie ciblée anti-EGFR. Certaines études ont montré un effet délétère associé à la prise des médicaments cétuximab ou panitumumab chez des patients de statut RAS muté.

7.3 Validité analytique

Les données de validation technique présentées par le fabricant ont respecté les normes de l'Union Européenne (CE-IVD). Sur la base des données fournies par le demandeur, il semble que la trousse respecte exigences en matière de robustesse analytique.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Dépendamment des pays, le statut mutationnel de *NRAS*, en plus de celui de *KRAS*, est considéré ou non relativement à l'accès aux thérapies ciblées anti-EGFR pour des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Recherche de mutations ciblées du gène *NRAS* dans les tumeurs colorectales métastatiques

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

- ☐ Avis de recommandation d'introduction (voir commentaires additionnels)
- ☐ Avis de refus d'introduction
- ☒ Avis de réévaluation lorsque de nouvelles données probantes seront disponibles sur l'utilité clinique de cette analyse. Les connaissances sur ce sujet évoluent très rapidement et davantage de données pourraient être disponibles à court terme.

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

- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(10):1626-34.
- American Cancer Society (ACS). Cancer facts and figures 2015. Atlanta, GA : ACS; 2015. Disponible à : <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
- Beadling C, Heinrich MC, Warrick A, Forbes EM, Nelson D, Justusson E, et al. Multiplex mutation screening by mass spectrometry evaluation of 820 cases from a personalized cancer medicine registry. *J Mol Diagn* 2011;13(5):504-13.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22(7):1535-46.
- Ciardiello F, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Treatment outcome according to tumor RAS mutation status in CRYSTAL study patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFIRI with/without cetuximab. *J Clin Oncol* 2014;32(15 Suppl):abstract 3506.
- Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO). Utilisation des anticorps monoclonaux de la classe des anti-EGFR pour le traitement de troisième intention ou plus du cancer colorectal métastatique. Québec, Qc : Direction québécoise du cancer; 2011. Disponible à : <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/2064810>.
- Cunningham D et Glimelius B. A phase III study of irinotecan (CPT-11) versus best supportive care in patients with metastatic colorectal cancer who have failed 5-fluorouracil therapy. V301 Study Group. *Semin Oncol* 1999;26(1 Suppl 5):6-12.
- Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, et al. Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2005;27(2):317-25.
- De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(16):2938-47.
- De Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, 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 Mattos-Arruda L, Dienstmann R, Tabernero J. Development of molecular biomarkers in individualized treatment of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011;10(4):279-89.

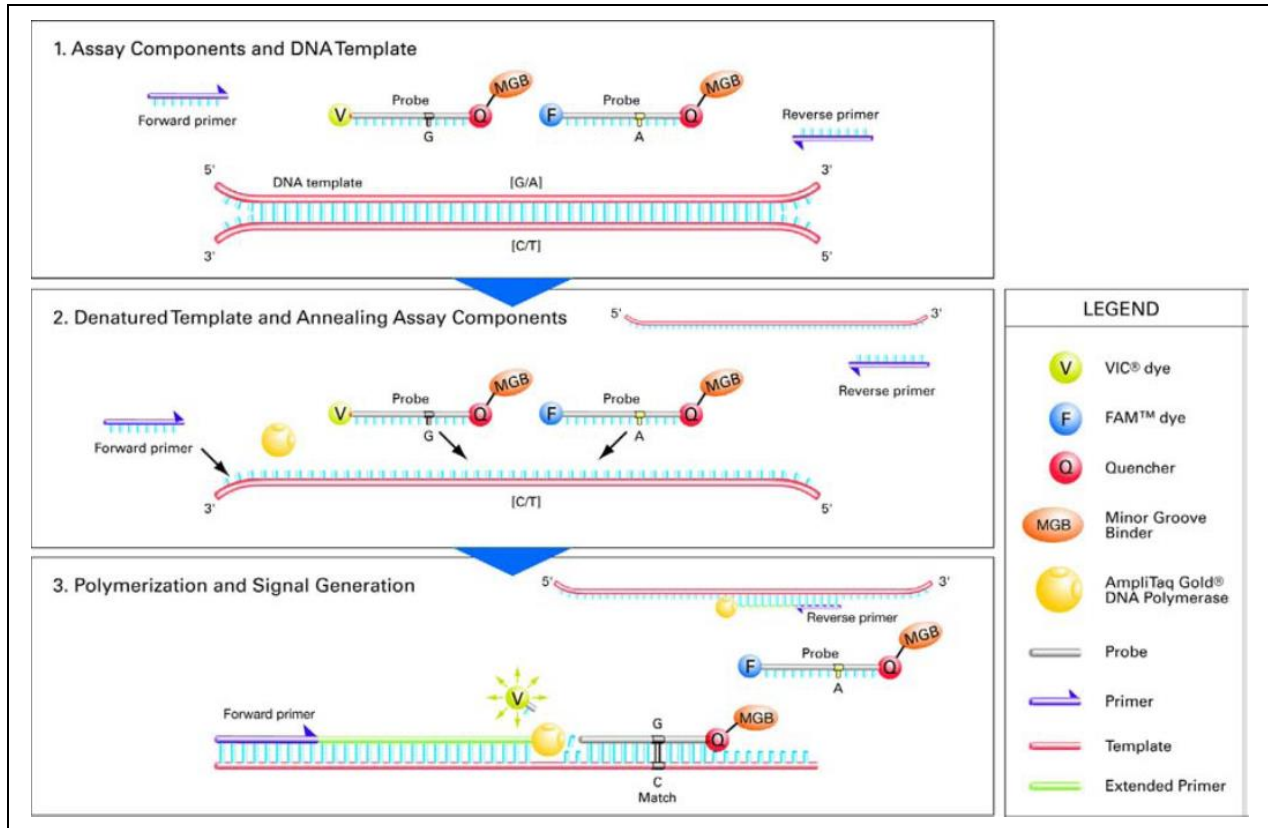
- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(8):753-62.
- Di Bartolomeo M, Pietrantonio F, Perrone F, Dotti KF, Lampis A, Bertan C, et al. Lack of KRAS, NRAS, BRAF and TP53 mutations improves outcome of elderly metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, oxaliplatin and UFT. *Target Oncol* 2014;9(2):155-62.
- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013;369(11):1023-34.
- Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention Working Group (EGAPP). Recommendations from the EGAPP Working Group: Can testing of tumor tissue for mutations in EGFR pathway downstream effector genes in patients with metastatic colorectal cancer improve health outcomes by guiding decisions regarding anti-EGFR therapy? *Genet Med* 2013;15(7):517-27.
- Garcia-Alfonso P, Garcia-Foncillas J, Salazar R, Perez-Segura P, Garcia-Carbonero R, Musulen-Palet E, et al. Updated guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma: A national consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2015;17(4):264-73.
- Gasparini G, Buttitta F, D'Andrea MR, Tumolo S, Buonadonna A, Pavese I, et al. Optimizing single agent panitumumab therapy in pre-treated advanced colorectal cancer. *Neoplasia* 2014;16(9):751-6.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, et al. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One* 2011;6(7):e22769.
- Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357(20):2040-8.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359(17):1757-65.
- Keating GM. Panitumumab: A review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2010;70(8):1059-78.
- Kircher SM, Mohindra N, Nimeiri H. Cost estimates and economic implications of expanded RAS testing in metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2015;20(1):14-8.
- Lin JS, Webber EM, Senger CA, Holmes RS, Whitlock EP. Systematic review of pharmacogenetic testing for predicting clinical benefit to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 2011;1(5):650-62.

- Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14(5-6):143-9.
- Mendelsohn J et Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19(56):6550-65.
- Morton RF et Hammond EH. ASCO Provisional Clinical Opinion: KRAS, cetuximab, and panitumumab—Clinical implications in colorectal cancer. *J Oncol Pract* 2009;5(2):71-2.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Colon cancer. Version 2.2015. Fort Washington, PA : NCCN; 2015. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, et al. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1902-12.
- Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ). Liste des médicaments - Établissements. Québec, Qc : RAMQ; 2014. Disponible à : <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/bs2425039>.
- Saridaki Z, Georgoulas V, Souglakos J. Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2010;16(10):1177-87.
- Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 2009;4(10):e7287.
- Sasson AR et Sigurdson ER. Surgical treatment of liver metastases. *Semin Oncol* 2002;29(2):107-18.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):295-308.
- Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: A randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(21):2240-7.
- Shen Y, Wang J, Han X, Yang H, Wang S, Lin D, Shi Y. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. *PLoS One* 2013;8(12):e81628.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2014. Toronto, ON : SCC; 2014. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2014-FR.pdf>.

- Tejpar S, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Ciardiello F, Esser R, et al. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. J Clin Oncol 2014;32(Suppl 3):abstract LBA444.
- Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2007;25(13):1658-64.
- Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer 2011;50(5):307-12.

ANNEXE A

Essai TaqMan®



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

ANNEXE B

Données internes de validation (Hôpital général juif)

Accuracy

Test name	Mutation Analysis of Exons 2,3, and 4 of the <i>N-Ras</i> Oncogene
Aims	To compare samples with and without mutations by 2 different methods, namely High Resolution Melting (HRM) and the Entrogen N-RAS kit.
Samples	32 previously tested BRAF negative samples were screened by HRM to look for N-Ras mutation positive samples.
Methodology	Positive samples are sequenced for confirmation and characterization. These positive samples and some negative samples, identified by HRM are then tested using the Entrogen N-Ras kit.
Experimental results	One exon 2 mutation was found: G12D. Two exon 3 mutations were found: 2x Q61R. No exon 4 mutation was found by HRM. All 3 mutations were detected by the Entrogen kit. All negative samples tested negative by the Entrogen kit.
Interpretation	The Entrogen kit can accurately identify positive and negative samples.
Outcome/limitations	- There is still the need to validate accuracy for the detection of all 10 mutations detectable by the Entrogen kit. Due to the rarity of some mutations and non-availability of commercial standards, this is an on-going process and both HRM and the Entrogen kit are run in parallel. - Standards from Horizon Dx will be used to complete accuracy validation as they become available commercially.

Limit of detection

Test name	Mutation Analysis of Exons 2,3, and 4 of the <i>N-Ras</i> Oncogene
Aims	To determine the limit of detection (LOD) of the Entrogen N-Ras kit for the exon 3 mutation Q61K
Samples	Q61K Standard from Horizon Diagnostics (Cambridge, UK) at dilutions of 5%, 1% and 0.5%.
Methodology	Dilute 5% Stock Standard with 100% WT DNA. 5% ----- use undiluted 1% ----- 2uL 5% Q61K + 8uL WT 0.5% ----- 1uL 5% Q61K + 9uL WT
Experimental results	Refer to Table 1.
Interpretation	LOD established at 1% at a Ct value of <40 on the Roche LC 480.

Ct values of the 3 dilutions of Q61K for 4 test runs

	Q61K 5%	Q61K 1%	Q61K 0.5%
Run #1 VIC	28.63	28.58	28.67
Run #2 VIC	28.48	28.48	28.69
Run #3 VIC	28.57	28.61	28.73
Run #4 VIC	28.63	28.48	28.73
Run #1 FAM Pos Ctrl 27.74	35.79	39.40	43.03
Run #2 FAM Pos Ctrl 27.22	37.45	40.20	40.74
Run #3 FAM Pos Ctrl 27.61	36.22	38.73	39.75
Run #4 FAM Pos Ctrl 27.69	34.91	38.84	39.50
Mean	36.09	39.29	40.76

DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTINEURONAUX : ANTI-GANGLIOSIDES ET ANTI-MAG (2014.03.08)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur :** CHUM
- 1.2 Date de transmission des demandes d'examen au MSSS :** 2 décembre 2013
- 1.3 Date de réception des demandes à l'INESSS :** 1^{er} novembre 2014
- 1.4 Date de transmission de l'avis au ministre :** 27 février 2015

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.

Conflit d'intérêts

Le D^r Louis Gaboury de l'Hôtel-Dieu du CHUM se retire au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Détection des autoanticorps antineuronaux : anti-gangliosides (profil de gangliosides 2²⁸ de type IgG ou IgM) par méthode immunodot sur membrane et anti-MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) par immunofluorescence indirecte.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le demandeur utilise les trousse de la compagnie EUROIMMUN pour la détection des anticorps anti-gangliosides et anti-MAG.

2.2.1 Détection des autoanticorps anti-gangliosides

La trousse EUROLINE (EUROIMMUN) Ganglioside Profile 2 (IgM, IgG) utilise la technique immunodot sur membrane, sérum ou plasma. L'analyse est qualitative. La trousse comprend :

- des bandelettes sur membranes recouvertes d'antigènes purifiés utilisées comme phase solide;
- une solution de conjugué enzymatique IgM ou IgG antihumain (de chèvre) conjuguée à la phosphatase alcaline;

²⁸ Profil de gangliosides 2 : GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b (EUROIMMUN. EUROLINE ganglioside profiles [site Web]. Disponible à : http://www.euroimmun.ch/uploads/media/DL_1130_I_UK_E02.pdf).

- un tampon universel pour les dilutions et une solution de substrat, le NBT/BCIP²⁹, qui colore les anticorps liés.

Technique

Dans la première étape de l'analyse, les bandelettes sont incubées avec le sérum du patient, une première fois avec le tampon universel et une seconde fois avec la solution de conjugué enzymatique. Une courte étape d'incubation (10 minutes) précède l'interprétation visuelle ou numérique (EUROLineScan³⁰) des bandes apparues selon l'intensité du signal : pas de signal (résultat négatif), bande très faible (résultat limite), bande de moyenne à forte (résultat positif), bande très forte avec une intensité comparable à celle de la bande témoin (résultats fortement positifs) [EUROIMMUN, 2008a; 2008b].

2.2.2 Détection des autoanticorps anti-MAG

La trousse Neurology Mosaic 1 (EUROIMMUN) utilise une analyse tissulaire par immunofluorescence indirecte (IFI) sur une microplaque à 6 BIOCHIPS³¹ regroupant des substrats (coupes de tissus de cervelet ou de nerf périphérique de primate). Elle permet l'identification simultanée d'anticorps anti-MAG sur tissus de nerfs périphériques et d'autres anticorps (p. ex. anti-Yo, anti-Hu, Ri, GAD) sur tissus de cervelet.

Technique

Les échantillons à tester (sérum dilué au 1:10 dans du PBS³²-Tween) sont déposés sur un support d'incubation selon la technique TITERPLANETM. La lame contenant les biopuces avec les différents substrats est ensuite déposée sur ce même support de sorte qu'elle entre en contact avec les liquides et que chaque échantillon réagisse en même temps. En cas de réactions positives, des anticorps spécifiques de la classe IgA, IgG et IgM se lient aux antigènes fixés à la phase solide (BIOCHIP). Les anticorps liés sont détectés avec des anticorps anti-IgG antihumain marqués à la fluorescéine et rendus visibles au microscope à fluorescence. Une réaction positive à 1:10 avec présence de symptômes cliniques typiques indique une neuropathie associée à une gammopathie à IgM [EUROIMMUN, 2012].

2.3 Société ou développeur

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

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Trousses homologuées par Santé Canada :

- EUROLINE ANTI-GANGLIOSIDES-PROFILE 2 (IgG) (n° 80774);
- EUROLINE ANTI-GANGLIOSIDES-PROFILE 2 (IgM) (n° 80773);
- NEUROLOGY MOSAIC 1 pour l'anti-MAG (n° 75928).

²⁹ NBT/BCIP : Nitrobluetetrazolumchloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolykphosphate.

³⁰ Bio Advance. EUROLineScan : Lecteur de Dot et Western blots [site Web]. Disponible à : <http://www.bio-advance.com/index.php/autres/euroline-scan>.

³¹ EUROIMMUN. Autoantibodies against neuronal antigens [site Web]. Disponible à : http://www.euroimmun.de/index.php?id=aak_gegen_neuronale_antigene&L=1.

³² PBS : Phosphate Buffered Saline.

2.7 Valeur pondérée

- anti-gangliosides profil 2 (IgG et IgM) : 66,33.
- anti-MAG : 25,12.

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

3.1 Patients ciblés

Les analyses ciblent les patients avec un contexte clinique en faveur de polyneuropathies périphériques auto-immunes.

3.2 Description de la maladie visée

Les neuropathies périphériques auto-immunes (NPAI) constituent un groupe hétérogène de maladies du système nerveux périphérique. La classification est établie en fonction des symptômes cliniques (type sensitivomoteur), de l'évolution de la maladie et des examens paracliniques (électrophysiologie et détection des anticorps sériques). Parmi les NPAI les plus fréquentes, on observe [Lehmann *et al.*, 2009] :

- le syndrome de Guillain-Barré (SGB), une forme aiguë de NPAI causée par une destruction de la gaine de myéline ou des axones, se manifeste cliniquement par : douleur et paresthésie des membres et faiblesse musculaire avec une évolution rapide de distale à proximale. L'incidence est de 1 à 2 cas par 100 000 habitants. Il en existe plusieurs variantes cliniques telles que la polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante aiguë, plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord; ainsi que la neuropathie axonale motrice aiguë et la neuropathie sensitivomotrice axonale aiguë, plus fréquentes en Amérique du Sud, en Chine et au Japon. Le syndrome de Miller-Fisher et la variante pharyngo-cervico-brachiale sont des formes moins typiques.
- la polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique qui se caractérise cliniquement par une faiblesse musculaire proximale et distale, des déficits sensoriels et une diminution des réflexes tendineux avec une progression plus longue sur une période de plus de huit semaines. Son incidence est de 1 à 3 cas par 100 000 habitants [Lehmann *et al.*, 2009].

Ces NPAI aiguës et chroniques ont été associées à la présence d'autoanticorps dirigés contre des gangliosides qui font partie de la famille des glycosphingolipides (voir le tableau 1) [Steck *et al.*, 2013], qui jouent un rôle important dans des fonctions biologiques telles que la croissance et la différenciation cellulaire [Kaida *et al.*, 2009]. La nomenclature proposée par Svennerholm est largement utilisée pour la classification des gangliosides (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1977; Svennerholm, 1994 dans Willison et Yuki [2002, p. 2593]). Elle présente des désignations basées sur le nombre de gangliosides contenus dans le tissu nerveux et la position des acides sialiques, soit des gangliosides appartenant à la série G³³ : GM1, GD1a, GD1b, GQ1b et GT1b et les lettres M, D, T correspondent à mono-, di- et tri-acides sialiques, la lettre Q désigne 4 résidus d'acide sialique [Quittard-Pinon, 2012; Willison et Yuki, 2002]. Les lettres a et b correspondent à la position de l'acide sialique³⁴ [Quittard-Pinon, 2012]. Les anticorps anti-gangliosides,

³³ La lettre G signifie ganglioside.

³⁴ La lettre « a » pour un acide sialique attaché au galactose interne et la lettre « b » pour deux acides sialiques.

principalement de type IgG, sont associés aux formes aiguës et présents dans le sérum d'environ 60 % des patients atteints du SGB. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs diagnostiques [Kusunoki et Kaida, 2011].

Tableau 1 Anticorps anti-gangliosides, signes neurologiques et diagnostic clinique

Anticorps (IgG) dirigés contre les gangliosides suivants	Diagnostic clinique
GM1, GM1b, GD1a	Neuropathie axonale motrice aiguë
GQ1b et GT1a	Syndrome de Miller-Fisher Encéphalite du tronc cérébral de Bickerstaff
GQ1b et GT1a	Ophtalmoparesie aiguë sans ataxie
GQ1b et GT1a	Neuropathie ataxique aiguë
GQ1b et GT1a	Paralysie oropharyngée aiguë
GT1a seule ou GT1a et GQ1b	Faiblesse pharyngo-cervico-brachiale

Source : traduit de Steck *et al.*, 2013.

La neuropathie à anti-MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) représente plus de 70 % des gammopathies monoclonales de type IgM liées à des polyneuropathies démyélinisantes. Cliniquement, elle débute généralement par un engourdissement, des paresthésies au niveau des pieds, une démarche instable, et rarement par une faiblesse musculaire. Le début est insidieux et la maladie progresse lentement au fil des années et peut causer une invalidité [Steck *et al.*, 2013]. La glycoprotéine associée à la myéline (MAG) est une glycoprotéine membranaire située au niveau de la gaine de myéline des nerfs périphériques qui contrôle le diamètre axonal et assure une protection contre la lyse cellulaire (excitotoxicité). Elle est composée de cinq domaines Ig-Like et d'un épitope HNK1 commun avec d'autres molécules de la myéline telles que des glycoprotéines (P0, PMP-22) et glycolipides (SGPG et SGLPG³⁵) [Pihan *et al.*, 2012], ce qui explique les réactions croisées de la plupart des anti-MAG avec ces composants [Steck *et al.*, 2013]. Le dépôt d'anticorps anti-MAG (IgM) induit une démyélinisation et une dégénérescence des axones [Pihan *et al.*, 2012].

Tableau 2 Présentation clinique des neuropathies auto-immunes chroniques associées à des anticorps IgM ciblant des antigènes des nerfs périphériques

ANTICORPS (IGM) DIRIGÉS CONTRE LES ANTIGÈNES SUIVANTS	CLINIQUE
MAG/SGPG (monoclonale)	Neuropathie démyélinisante distale symétrique
GM1 (polyclonale rarement monoclonale)	Neuropathie motrice multifocale
GD1a et GD1b (polyclonale ou monoclonale)	Neuropathie motrice multifocale

Source : Steck *et al.*, 2013.

³⁵ SGPG : glycolipids sulfoglucuronyl paragloboside et SGLPG : sulfoglucuronyllactosaminyl paragloboside.

En général, les soins de soutien et un traitement immunomodulateur (échanges plasmatiques et immunoglobulines par voie intraveineuse) sont les principales approches thérapeutiques du SGB. Le traitement actuel de la polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique vise à moduler ou à supprimer l'inflammation de façon à prévenir les lésions des fibres nerveuses et une dégénérescence axonale ultérieure.

Les corticostéroïdes, les immunoglobulines par voie intraveineuse et les échanges plasmatiques sont les piliers du traitement. Un traitement adéquat hématologique est nécessaire dans les cas où un trouble lymphoprolifératif est reconnu comme étant la cause de la gammopathie monoclonale [Lehman *et al.*, 2009].

3.3 Nombre de patients visés

Nombre de tests annuels attendus pour le Québec : entre 80 et 100 analyses par année au cours des trois prochaines années.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Neurologie, hémato-oncologie.

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 de la technologie diagnostique : Analyse unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le diagnostic des NPAI est basé sur un examen clinique et des tests sanguins standards. L'examen électrophysiologique (étude de la conduction nerveuse et électromyogramme) est recommandé pour confirmer un diagnostic incertain [Azhary *et al.*, 2010] et décrire le type d'atteinte (sensitivomotrice, axonale ou myélinique) [Goetz et Humbel, 2008].

Une approche multiparamétrique permettant la détermination d'un large éventail d'anticorps anti-gangliosides (IgG et IgM) est nécessaire pour améliorer le diagnostic sérologique des NPAI [Conrad *et al.*, 2007]. Différentes méthodes ELISA, techniques Blot et procédures immunochromatographiques sont utilisées pour la détection d'anticorps anti-gangliosides [Gorenjac, 2004]. La méthode ELISA a été introduite en routine pour certains des anticorps les plus pertinents (p. ex. anti-GM1 et anti-GQ1b) [Conrad *et al.*, 2007]. Cependant, elle présente des difficultés techniques avec des variables telles que la source et la pureté de l'antigène ainsi que la définition des valeurs de référence pour les titres de sérum, contribuant ainsi à une variation inter- et intra-laboratoire [Willison et Yuki, 2002].

Les anticorps anti-MAG (IgM) sont habituellement testés par méthode ELISA ou Western blot [Steck *et al.*, 2013]. La méthode ELISA semble avoir une meilleure sensibilité clinique, ce qui n'est pas le cas pour sa spécificité en raison d'un manque de purification de la protéine MAG [Caudie *et al.*, 2006]. Elle a également la capacité de détecter de faibles concentrations anti-MAG (IgM) qui peuvent être présentes dans d'autres NPAI et qui ne sont pas associées à une démyélinisation active [Jaskowski *et al.*, 2007].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La méthode immunodot permet la recherche simultanée de plusieurs antigangliosides sur une même bandelette et l'identification du ganglioside immunodominant. De plus, elle est facile à réaliser et à interpréter, par comparaison de l'intensité de la coloration de la bande témoin (coloration intense correspondant à un résultat fortement positif) [Conrad *et al.*, 2007].

L'interprétation des résultats peut être automatisée (EUROLineScan). L'IFI permet une évaluation quantitative et qualitative plus rapide. Elle utilise pour substrats des coupes de cervelet de rat plutôt que des matériaux ou des lignées cellulaires d'origine humaine [Matà *et al.*, 2011].

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

La détection des autoanticorps anti-gangliosides et anti-MAG sont de nouvelles analyses.

5.1.2 Valeur diagnostique ou thérapeutique

La détection d'anti-gangliosides (IgG et IgM) a un intérêt diagnostique. Elle permet de confirmer l'origine autoimmune de la neuropathie périphérique, de repérer le ganglioside immunodominant et les entités immunocliniques de NPAI auquel il s'associe particulièrement lorsque le diagnostic clinique et les signes électrophysiologiques sont douteux et d'avoir recours rapidement au traitement immunomodulateur le plus adapté.

La détection des anti-MAG a également un intérêt diagnostique. Des titres très élevés d'anticorps anti-MAG (IgM) sont étroitement associés à la polyneuropathie démyélinisante associée à la gammapathie monoclonale à IgM [Latov, 2014], alors que des titres légèrement élevés peuvent être présents chez des sujets sains ou avec d'autres types de neuropathie [Latov, 2014; EFNS/PNS, 2010]. D'autres auteurs suggèrent de rechercher ces anticorps dans les cas de neuropathies lentement progressives d'étiologie inconnue, même en l'absence de la protéine sérique monoclonale [Steck *et al.*, 2013].

Le lien entre la présence d'anti-gangliosides ou d'anti-MAG et la mortalité ou la survie n'a pas été relevée dans la littérature.

5.2 Validité clinique

Quatre études [Caudie *et al.*, 2013 et 2011; Meena *et al.*, 2010; Conrad *et al.*, 2007] ont évalué la performance diagnostique de la méthode immunodot pour la détection d'anticorps anti-gangliosides dans le sérum de patients atteints de neuropathies périphériques aiguës ou chroniques. La trousse EUROLINE (EUROIMMUN) a été testée par deux études [Caudie *et al.*, 2013; Meena *et al.*, 2010]. L'analyse des résultats a permis de constater que les profils utilisés sont variables en nombre (de 7 à 11 gangliosides) et que certains gangliosides (GD2, GD3, GT1a) n'étaient pas testés par la trousse EUROLINE (EUROIMMUN), ce qui rend la comparaison des résultats difficile (voir le tableau 3).

Tableau 3 Fréquence des anticorps anti-gangliosides détectés dans les neuropathies auto-immunes par méthode immunodot

ÉTUDE	Nbre DES PATIENTS DIAGNOSTIC	TÉMOIN	TROUSSE	PROFIL DE GANGLIOSIDES TESTÉ	FRÉQUENCE DES GANGLIOSIDES DÉTECTÉS			TÉMOIN
					PATIENTS			
					Anticorps (IgG et IgM) n/N (%)	IgG n/N (%)	IgM n/N (%)	
Caudie <i>et al.</i> , 2013	33 NPAI Aiguë : 15 Chronique : 18	10 NNAI	« maison »	GM1, GM2, GM3, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	33/33 (100) *	12/12 (100) *	21/21 (100)*	0/10
			EUROLINE (EUROIMMUN)	GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	13/33 (39,4) *	4/12 (33) *	9/21 (43)*	
			Generic Assay	GM1 GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b	33/33 (100) *	12/12 (100) *	21/21 (100)*	
			Ingen	GM1, GM2, GM3, GD3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b	14/33 (42,4) *	3/12 (25) *	11/21 (52,4)*	
Caudie <i>et al.</i> , 2011	306 SGB	74 SAL 51 PDIC 17 infections à CMV sans atteintes neurologiques 21 sujets sains	« maison »	GM1, GM2, GM3, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	97/306 (31,7) contre au moins un ganglioside			0 /163 (IgG) anti-GM1 et GD1b (IgM) : 15 % SAL 19 % PDIC 9 % sujets sains Anti-GM2 (IgM) : 47 % infection à CMV sans atteintes neurologiques

ÉTUDE	Nbre DES PATIENTS DIAGNOSTIC	TÉMOIN	TROUSSE	PROFIL DE GANGLIOSIDES TESTÉ	FRÉQUENCE DES GANGLIOSIDES DÉTECTÉS			TÉMOIN
					PATIENTS			
					Anticorps (IgG et IgM) n/N (%)	IgG n/N (%)	IgM n/N (%)	
Meena <i>et al.</i> , 2010	73 SGB	NS	EUROLINE (EUROIMMUN)	GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	4/73 (5,5) réactions + contre tout l'échantillon 22 réactions + contre 1 G 7 réactions + contre 2 G 12 réactions + contre plus de 2 G	GM1 (59) GT1b (34) GM2 (26) GD1b (25) GM3 (22) GQ1b (22) GD1a (21)	GM1 (25) GM2 (19) GT1b et GQ1b (16,6) GD1b (15) GD1a (12,4) GM3 (8)	
Conrad <i>et al.</i> , 2007	77 NPAI aiguë ou chronique	60 donneurs de sang 30 LED	Immunodot ³⁶	GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b	97,4 % contre au moins 1 G	GM1 (22,1) GT1a (32,5) GQ1b (19,5)	GM1 (37,7) GT1a (23,4) GM2 (18,2)	12,2 % (IgG ou IgM) contre au moins 1 G

Abréviations : CMV : cytomégalo virus; G : ganglioside; LED : lupus érythémateux disséminé; N : nombre total de patients; n : nombre de patients positifs; NNAI : neuropathie non auto-immune; NPAI : neuropathie auto-immune; NS : non signalé; PDIC : polyneuropathie démyélinisante inflammatoire chronique; SAL : sclérose amyotrophique latérale; SGB : syndrome de Guillain-Barré.

*Il s'agit de sérums testés avec des profils obtenus avec la méthode immunodot « maison » : 12 profils de type IgG : 5 profils GM1, GD1b; 1 profil GD1a, GT1a, GQ1b; 1 profil GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b; 1 profil GT1a; 4 profils GT1a et GQ1b et 21 profils de type IgM : 12 profils GD1b, GD3, GT1b, GQ1b; 3 profils GM1 et GD1b; 1 profil GD1a et GT1b; 2 profils GM2 ; 1 profil sulfatides >GD1b>GM1; 1 profil GM1>GD1b; 1 profil GM1 et GD1b (IgG et IgM). Ces sérums sont analysés avec les trousses EUROLINE (EUROIMMUN), Generic Assay et Ingen. Les résultats obtenus pour chacune de ces trousses représentent les profils attendus correspondant à ceux obtenus par la méthode « maison ».

³⁶ Trousse commerciale développée en collaboration avec Attomol GmbH (Lipten, Allemagne), GA Generic Assays GmbH (Dahlewitz, Allemagne) et René-Louis Humbel (LLIP Laboratoire Luxembourgeois d'Immuno-Pathologie).

Caudie et ses collaborateurs [2013] ont analysé le profil de patients sélectionnés avec des profils hautement spécifiques (fortement positifs) d'une neuropathie périphérique par méthode immunodot « maison » pour en faciliter la comparaison avec d'autres trousse commerciales (Generic Assay, Ingen et EUROIMMUN). Les résultats (voir le tableau A2 en annexe) ont été comparés selon des critères de positivité minimaux et recommandés (voir le tableau A1 en annexe). La méthode immunodot « maison » a permis de détecter deux types de profil (IgG³⁷ et IgM³⁸) décrits dans des travaux ultérieurs [Quittard-Pinon, 2012]. Cinq gangliosides étaient immunodominants et sont inclus dans tous les tests (GM1, GM2, GD1a, G1b et GQ1b).

Selon les résultats obtenus, les trousse EUROLINE (EUROIMMUN) et Ingen ont des sensibilités de 39,4 % et de 42,4 % respectivement, alors que la technique immunodot (Generic assays) et la méthode « maison » présentent une sensibilité de 100 %. Pour la trousse EUROLINE (EUROIMMUN), plusieurs lignes étaient absentes sur les bandelettes ou l'intensité de la coloration des lignes visibles était très faible comparativement aux autres trousse et à la méthode « maison ». Dans leur publication précédente [Quittard-Pinon, 2012], les auteurs de l'étude suggèrent que la sensibilité de la trousse EUROLINE (EUROIMMUN) pourrait être améliorée par l'utilisation de faible dilution et celle de la trousse Ingen par une augmentation du volume de sérum [Caudie *et al.*, 2013].

Tous les tests évalués ont identifié des anticorps dirigés contre un ou plusieurs gangliosides, mais pas nécessairement contre tous les gangliosides attendus. Les trousse EUROLINE (EUROIMMUN) et Ingen se sont avérées moins spécifiques. Les résultats de cette étude montrent un besoin de standardisation des trousse commerciales disponibles [Caudie *et al.*, 2013; Quittard-Pinon, 2012].

La sensibilité de la trousse EUROLINE (EUROIMMUN) était toute aussi faible dans l'analyse de Meena et ses collaborateurs [2010]. Une réaction positive contre tout le panel de gangliosides a été observée pour 4 échantillons seulement. Chez 31,7 % et 97,4 % des patients, la méthode immunodot « maison » a détecté des anticorps anti-gangliosides contre au moins un ganglioside [Caudie *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2007].

Spécificité

La spécificité de la méthode immunodot varie de 87,8 % à 100 % pour les antigangliosides de type IgG [Caudie *et al.*, 2013 et 2011; Conrad *et al.*, 2007], la spécificité de la trousse EUROIMMUN étant de 100 % [Caudie *et al.*, 2013]. Les anticorps antigangliosides de type IgM, anti-GM1, anti-GD1b et anti-GM2 sont détectés dans une étude [Caudie *et al.*, 2011].

En résumé, la majorité des études conclut à la nécessité de tester un large éventail de gangliosides par méthode immunodot pour déterminer la réactivité des anticorps avec différents déterminants glycolipidiques. La trousse Generic Assay et une méthode immunodot « maison » utilisée dans une étude [Caudie *et al.*, 2013] présentent une sensibilité de 100 %. La sensibilité de la trousse EUROLINE (EUROIMMUN) est de 39,4 % avec une très bonne spécificité (100 %).

³⁷ 5 profils GM1, GD1b; 1 profil GD1a, GT1a, GQ1b; 1 profil GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b; 1 profil GT1a; 4 profils GT1a et GQ1b.

³⁸ 12 profils GD1b, GD3, GT1b, GQ1b; 3 profils GM1 et GD1b; 1 profil GD1a et GT1b; 2 profils GM2 ; 1 profil sulfatides >GD1b>GM1; 1 profil GM1>GD1b; 1 profil GM1 et GD1b (IgG et IgM).

Détection des anti-MAG par immunofluorescence indirecte

Les résultats de trois études [Matà *et al.*, 2011, Caudie *et al.*, 2006, Takatsu *et al.*, 1985] confirment la présence d'anti-MAG par IFI chez de 61 % à 100 % des patients atteints de neuropathie démyélinisante et une spécificité de la méthode de 78 % à 100 %. Dans deux autres études [Jaskowski *et al.*, 2007; Van den Berg *et al.*, 1996], les anticorps anti-myéline (anti-MAG et SGPG) ont été décelés entre 92,5 % et 94 % des cas avec une spécificité de 94,3 % [Jaskowski *et al.*, 2007] (voir le tableau 4).

Tableau 4 Fréquence des anticorps anti-MAG (IgM) détectés par immunofluorescence indirecte

ÉTUDE	Nbre DES PATIENTS DIAGNOSTIC	Nbre DES TÉMOINS DIAGNOSTIC	POSITIFS n/N (%)	NÉGATIFS %
Matà <i>et al.</i> , 2011	20 PND	236 : 36 gammopathies monoclonales associées à une neuropathie sans anti-MAG, 100 autres maladies auto-immunes 100 maladies neurologiques non inflammatoires	20/20 (100)	100
Jaskowski <i>et al.</i> , 2007	40 NPAI	100 volontaires sains	37/40* (92,5)	94,3
Caudie <i>et al.</i> , 2006	117 PND	102 : 15 cas de neuropathies associées à une IgM monoclonale à forte activité anti-ganglioside GM1 9 cas de neuropathies avec IgM monoclonale à forte activité anti-gangliosides disialylés 17 cas de neuropathies périphériques avec IgM polyclonales anti-gangliosides 61 cas de neuropathies sans anticorps	NR (83)	95
Van den Berg <i>et al.</i> , 1996	16 PND	NS	15/16 (94)	
Takatsu <i>et al.</i> , 1985	28 PND	68 : 21 cas d'IgM sans évidence clinique de neuropathie 33 cas de polyneuropathies sans IgM 14 sujets sains.	17/28 (61)	78

Abréviations : N : nombre total de patients; n : nombre de patients positifs; NPAI : neuropathie auto-immune; NS : non signalé; PND : Polyneuropathie démyélinisante.

*La sensibilité a été calculée sur 40 sérums positifs issus de la méthode *Western blot* sur tissu cérébral humain.

5.3 Validité analytique (ou technique)

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

5.3.1 Reproductibilité

Détection des anti-gangliosides par méthode immunodot

La monographie de la trousse EUROLINE [EUROIMMUN, 2008a; 2008b] et une étude [Quittard-Pinon, 2012] indiquent une bonne reproductibilité de la méthode immunodot, sans toutefois fournir de données.

Détection des anti-MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) par immunofluorescence

La monographie du fabricant indique que 2 échantillons de sérums ont été utilisés pour tester la reproductibilité intra-essai (10 analyses parallèles) et inter-essai en 5 séries (testées en double). La reproductibilité inter-lot a été testée sur deux échantillons de sérum différents et 3 lots différents. Les résultats sont présentés selon des niveaux d'intensité de fluorescence de 0 (pas de fluorescence spécifique) à 5 (fluorescence extrêmement forte). Dans tous les cas, la déviation du niveau d'intensité de fluorescence n'excède pas ± 1 niveau pour tous les échantillons testés [EUROIMMUN, 2012].

5.3.2 Spécificité analytique

Interférence

Les trousses du fabricant pour la détection des anti-gangliosides par méthode immunodot et des anti-MAG par IFI ne rapportent aucune interférence avec des échantillons hémolysés, lipémiques et ictériques [EUROIMMUN, 2008a; 2008b].

Réactivité croisée

Les monographies du fabricant pour la détection des anti-gangliosides par méthode immunodot et des anti-MAG par IFI indiquent l'absence de réaction croisée observée avec d'autres autoanticorps [EUROIMMUN, 2012; 2008a; 2008b].

Corrélation

Détection des anti-MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) par immunofluorescence indirecte

Matà et ses collaborateurs [2011] ont comparé les méthode IFI et ELISA (Bühlmann) sur 20 cas de de polyneuropathie démyélinisante à activité anti-MAG. Le coefficient de corrélation de Spearman r est de 0,75 ($p = 0,02$).

Concordance

Concordance des résultats d'anti-MAG obtenus avec la méthode *Western blot* (MAG purifié extrait de cervelet humain) et la méthode IFI (substrat : coupe de nerf périphérique : 93,3 %); ELISA (MAG extrait de cervelet humain : 89,3 %) et *Western blot* (MAG extrait de cervelet de singe : 85,3 %) [Jaskowski *et al.*, 2007].

5.4 Recommandations d'autres organismes

Le seul guide de pratique répertorié est celui de l'European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society, qui a établi les critères suivants concernant la polyneuropathie démyélinisante à anti-MAG :

- la recherche d'anticorps anti-MAG doit être considérée dans tous les cas de polyneuropathie démyélinisante à IgM. En cas de résultats négatifs, la recherche d'anticorps (IgM) contre d'autres antigènes neuronaux, y compris les gangliosides GQ1b, GM1, GD1a et GD1b et SGPG, peut être envisagée. La présence de ces anticorps augmente seulement la probabilité d'un lien pathogénique entre la paraprotéine et la neuropathie.
- un lien de causalité entre la présence de la protéine sérique monoclonale et le diagnostic de neuropathie démyélinisante est très probable si l'on retrouve la présence de la paraprotéine de type IgM (MGUS ou maladie de Waldeström) et des titres élevés d'anticorps anti-MAG ou à la biopsie de nerfs, on décèle des anticorps de type IgM ou des dépôts de compléments sur la myéline [EFNS/PNS, 2010].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : Il n'a pas été analysé.

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

Elles n'ont pas été analysées.

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

Ils n'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Détection des anti-gangliosides par méthode immunodot

La détection des autoanticorps anti-gangliosides (IgG et IgM) permet de confirmer l'origine auto-immune des neuropathies périphériques, de repérer le ganglioside immunodominant, de différencier les entités immunocliniques et d'offrir le traitement immunomodulateur le plus adapté.

Détection des anti-MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) par immunofluorescence indirecte

La détection des anti-MAG (IgM) est une analyse utile au diagnostic de neuropathie démyélinisante associée aux gammopathies monoclonales.

7.2 Validité clinique

Détection des anti-gangliosides par méthode immunodot

La trousse EUROLINE (EUROIMMUN) a une faible sensibilité clinique pour la détection des anti-gangliosides dans le cas de neuropathies périphériques auto-immunes. Sa spécificité est toutefois de 100 % et comparable aux autres trousses. La méthode immunodot, selon une méthode « maison », présente une bonne performance clinique en termes de sensibilité et spécificité.

Détection des anti-MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) par immunofluorescence indirecte

Les données disponibles indiquent une sensibilité variable de 61 % à 100 % et une spécificité de 78 % à 100 %.

7.3 Validité analytique

Très peu d'information issue des monographies du fabricant et de rares études suggèrent une bonne performance analytique de la méthode immunodot pour la détection des anti-gangliosides et de l'IFI pour la détection des anti-MAG.

7.4 Recommandations d'autres organismes

La recherche d'anticorps anti-MAG doit être considérée dans tous les cas de polyneuropathie démyélinisante à IgM monoclonale [EFNS/PNS, 2010].

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Détection des autoanticorps antineuronaux : anti-gangliosides et anti-MAG

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 sur réception d'une demande complète (voir Note)

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

Les analyses (anti-MAG et anti-GM1) étaient inscrites dans le Répertoire du CUSM et codées 20687 (Anticorps tissulaires ou cellulaires). Ce code a été retiré de la version 2014-2015 du *Répertoire québécois*.

La personne-ressource contactée au laboratoire central de l'Hôpital Royal Victoria nous a informés que l'analyse n'est plus disponible dans son laboratoire en raison d'un volume insuffisant pour garantir l'expertise et assurer la qualité. Les analyses sont actuellement envoyées à Calgary (Alberta), au laboratoire du Dr Fritzler (Mitogen Advanced Diagnostics).

RÉFÉRENCES

- Azhary H, Farooq MU, Bhanushali M, Majid A, Kassab MY. Peripheral neuropathy: Differential diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2010;81(7):887-92.
- Caudie C, Quittard Pinon A, Bouhour F, Vial C, Garnier L, Fabien N. Comparison of commercial tests for detecting multiple anti-ganglioside autoantibodies in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies. *Clin Lab* 2013;59(11-12):1277-87.
- Caudie C, Quittard Pinon A, Taravel D, Sivadon-Tardy V, Orlikowski D, Rozenberg F, et al. Preceding infections and anti-ganglioside antibody profiles assessed by a dot immunoassay in 306 French Guillain-Barré syndrome patients. *J Neurol* 2011;258(11):1958-64.
- Caudie C, Kaygisiz F, Jaquet P, Petiot P, Gonnaud PM, Antoine JC, Vial C. Les autoanticorps IgM anti-MAG par Elisa Bühlmann : apport diagnostique dans 117 neuropathies périphériques auto-immunes associées à une IgM monoclonale à activité anti-SGPG/SGLPG. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006;64(4):353-9.
- Conrad K, Schneider H, Ziemssen T, Talaska T, Reinhold D, Humbel RL, Roggenbuck D. A new line immunoassay for the multiparametric detection of antiganglioside autoantibodies in patients with autoimmune peripheral neuropathies. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:256-64.
- EUROIMMUN. Neurology mosaics: Instructions for the indirect immunofluorescence test. FA_1111-1_A_UK_C12.doc. Version: 23/03/2012. Lübeck, Allemagne : EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2012.
- EUROIMMUN. Antibodies against gangliosides (IgG). Test instruction for the Ganglioside Profile 2 EUROLINE. DL_1130-2G_A_UK_C06. Version 07/05/2008. Lübeck, Allemagne : EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2008a.
- EUROIMMUN. Antibodies against gangliosides (IgM). Test instruction for the Ganglioside Profile 2 EUROLINE. DL_1130-2m_A_UK_C06. Version 07/05/2008. Lübeck, Allemagne : EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2008b.
- European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of paraneoplastic demyelinating neuropathies. Report of a Joint Task Force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society – First revision. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15(3):185-95.
- Goetz J et Humbel R-L. Neuropathies périphériques auto-immunes. *Revue Francophone des Laboratoires* 2008;(404-bis):17-20.
- Gorenjac M. Clinical and diagnostic role of ganglioside antibody testing. *eJIFCC* 2004;15(3). Disponible à : <http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/150309200414.pdf>.

- Jaskowski TD, Prince HE, Greer RW, Litwin CM, Hill HR. Further comparisons of assays for detecting MAG IgM autoantibodies. *J Neuroimmunol* 2007;187(1-2):175-8.
- Kaida K, Ariga T, Yu RK. Antiganglioside antibodies and their pathophysiological effects on Guillain-Barré syndrome and related disorders—A review. *Glycobiology* 2009;19(7):676-92.
- Kusunoki S et Kaida K. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J Neurochem* 2011;116(5):828-32.
- Latov N. Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Nat Rev Neurol* 2014;10(8):435-46.
- Lehmann HC, Meyer Zu Horste G, Kieseier BC, Hartung HP. Pathogenesis and treatment of immune-mediated neuropathies. *Ther Adv Neurol Disord* 2009;2(4):261-81.
- Matà S, Ambrosini S, Mello T, Lolli F, Minciacchi D. Anti-myelin associated glycoprotein antibodies recognize HNK-1 epitope on CNS. *J Neuroimmunol* 2011;236(1-2):99-105.
- Meena AK, Archana AD, Reddy GC, Ramakrishna D, Rao P. Antiganglioside antibodies in sub types of Guillain-Barré syndrome in an Indian population. *J Med Sci* 2010;10(5):138-42.
- Pihan M, Decaux O, Marcorelles P, Bahun-Riedinger I, Lemerrier S, Gainche-Salmon A, Doncker AV. Neuropathies associées à une IgM monoclonale anti-MAG. *Rev Med Interne* 2012;33(12):686-92.
- Quittard-Pinon A. Détection des autoanticorps anti-gangliosides associés aux neuropathies périphériques auto-immunes : évaluation de 4 tests commerciaux [thèse]. Lyon, France : Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Pharmacie; 2012. Disponible à : <http://n2t.net/ark:/47881/m6x34vhq>.
- Steck A, Yuki N, Graus F. Antibody testing in peripheral nerve disorders. *Handb Clin Neurol* 2013;115:189-212.
- Takatsu M, Hays AP, Latov N, Abrams GM, Nemni R, Sherman WH, et al. Immunofluorescence study of patients with neuropathy and IgM M proteins. *Ann Neurol* 1985;18(2):173-81.
- Van den Berg L, Hays AP, Nobile-Orazio E, Kinsella LJ, Manfredini E, Corbo M, et al. Anti-MAG and anti-SGPG antibodies in neuropathy. *Muscle Nerve* 1996;19(5):637-43.
- Willison HJ et Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 2002;125(Pt 12):2591-625.

ANNEXE A

Tableau A1 Critères de positivité minimaux et recommandés

DIAGNOSTIC CLINIQUE	CRITÈRES DE POSITIVITÉ RECOMMANDÉS	CRITÈRES DE POSITIVITÉ MINIMUMS BASÉS SUR UN PROFIL INCLUANT 5 GANGLIOSIDES IMMUNODOMINANTS
SGB avec ophtalmoplégie	GQ1b et GD1a /GT1a/GT1b additionnel (IgG)	GQ1b (IgG)
SGB : neuropathie axonale motrice aiguë	GM1, GD1a et GT1a/ GT1b additionnel (IgG)	GM1 et GD1a (IgG)
SGB : neuropathie axonale motrice et sensitive aiguë	GM1, GD1a, GD1b et GT1a/GT1b (IgG)	GM1, GD1a and GD1b (IgG)
SFM	GT1a et GQ1b (IgG)	GQ1b (IgG)
SGB post-infection à cytomégalo virus	GM2 (IgM)	GM2 IgM
Neuropathie périphérique motrice chronique à IgM	GM1 et GD1b	Titres élevés de GM1 avec IgM monoclonal
CANOMAD	GD1b, GD3, GT1b, GQ1b IgM	Titres élevés d'anticorps (IgM) : GQ1b et un disialylgangliosides entre : GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b
Neuropathie multifocale motrice avec bloc de conduction	GM1et GD1b IgM	GM1 (IgM)

Abréviations : CANOMAD (Chronic Ataxic Neuropathy, Ophthalmoplegia, Monoclonal IgM protein, cold Agglutinins and Disialosyl antibodies); SGB : Guillain-Barré, SFM : Miller-Fisher.

Source : Caudie *et al.*, 2013.

Tableau A2 Nombre d'échantillons positifs selon les critères de positivité minimaux et recommandés obtenus par méthode immunodot « maison » et 3 troussees commerciales [Caudie *et al.*, 2013]

Formes cliniques	Nombre d'échantillons (Type Ig)	Profil de gangliosides	Critères de positivité minimaux				Critères de positivité recommandés			
			Immundot maison N	Immundot (Generic Assay) N	Immunodot (Ingen) N	Immundot (EUROIMMUN) N	Immundot maison N	Immundot (Generic Assay) N	Immunodot (Ingen) N	Immundot (EUROIMMUN) N
NAAMS et NAMA	6 (IgG)	Anti-GM1 > GD1b	6	6	3	1	6	6	3	1
SFM	4 (IgG)	GQ1b	4	4	2	3	0	4	1	0
SGB avec ophtalmoplégie	1 (IgG)	GD1a, GQ1b	1	1	0	0	0	1	0	0
	1 (IgG)	GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	1	1	0	0	1	1	0	0
SGB post-infectieux à CMV	2 (IgM)	GM2	2	2	2	2	2	2	2	2
SGB post-infectieux à CJ avec forme axonale motrice	1 (IgM et IgG)	GM1 et GD1b	1	1	0	0	1	1	0	0
Total	15		15 (100 %)	15 (100 %)	7 (47 %)	6 (40 %)	10 (67 %)	15 (100 %)	6 (40 %)	3 (20 %)
Syndrome de CANOMAD	12 (IgM-monoclonal)	GD1b, GD3, GT1b	12	12	6	5	12	10	3	0
NMC	3 (IgM-monoclonal)	GM1, GD1b	3	3	2	1	3	3	2	1
NMC avec lymphome	1 (IgM-monoclonal)	GD1a, GT1b	1	1	1	1	1	1	1	1
NSC	1 (IgM-monoclonal)	Anti-sulfatides > GD1b > GM1	1	1	1	1	1	1	1	1
NMM	1 (IgM-monoclonal)	GM1 > GD1b	1	1	0	0	1	0	0	0
Total	18		18 (100 %)	18 (100 %)	10 (55,5 %)	8 (44,4 %)	18 (100 %)	15 (83 %)	7 (39 %)	3 (17 %)

Abréviations : CANOMAD (Chronic Ataxic Neuropathy, Ophthalmoplegia, Monoclonal IgM protein, cold Agglutinins and Disialosyl antibodies); CJ : Campylobacter jejuni, CMV : cytomégalovirus; N : nombre d'échantillons positifs; NAAMS : neuropathie axonale motrice et sensitive aiguë; NAMA : neuropathie axonale motrice aiguë; NMC : neuropathie motrice chronique; NMM : neuropathie multifocale motrice avec bloc de conduction; NSC : neuropathie sensitive chronique; SGB : syndrome de Guillain-Barré; SFM : syndrome de Miller-Fisher.

PROFIL SÉROLOGIQUE DE L'HÉPATITE AUTO-IMMUNE PAR LINEBLOT (RÉFÉRENCE – 2014.03.10)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeurs** : CHU Ste-Justine
- 1.2 **Date de transmission des demandes d'examen au MSSS** : 30 septembre 2014
- 1.3 **Date de réception des demandes à l'INESSS** : 3 novembre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

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** : Profil sérologique par lineblot.
- 2.2 **Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques**

La trousse d'analyse EUROLINE Autoimmune Liver Diseases (IgG) (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG, Lübeck, Allemagne)³⁹ utilise la technique lineblot pour la détection semi-quantitative des autoanticorps sériques dirigés contre neuf antigènes associés aux maladies hépatiques auto-immunes. Les autoanticorps dirigés contre les antigènes AMA-M2, M2-3E (BPO), Sp100, PML et gp210 sont associés à la cirrhose biliaire primitive (CBP⁴⁰), les autoanticorps anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP sont associés à l'hépatite auto-immune (HAI⁴¹) et les autoanticorps anti-Ro-52 sont associés aux maladies auto-immunes rhumatismales et à l'HAI.

L'analyse par lineblot (ou *Line immunoassay*) est une méthode immunochimique qui permet de réaliser la détection de plusieurs autoanticorps simultanément dans les mêmes conditions (analyse multiplexe), comparativement à l'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), qui est une méthode immunochimique courante réalisée en plaques de 96 puits pour la détection d'un analyte à la fois.

Les antigènes purifiés sont préabsorbés en courtes stries parallèles sur des bandelettes (voir la figure 1). Dans un premier temps, chaque échantillon de sérum préalablement dilué selon les instructions de la trousse est incubé avec une bandelette afin de permettre la fixation des autoanticorps spécifiques présents dans le sérum aux antigènes de la bandelette⁴². Les

³⁹ Aux fins d'alléger le texte, nous utiliserons « EUROLINE » pour référer à la trousse d'analyse EUROLINE Autoimmune Liver Diseases (IgG) (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG, Lübeck, Allemagne).

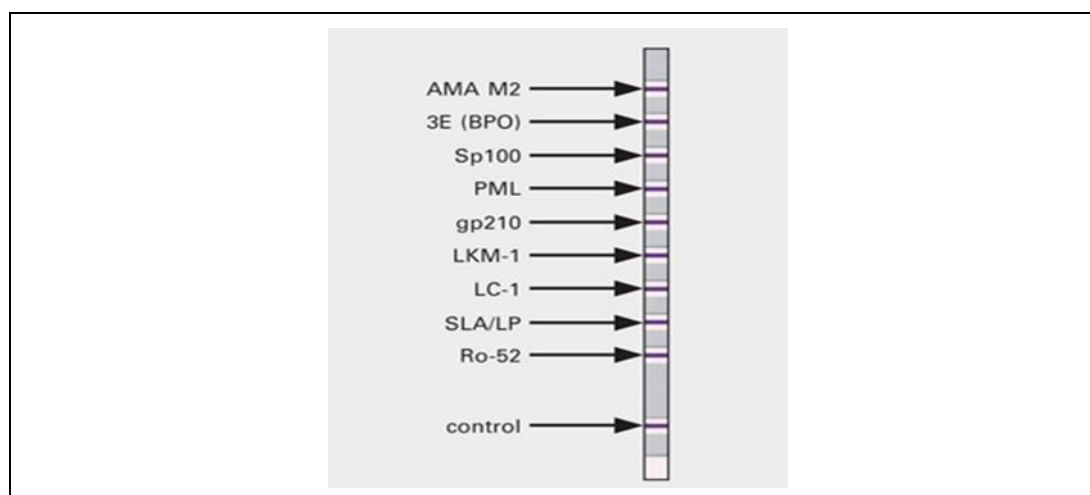
⁴⁰ En anglais, PBC : *Primary Biliary Cirrhosis*.

⁴¹ En anglais, AIH : *Autoimmune Hepatitis*.

⁴² Les étapes d'incubation et de lavage sont réalisées à l'aide de l'appareil EUROBlotMaster (EUROIMMUN).

autoanticorps non fixés à la bandelette sont lavés puis, une seconde période d'incubation est réalisée en présence d'un anticorps de détection couplé à la phosphatase alcaline. Les anticorps non fixés à la bandelette sont à nouveau lavés préalablement à la troisième incubation en présence d'une solution de substrat-chromogène. La réaction du substrat avec la phosphatase alcaline permettra le développement d'une coloration d'intensité proportionnelle au titre en autoanticorps sur la strie correspondante. L'évaluation des résultats peut être visuelle ou automatisée. Dans ce dernier cas, les bandelettes sont numérisées et analysées à l'aide du logiciel EUROLIneScan (EUROIMMUN). Les résultats sont exprimés en échelle de gris (*grey scale units*) selon l'intensité des stries obtenues. Une valeur de 0 à 5 est associée à un résultat négatif, de 6 à 10 à un résultat limite, de 11 à 25 ou de 26 à 50 (+ ou ++) à un résultat positif et > 50 à un résultat fortement positif.

Figure 1 Représentation schématique d'une bandelette de la trousse EUROLIne



Source : EUROIMMUN. EUROLIne: Profile Autoimmune Liver Diseases [site Web]. Disponible à : http://www.euroimmun.de/index.php?id=aak_gegen_leberantigene&L=1.

2.3 Société ou développeur

La compagnie EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG (Lübeck, Allemagne) fabrique la trousse EUROLIne Autoimmune Liver Diseases (IgG), l'appareil EUROBlotMaster nécessaire à l'incubation des bandelettes et le logiciel EUROLIneScan utilisé pour l'analyse des résultats.

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

- Trousse EUROLIne Autoimmune Liver Disease (IgG) (cat # DL 1300-1601-4G) Santé Canada (n° 82484) 2010-04-08.
- EUROBlotMaster : Santé Canada (n° 80267) 2009-07-21 (EUROBlotMaster), 2013-02-01 (EUROBlotMaster 44).
- EUROLIneScan : Santé Canada (n° 78982) 2009-02-04.

2.7 Valeur pondérée : 66,22.

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

3.1 Patients ciblés

Patients adultes et pédiatriques avec suspicion d'hépatite auto-immune, pour le diagnostic différentiel d'hépatites aiguës ou chroniques, dans les cas d'hépatite C chronique atypiques ou en situation de rejet chronique post-transplantation hépatique.

3.2 Description de la maladie visée

Les maladies hépatiques auto-immunes représentent un large éventail de désordres qui peuvent affecter les hépatocytes dans les cas d'HAI ou les cholangiocytes⁴³ dans la CBP et la cholangite sclérosante primitive (CSP⁴⁴) [Achenza *et al.*, 2012].

L'HAI est une maladie hépatique inflammatoire chronique caractérisée par des niveaux élevés de transaminases (AST, ALT⁴⁵), d'immunoglobulines G (IgG) et d'autoanticorps ainsi que par la présence d'inflammation hépatocellulaire ou hépatite d'interface⁴⁶. L'HAI est classée en deux types, selon le profil d'autoanticorps sériques détectés. Le type 1 est associé à la présence d'anticorps antinucléaires (*anti-nuclear antibody*, ANA), d'anticorps anti-antigène hépatiques solubles (*anti-soluble liver antigen antibody*, SLA) ou d'anticorps anti-muscle lisse (*anti-smooth muscle antibody*, SMA), alors que le type 2 est associé à la présence d'anticorps anti-LKM1 (*anti-liver-kidney-microsomal type 1*) et anti-LC1 (*anti-liver cytosol type 1*) [Liberal *et al.*, 2013; Achenza *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 1999]. Outre les autoanticorps dits conventionnels pour le diagnostic de l'HAI (ANA, SMA, anti-LKM1, anti-LC1) [Manns *et al.*, 2010], certains sous-types d'anticorps antinucléaires peuvent être mesurés afin d'aider au diagnostic d'autres maladies hépatiques auto-immunes (p. ex. anti-Sp100, anti-gp210 et AMA)⁴⁷ [Grunwald *et al.*, 2014; Lindor *et al.*, 2009].

La présence d'autoanticorps n'est toutefois pas spécifique aux maladies hépatiques auto-immunes puisqu'ils sont parfois détectés dans les cas d'hépatite alcoolique, de stéatose hépatique non alcoolique (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) et d'hépatites virales [Gleeson et Heneghan, 2011]. On peut également observer la présence d'autoanticorps dans les cas d'hépatite toxique (induite par un médicament ou un produit chimique toxique) [Castiella *et al.*, 2014] et lors d'une HAI dite *de novo* par suite d'une transplantation hépatique (à cause d'une maladie hépatique non auto-immune) [Fiel et Schiano, 2012; Mieli-Vergani et Vergani, 2004].

Aucun symptôme ou présentation clinique explicite ne permet d'identifier directement l'HAI. Ainsi le diagnostic repose sur une combinaison de caractéristiques biochimiques, immunologiques et histologiques concordantes avec l'exclusion des autres maladies hépatiques (diagnostic d'exclusion). À titre d'exemple, l'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (voir l'annexe A) présente l'algorithme diagnostique de l'HAI et d'autres maladies hépatiques auto-immunes sur la base du profil sérologique du patient [Manns *et al.*, 2010]. Le diagnostic peut également être guidé à l'aide des critères établis par

⁴³ Les cholangiocytes sont des cellules épithéliales qui tapissent les canaux biliaires dont la principale fonction est la transformation de la bile [Tabibian *et al.*, 2013].

⁴⁴ En anglais, PSC : *Primary Sclerosing Cholangitis*.

⁴⁵ AST : aspartate-transaminase; ALT : alanine-transaminase.

⁴⁶ Infiltration massive de lymphocytes et de plasmocytes dans le tissu hépatique au niveau portal, péri-portal ou para-septal [Floreani *et al.*, 2013].

⁴⁷ AMA : *anti-mitochondrial antibody*.

l'International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) qui incluent les titres sériques en autoanticorps ANA, SMA, SLA et LKM1 déterminés par immunofluorescence indirecte sur coupes de tissus (foie, rein et estomac de rat) [Hennes *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 1999] (voir l'annexe B). Ces critères permettent de différencier les patients atteints d'HAI de ceux souffrant d'autres maladies hépatiques, mais aussi de discriminer entre l'HAI de types 1 et 2.

Épidémiologie

L'HAI est principalement une maladie pédiatrique : 40 % des cas de type 1 et 80 % des cas de type 2 sont diagnostiqués avant l'âge de 18 ans (âge moyen à l'apparition de la maladie : 10 ans et 6,5 ans, respectivement) [Alvarez, 2006; Gregorio *et al.*, 1997]. La prévalence de l'HAI est de 10 à 20 cas/100 000 individus et est plus fréquente chez les femmes [Grunwald *et al.*, 2014]. Toutefois, la prévalence de l'HAI au Québec est inconnue (information du demandeur).

Pronostic et traitement

La plupart des cas d'HAI réagissent bien à un traitement immunosuppresseur. Le traitement doit être initié dès que possible et maintenu suffisamment longtemps pour réduire la probabilité de rechute [Alvarez, 2006]. Dans les cas d'hépatite grave ou de cirrhose, la transplantation hépatique est la seule approche thérapeutique, avec une survie à 5 ans de 80 % [Zhang *et al.*, 2014].

3.3 Nombre de patients visés

Au cours des deux dernières années, le laboratoire de recherche du Dr Alvarez a effectué une moyenne de 402 analyses par année (anti-SLA, anti-LKM1, anti-LC1). Sur cette base, le demandeur estime que de 400 à 600 analyses par année seront effectuées pour un nombre total prévu de 1200 à 1800 analyses au cours des trois prochaines années.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Gastroentérologie, hépatologie, immunologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Les prélèvements sanguins sont effectués dans les centres respectifs avec tube pour sérum (sans anticoagulant). Les échantillons sont centrifugés et décantés et le sérum est acheminé au CHU Sainte-Justine selon les recommandations standard. L'analyse sera réalisée au laboratoire de virologie-sérologie.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

L'analyse du profil sérologique de l'hépatite auto-immune remplace l'analyse anti-LKM (*anti-liver-kidney microsomes*) actuellement disponible dans le *Répertoire* (code 20699; VP : 12,8). L'analyse anti-LKM est réalisée au CHUM par la technique ELISA.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Historiquement, la biopsie hépatique a été l'étalon-or pour le diagnostic des différentes maladies hépatiques auto-immunes. Elle permettait d'obtenir des informations sur l'étiologie, le degré d'inflammation et le stade de fibrose [Grunwald *et al.*, 2014]. La biopsie hépatique est une procédure invasive à risque d'erreurs d'échantillonnage et de variations

d'interprétation. Les tests non invasifs actuellement disponibles (détection de marqueurs sériques, techniques d'imagerie) permettent de compléter les informations issues de la biopsie [Grunwald *et al.*, 2014; Regev *et al.*, 2002].

L'immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupes non préservées de foie, de rein et d'estomac de rat a été longtemps considérée comme l'étalon-or pour la détection de certains autoanticorps associés aux maladies hépatiques auto-immunes (AMA, SMA, ANA, anti-LKM1, anti-LC1) [Vergani *et al.*, 2004]. Cependant, cette technique est longue à réaliser, est observateur-dépendante et les résultats sont parfois difficiles à interpréter. Les méthodes ELISA et immunoblot (de type lineblot) actuellement disponibles sont en mesure de surmonter les limitations de l'IFI et sont plus rapides [Villalta *et al.*, 2014b].

Actuellement, au Québec, les analyses des anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP sont faites, par ELISA, au CHUM (anti-LKM) et au laboratoire de recherche du centre demandeur. Ces trois analyses pourront être réalisées avec la trousse EUROLINE. Les résultats des six autres autoanticorps associés à la CBP [AMA-M2, anti-M2-3E (BPO), anti-Sp100, anti-PML, anti-gp210, anti-Ro52] générés avec la trousse EUROLINE ne seront pas fournis par le centre demandeur⁴⁸. Ainsi, les données probantes s'y rattachant ne sont pas décrites dans le présent avis d'évaluation.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le temps d'exécution de l'analyse par lineblot est plus court que par ELISA (36 et 50 minutes respectivement). La technique lineblot permet de réaliser les analyses dans un délai maximal de 14 jours, selon le volume d'échantillons reçus comparativement à l'ELISA qui est réalisée une fois par mois lorsqu'un nombre suffisant d'échantillons sont accumulés afin de minimiser les pertes. Selon le demandeur, un diagnostic rapide permettant de débiter le traitement est un enjeu important.

Selon le demandeur, le diagnostic de l'HAI ne peut pas se faire uniquement à l'aide de la biopsie hépatique, contrairement à la CBP ou à la CSP. L'avantage de la sérologie est donc supérieur pour les cas d'HAI. L'utilisation de la trousse EUROLINE permettra de détecter simultanément les trois autoanticorps (anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP) actuellement mesurés séparément par ELISA, dans les mêmes conditions et à un moindre coût.

4.4 Coût de la technologie et des options

L'appareil EUROBlotMaster requis pour l'incubation des bandelettes devra être acquis au coût approximatif de 20 000 \$. Cet appareil pourra également être utilisé pour réaliser d'autres sérologies virales. Le logiciel EUROLineScan permettant l'interprétation des analyses est inclus avec l'appareil⁴⁹.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Le profil sérologique par lineblot inclut l'analyse anti-LKM déjà inscrite au *Répertoire* et permet l'analyse d'autres autoanticorps (entre autres, anti-SLA/LP⁵⁰ et anti-LC1).

⁴⁸ Information du demandeur (Dr. Christian Renaud, CHU Ste-Justine), communication électronique du 12 janvier 2015.

⁴⁹ Information du demandeur (Dr. Christian Renaud, CHU Ste-Justine), communication électronique du 9 décembre 2014.

⁵⁰ Anti-SLA/LP : *anti-soluble liver antigen/liver-pancreas antibody*.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Selon l'AASLD⁵¹, le profil d'autoanticorps associés aux maladies hépatiques auto-immunes devrait être évalué chez tous les patients présentant des fonctions hépatiques anormales ou une maladie hépatique d'étiologie inconnue [Manns *et al.*, 2010; Mieli-Vergani et Vergani, 2004]. Dans ces situations, un diagnostic précoce permet d'initier rapidement le traitement approprié et de prévenir la progression vers un stade avancé de la maladie hépatique.

Les autoanticorps détectés ne sont toutefois pas spécifiques des maladies hépatiques auto-immunes, dont l'HAI, et leur expression peut varier au cours de la maladie [Heneghan, 2013; Manns *et al.*, 2010; Bogdanos *et al.*, 2008]. Un résultat négatif ou un faible titre en autoanticorps n'exclut pas un diagnostic de maladie hépatique auto-immune, de même qu'un titre élevé (en l'absence d'autres observations) ne confirme pas nécessairement le diagnostic et ne constitue pas un indicateur pronostique fiable [Liberal *et al.*, 2013; Bogdanos *et al.*, 2008; Czaja, 1999].

Parmi les neuf autoanticorps détectés à l'aide de la trousse EUROLINE, seuls les anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP sont associés à l'HAI. Les autoanticorps reconnaissant les antigènes AMA-M2, M2-3E, Sp100, PML et gp210 sont associés à la CBP, tandis que les anti-Ro-52 sont associés aux maladies auto-immunes rhumatismales et à l'HAI. Les valeurs diagnostique et pronostique des trois autoanticorps principalement associés à l'HAI sont résumées au tableau 1.

Tableau 1 Valeurs diagnostique et pronostique des autoanticorps associés à l'HAI

AUTOANTICORPS	MALADIES HÉPATIQUES CONCERNÉES	VALEUR DIAGNOSTIQUE POUR L'HAI	VALEUR PRONOSTIQUE POUR L'HAI	RÉFÉRENCES
Anti- SLA/LP	HAI Hépatite C chronique	Diagnostic HAI Présent lorsque les autres marqueurs sont absents	Pronostic de maladie sévère et tendance à une rechute après cessation du traitement, indication de transplantation	Liberal <i>et al.</i> , 2013; Vitozzi <i>et al.</i> , 2002; Kanzler <i>et al.</i> , 1999
Anti-LKM1	HAI type 2 Hépatite C chronique	Diagnostic HAI type 2	Associé à un plus jeune âge Plus fréquemment associé avec une insuffisance hépatique fulminante et une déficience partielle en IgA	Liberal <i>et al.</i> , 2013
Anti-LC1	HAI type 2 Hépatite C chronique	Diagnostic HAI type 2	Pronostic de maladie grave (histologiquement) et progression rapide vers la cirrhose	Liberal <i>et al.</i> , 2013

Abréviations: HAI : hépatite auto-immune; AMA : anti-mitochondrial antibody; ANA : anti-nuclear antibody; anti-LC1 : anti-liver cytosol type 1; anti-LKM1 : anti-liver-kidney-microsomal type 1; anti-SLA/LP : anti-soluble liver antigen/liver-pancreas antibody; CSA : cholangite auto-immune sclérosante; IgA : immunoglobuline de classe A; NAFLD : stéatose hépatique non alcoolique (en anglais : non-alcoholic fatty liver disease); CBP : cirrhose biliaire primitive; CSP : cholangite sclérosante primitive; SMA : anticorps anti-muscle lisse (en anglais : anti-smooth muscle antibody)

⁵¹ AASLD : American Association for the Study of Liver Diseases.

Anti-SLA/LP

Une étude de cohorte a démontré que les autoanticorps anti-SLA/LP sont hautement spécifiques de l'HAI et particulièrement utiles pour le diagnostic des patients qui sont séronégatifs pour les autoanticorps courants [Kanzler *et al.*, 1999], spécifiquement pour les patients ANA/SMA négatifs [Vitozzi *et al.*, 2002]. Bien que la présence d'anti-SLA/LP soit associée à une hépatite plus sévère et un pronostic défavorable [Liberal *et al.*, 2013; Vitozzi *et al.*, 2002], la survie à 10 ans chez les patients avec ou sans anti-SLA/LP n'est pas significativement différente ($p > 0,05$) [Zachou *et al.*, 2015]. La durée moyenne de la maladie était de 58 mois chez les patients anti-SLA/LP positifs (IC à 95 % : 40,7 - 75) comparativement à 96 mois chez les patients anti-SLA/LP négatifs (IC à 95 % : 75 - 118).

Anti-LKM1 et anti-LC1

La séropositivité anti-LKM1 ou anti-LC1 est fortement associée au diagnostic d'HAI de type 2. On retrouve des autoanticorps anti-LKM1 chez de 3 % à 4 % des patients atteints d'HAI [Alvarez *et al.*, 1999] mais chez 38,5 % des patients atteints d'HAI de type 2 (principalement pédiatriques) [Gregorio *et al.*, 1997]. Une étude récente a par ailleurs démontré que les autoanticorps anti-LC1 étaient présents chez 59 % des patients pédiatriques atteints d'HAI de type 2 et que dans 35,9 % des cas, il s'agissait de l'unique autoanticorps détecté [Villalta *et al.*, 2014a].

La détection des autoanticorps anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP par lineblot permet de confirmer une suspicion d'HAI. Selon le demandeur, la sérologie par lineblot serait également utile pour repérer l'HAI dans les cas suivants :

- hépatites (aiguës ou chroniques) de cause non expliquée au bilan initial;
- hépatite C chronique avec réponse inattendue au traitement⁵²;
- rejet chronique post-transplantation hépatique avec détérioration de l'état général du patient et de son bilan hépatique.

Hépatite C chronique

Les anti-LKM1 caractéristiques de l'HAI de type 2 ont également été détectés chez environ 10 % des patients atteints d'hépatite C chronique [Kerkar *et al.*, 2003]. Une étude sur 100 sérums de patients atteints d'hépatite C chronique (58 HCV+/LKM1+ et 42 HCV+/LKM1-) avait pour objectif de caractériser le type d'autoanticorps présents [Vitozzi *et al.*, 2004]. Les autoanticorps anti-SLA ont été détectés chez 15 des 58 patients (26 %) HCV+/LKM1+ et chez 5 des 42 patients (12 %) HCV+/LKM1- ($P = 0,04$).

HAI post-transplantation hépatique

Après une transplantation hépatique, le mauvais fonctionnement du greffon est généralement attribué au rejet ou à une infection virale, mais aussi à l'HAI [Chen *et al.*, 2013]. L'HAI est considérée comme une cause d'anomalie fonctionnelle du greffon chez les patients greffés en raison d'une HAI (HAI dite récurrente) ou d'une maladie hépatique non auto-immune (HAI dite *de novo*) [Czaja, 2012]. Dans une étude transversale, la production d'autoanticorps a été mesurée chez 68 des 94 enfants atteints d'HAI *de novo* suite à une transplantation hépatique [Chen *et al.*, 2013]. Des autoanticorps étaient détectables dans 75,0 % des cas (51/68), incluant 14 double positifs : ANA (30/68; 44,1 %), SMA (32/68; 47,1 %), AMA (3/68; 4,4 %), anti-LKM (0 %).

⁵² Les infections virales telles que l'hépatite A, B ou C constituent un risque accru de développer l'HAI et la production d'autoanticorps chez certains patients (information transmise par le Dr. Christian Renaud (CHU Ste-Justine), communication téléphonique du 12 janvier 2015).

5.1.3 Valeur thérapeutique

Le diagnostic doit être réalisé rapidement (maximum de 3 à 4 jours) afin d'initier le traitement le plus tôt possible. Le traitement de l'HAI à l'aide d'immunosuppresseurs à forte dose, identique au traitement utilisé pour les greffés, représente un risque élevé pour le patient et s'accompagne de nombreux effets secondaires. Ainsi, la détection des autoanticorps permet de réserver ce traitement agressif aux patients atteints d'HAI⁵³.

⁵³ Information transmise par le Dr. Fernando Alvarez (hépatologue au CHU Ste-Justine), communication téléphonique du 3 décembre 2014.

5.2 Validité clinique

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

Les résultats présentés dans cette section reflètent la performance de détection des antigènes par les autoanticorps présents dans les échantillons de patients atteints d'HAI ou d'autres maladies hépatiques auto-immunes par la technique lineblot ou par ELISA (technique similaire au lineblot).

Les résultats de validité clinique disponibles dans les monographies de deux versions de la trousse EUROLINE (à 8 antigènes⁵⁴ et à 9 antigènes⁵⁵) sont présentés au tableau 2. Le diagnostic des patients inclus dans ces études est confirmé, mais on ne mentionne pas comment il a été déterminé. Les résultats de validité clinique en termes de fréquence de détection des antigènes LKM-1, LC-1 et SLA/LP par les autoanticorps sont similaires pour les deux trousse. Les résultats pour la détection des autres antigènes de la trousse ne sont pas présentés, car les informations disponibles dans les monographies sont incomplètes.

Tableau 2 Fréquence de détection de certains antigènes par lineblot et ELISA dans les cas d'hépatite auto-immune

ANTIGÈNES	ÉTUDE	MÉTHODE	NOMBRE DE CAS	FRÉQUENCE DE DÉTECTION (POSITIFS)		FRÉQUENCE DE NÉGATIFS	
				NOMBRE	%	NOMBRE	%
LKM-1	Monographie EUROLINE 8 Ag	Lineblot	163 HAI* 571 témoins*	20/163	12,3§	570/571	99,8§
	Monographie EUROLINE 9 Ag	Lineblot	454 HAI 192 témoins†	n.d.	n.d.	187/192	97,4
	Villalta <i>et al.</i> , 2014a	Lineblot	116 HAI‡ 131 témoins‡	n.d.	n.d.	n.d.	98,5
LC-1	Monographie EUROLINE 8 Ag	Lineblot	163 HAI 571 témoins*	15/163	9,2§	569/571	99,6§
	Monographie	Lineblot	454 HAI	n.d.	n.d.	192/192	100

⁵⁴ Monographie de la trousse EUROLINE – Profile Autoimmune Liver Diseases (IgG) (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG, Lübeck, Allemagne), n° cat DL 1300-1601-8G, avril 2013. Document non publié, disponible en contactant la compagnie EUROIMMUN à l'adresse d.ma@euroimmun.ca.

⁵⁵ Monographie de la trousse EUROLINE - Autoimmune Liver Diseases (IgG) (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG, Lübeck, Allemagne), n° cat DL 1300-1601-4G, mars 2014. Document non publié, disponible en contactant la compagnie EUROIMMUN à l'adresse d.ma@euroimmun.ca.

ANTIGÈNES	ÉTUDE	MÉTHODE	NOMBRE DE CAS	FRÉQUENCE DE DÉTECTION (POSITIFS)		FRÉQUENCE DE NÉGATIFS	
				NOMBRE	%	NOMBRE	%
	EUROLINE 9 Ag		192 témoins†				
	Villalta <i>et al.</i> , 2014a	Lineblot	116 HAI‡ 131 témoins‡	n.d.	n.d.	n.d.	99,3
SLA/LP	Monographie EUROLINE 8 Ag	Lineblot	163 HAI 571 témoins*	15/163	9,2§	564/571	98,8§
	Villalta <i>et al.</i> , 2014a]	Lineblot	116 HAI‡ 131 témoins‡	n.d.	n.d.	n.d.	100
	[Baeres <i>et al.</i> , 2002¶	ELISA	454 HAI 1026 témoins	59/454	13,0	1026/1026	100
	Zhang <i>et al.</i> , 2014 <i>Méta-analyse</i>	ELISA et RLA	16 études (12 immunoblot, 3 ELISA, 1 RLA)	n.d.	32,3	n.d.	98,4

Abréviations : Ag : antigène; CBP : cirrhose biliaire primitive; ELISA : enzyme linked immunoassay; HAI : hépatite autoimmune; LC-1 : liver cytosol type 1; LKM-1 : liver/kidney microsome type 1; n.d. : non déterminé; RLA : test par radioligand (en anglais : radioligand assay); SLA/LP : soluble liver antigen/liver pancreas.

* Parmi les 163 cas d'HAI, 142 sont de type 1 et 21 sont de type 2. Les témoins incluent 264 patients atteints d'autres maladies hépatiques (CBP : 205; hépatite virale : 39; cholangite sclérosante primitive : 19) et 308 patients atteints d'autres maladies (lupus érythémateux systémique, syndrome de Sjögren; sclérose systémique, myosite, etc.).

† Les témoins incluent 26 patients atteints de CBP, 109 atteints d'autres maladies hépatiques (cholangite sclérosante : 4; hépatite B : 37; hépatite C : 30; lésion hépatique toxique : 38) et 57 donneurs de sang en santé.

‡ Parmi les patients atteints d'HAI, on compte 63 enfants et 53 adultes. Parmi les témoins, 53 sont atteints de CBP; 11 de cholangite sclérosante primitive et 67 de maladies hépatiques non autoimmunes (stéatose : 39; hépatite alcoolique : 11; lésion hépatique toxique non alcoolique : 8; cirrhose cryptogénique : 9).

§ La sensibilité pour les types 1 et 2, respectivement, est de 1,4 % et de 85,7 % pour LKM-1; de 0,7 % et de 66,7 % pour LC-1; de 10,6 % et de 0 % pour SLA/LP.

|| Les témoins incluent des patients atteints de maladies hépatiques et non hépatiques variées.

¶ Les 454 échantillons de patients atteints d'HAI présentés dans l'étude de Baeres *et al.* sont aussi présentés dans la monographie EUROLINE 9 Ag.

Parmi les études répertoriées qui portent sur les maladies hépatiques auto-immunes, quatre utilisaient la technique lineblot à l'aide de trousse de la compagnie EUROIMMUN [Villalta *et al.*, 2014a; Villalta *et al.*, 2014b; Saito *et al.*, 2012; Stinton *et al.*, 2011] et deux la technique ELISA (technique similaire au lineblot) [Zhang *et al.*, 2014; Baeres *et al.*, 2002] pour la détection des autoanticorps. Des quatre études utilisant le lineblot, seule une des deux études de Villalta et ses collaborateurs portait spécifiquement sur l'HAI [Villalta *et al.*, 2014a].

Détection par lineblot

L'étude de Villalta portant sur l'HAI avait pour objectif d'évaluer le profil d'autoanticorps associés à l'HAI dans une cohorte de 63 patients pédiatriques et 53 adultes atteints d'HAI [Villalta *et al.*, 2014a]. La spécificité des anticorps pour diagnostiquer l'HAI est très élevée, telle que démontrée par la fréquence des résultats négatifs chez le groupe témoin (131 sérums de patients atteints de maladies hépatiques autres que l'HAI) : anti-LKM1 (98,5 %), anti-LC1 (99,3 %), anti-SLA/LP (100 %) (voir le tableau 2). Selon les auteurs, les

résultats confirment l'utilité d'une méthode analytique en complément à l'IFI afin de détecter les anti-LC1 masqués en présence d'anti-LKM1. Par ailleurs, les résultats obtenus sont similaires à ceux de la monographie de la trousse EUROLINE.

Détection par ELISA

Les deux études répertoriées utilisant la technique ELISA (technique similaire au lineblot) permettaient d'évaluer la performance de détection de certains autoanticorps associés à l'HAI, dont les anti-SLA/LP (voir le tableau 2).

Une étude de développement d'un test ELISA anti-SLA/LP a été réalisée sur 454 sérums provenant de 419 patients atteints d'HAI et 1026 échantillons de patients atteints de diverses maladies hépatiques et non hépatiques [Baeres *et al.*, 2002]. Ce test ELISA permet d'obtenir une fréquence de détection et une fréquence de négatifs détectés similaires à celles de la trousse EUROLINE. Il est à noter que les résultats de cette étude sont présentés dans la monographie EUROLINE 9 Ag, bien que la détection des anti-SLA/LP n'ait pas été réalisée par lineblot.

Une méta-analyse récente avait pour but de déterminer si les ANA, SMA et anti-SLA/LP permettaient de diagnostiquer adéquatement les patients atteints d'HAI [Zhang *et al.*, 2014]. En ce qui a trait à la détection des anti-SLA/LP, des 16 études incluses dans cette méta-analyse, 12 (75 %) utilisaient un test immunoblot (aussi appelée *Western blot*), 3 (18,75 %) utilisaient l'ELISA (méthode similaire au lineblot) et 1 (6,25 %) utilisait un test par radioligand. Les résultats combinés des 4 études utilisant une méthode similaire au lineblot (ELISA et test par radioligand) révèlent une fréquence de détection de 32,3 % (IC à 95 % : 26,6-38,4 %) et une fréquence des vrais négatifs détectés de 98,4 % (IC à 95 % : 97,3-99,1 %). Comparativement à la trousse EUROLINE, la fréquence de détection des anti-SLA/LP par ELISA et par radioligand (résultats combinés) est supérieure et la fréquence des vrais négatifs détectés est similaire.

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	

Les données de validité analytique proviennent du document d'homologation de la FDA pour la trousse EUROLINE à 8 antigènes, sauf pour les données locales du centre demandeur qui ont été obtenues à l'aide de la trousse à 9 antigènes disponible au Canada. Les données de répétabilité du document d'homologation de la FDA ne sont pas présentées dans ce rapport puisqu'elles concernent l'évaluation visuelle des bandelettes. Les données de reproductibilité ont été présentées pour l'évaluation visuelle et automatisée des

bandelettes. Toutefois, seules les données de l'évaluation automatisée (telle que réalisée par le centre demandeur) sont décrites ci-dessous.

Reproductibilité

Des bandelettes ont été incubées avec 16 échantillons de sérum générant un signal positif ou proche du seuil de positivité pour les différents anticorps, puis numérisées. Chaque bandelette a été numérisée 10 fois avec 3 numériseurs différents. Les valeurs d'intensité des bandes correspondant aux différents antigènes pour les 30 analyses ont été utilisées pour calculer les coefficients de variation à l'aide du logiciel EUROLInScan (voir le tableau 3)⁵⁶.

Tableau 3 Reproductibilité de l'analyse automatisée des bandelettes (trousse à 8 antigènes)

ANTIGÈNE	ÉCHANTILLONS POSITIFS (30 ANALYSES)			ÉCHANTILLONS PROCHES DU SEUIL DE POSITIVITÉ (30 ANALYSES)		
	INTENSITÉ MOYENNE	ÉCART- TYPE	CV (%)	INTENSITÉ MOYENNE	ÉCART-TYPE	CV (%)
LKM-1	73	0,6	0,8	14	0,5	3,9
LC-1	ND	ND	ND	12	0,2	1,5
SLA/LP	39	0,4	0,9	14	0,7	4,9

ND : non disponible

Spécificité analytique

La spécificité analytique⁵⁷ (réaction croisée) a été évaluée sur 286 échantillons, dont 47 séropositifs pour les anticorps dirigés contre les antigènes suivants : cytoplasme de granulocytes (n = 10), glande thyroïde (n = 10), cellules pancréatiques (n = 10), cardiolipide/phospholipide (n = 5), panel de référence ANA de *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC)⁵⁸ (n = 12), et 239 échantillons cliniques : hépatite auto-immune de type 1 (n = 84), cholangite sclérosante primaire (n = 19), lupus érythémateux systémique (n = 10), arthrite rhumatoïde (n = 50), maladie céliaque (n = 7), stéatohépatite alcoolique (n = 30), hépatite virale B et C (n = 39). Neuf des 286 échantillons (3,1 %) ont testé positifs avec la trousse EUROLIn. La nature de ces échantillons positifs n'est cependant pas mentionnée dans le document de la FDA.

Effet de matrice

L'effet de substances interférentes endogènes sur l'analyse de chaque antigène présent sur les bandelettes de la trousse EUROLIn a été évalué à l'aide de cinq échantillons couvrant l'étendue des résultats possibles (négatifs, positifs, proches du seuil de positivité). Chaque échantillon a été fortifié (« spiké ») avec trois niveaux de substances interférentes

⁵⁶ Source : homologation FDA (k113439), 510(k) Substantial equivalence determination: Decision summary [12 avril 2013]. Disponible à : <http://www.accessdata.fda.gov/SCRIPTS/cdrh/devicesatfda/index.cfm?db=pmn&id=K113439>.

⁵⁷ Source : trousse à 8 antigènes, homologation FDA (k113439), 510 (k) Substantial equivalence determination: Decision summary [12 avril 2013]. Disponible à : <http://www.accessdata.fda.gov/SCRIPTS/cdrh/devicesatfda/index.cfm?db=pmn&id=K113439>.

⁵⁸ Information tirée du site Web de l'*Autoantibody Standardization Committee in Rheumatic and Related Disorders* du CDC. Disponible à : <http://asc.dental.ufl.edu/ReferenceSera.html> (consulté le 23 décembre 2014).

endogènes (hémoglobine, triglycérides, bilirubine). L'analyse visuelle des bandelettes n'a révélé aucune interférence jusqu'à 5 mg/mL d'hémoglobine, 20 mg/mL de triglycérides et 0,4 mg/mL de bilirubine⁵⁹.

Données locales de validation analytique

Les techniques lineblot (trousse EUROLINE à 9 antigènes) et ELISA (réalisées dans un laboratoire de recherche du centre demandeur) ont été comparées relativement à la détection des autoanticorps associés à l'HAI (anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP) dans 82 échantillons de sérum. Les échantillons analysés étaient identifiés comme suit : HAI type 2 (LKM1+ et/ou LC1+) (n = 22), HAI type 1 (LKM1-, LC1-, SLA+/-) (n = 11), greffe hépatique (témoins négatifs) (n = 22), 26 sérums avec demande d'analyse des autoanticorps, un sérum normal. La concordance de la trousse EUROLINE avec la technique ELISA a été de 94 % pour l'anti-LKM, de 91 % pour l'anti-LC1 et de 75 % pour l'anti-SLA/LP.

La détection des autoanticorps dirigés contre les six autres antigènes (principalement associés à la CBP) présents sur la bandelette de la trousse EUROLINE n'a pas été validée par le centre demandeur, mais pourrait l'être ultérieurement, selon la disponibilité d'échantillons appropriés (associés aux maladies hépatiques auto-immunes retrouvées principalement chez l'adulte)⁶⁰.

Contrôle de qualité de la trousse

Un contrôle positif constitué d'immunoglobulines G (IgG) humaines, permet de révéler la bande contrôle présente sur chaque bandelette lorsque les étapes d'incubation ont été effectuées correctement.

Contrôle qualité externe

Participation prévue au contrôle international de l'IAIHG qui donne accès à des sérums de réactivité non dévoilée pour lesquels la spécificité et le titre en anticorps doivent être déterminés. Participation prévue au contrôle de qualité externe du CAP (*College of American Pathologists*) pour les anti-LKM (*program code LKM*).

5.4 Recommandations d'autres organismes

Les recommandations de l'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) incluent, entre autres, l'utilisation de tests sérologiques pour le diagnostic d'hépatite auto-immune [Manns *et al.*, 2010].

- Le diagnostic de l'HAI devrait être établi en présence de symptômes cliniques ainsi que d'anomalies des résultats de laboratoire (AST et ALT⁶¹ sériques, gammaglobulines et IgG sériques totales) et des résultats sérologiques (ANA, SMA, anti-LKM1 ou anti-LC1) et histologiques (hépatite d'interface⁶²). Les autres conditions pouvant causer une hépatite chronique, incluant les maladies virales, héréditaires, métaboliques, cholestatiques et induites par les médicaments, ont été exclues.

⁵⁹ Source : trousse à 8 antigènes, homologation FDA (k113439), 510 (k) Substantial equivalence determination: Decision summary [12 avril 2013]. Disponible à : <http://www.accessdata.fda.gov/SCRIPTS/cdrh/devicesatfda/index.cfm?db=pmn&id=K113439>.

⁶⁰ Information du demandeur (Dr. Christian Renaud, CHU Ste-Justine), communication électronique du 12 janvier 2015.

⁶¹ AST : aspartate transaminase; ALT : alanine transaminase.

⁶² L'hépatite d'interface, typique de l'HAI, est caractérisée par l'infiltration massive de lymphocytes et de plasmocytes dans le foie au niveau portal, péri-portal ou para-septal [Floreani *et al.*, 2013].

- Les cas plus complexes (résultats peu nombreux ou atypiques) devraient être évalués à l'aide de systèmes de notation diagnostiques (critères de l'IAIHG⁶³).
- Des marqueurs sérologiques supplémentaires incluant au moins l'anti-SLA et pANCA atypique⁶⁴ devraient être testés pour les cas avec suspicion d'HAI dont les résultats pour les autoanticorps conventionnels sont négatifs (algorithme diagnostique, voir l'annexe A).
- Chez les patients atteints d'HAI et d'anomalies endocriniennes multiples, le syndrome APECED⁶⁵ doit être exclu par l'analyse des mutations courantes dans le gène AIRE⁶⁶.

Les recommandations de la British Society of Gastroenterology (BSG) sont basées sur des études observationnelles et des études de cas (niveau de preuve II-3 selon le système GRADE) [Gleeson et Heneghan, 2011]. Elles mentionnent les tests sérologiques en tant que critères de diagnostic de l'HAI et recommandent un traitement de maintien chez les patients anti-LKM ou SLA positifs.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

La trousse commerciale EUROLINE est simple d'utilisation et nécessite peu de ressources matérielles et humaines.

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

Elles n'ont pas été évaluées.

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

Ils n'ont pas été évalués.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La séropositivité anti-LKM1 ou anti-LC1 est fortement associée au diagnostic d'HAI de type 2 (davantage présent chez les enfants), ce dernier étant fréquemment l'unique autoanticorps détecté. Les autoanticorps anti-SLA/LP (associés à une hépatite plus sévère) sont hautement spécifiques de l'HAI et particulièrement utiles pour le diagnostic des patients qui sont séronégatifs pour les autoanticorps courants.

La détection des autoanticorps anti-LKM1, anti-LC1 et anti-SLA/LP par lineblot permet de confirmer une suspicion d'HAI, mais est également utile pour repérer l'HAI dans les cas d'hépatites (aiguës ou chroniques) de cause non expliquée au bilan initial, dans les cas d'hépatite C chronique avec réponse inattendue au traitement et lors de rejet chronique post-transplantation hépatique avec détérioration de l'état général du patient et de son bilan hépatique. Toutefois, aucune preuve n'est disponible pour ces indications.

⁶³ IAIHG : *International autoimmune hepatitis group*.

⁶⁴ Anti-SLA : *anti-soluble liver antigen*; pANCA atypique : *atypical peripheral anti-neutrophilic cytoplasm*.

⁶⁵ APECED : *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*.

⁶⁶ AIRE : *autoimmune regulator*.

7.2 Validité clinique

La seule étude qui utilisait la technique lineblot à l'aide d'une trousse de la compagnie EUROIMMUN pour la détection des autoanticorps a révélé une fréquence de négatifs détectés très élevée des autoanticorps associés à l'HAI : anti-LKM1 (98,5 %), anti-LC1 (99,3 %), anti-SLA/LP (100 %). Les résultats obtenus sont similaires à ceux de la monographie de la trousse EUROLINE.

Deux études répertoriées utilisaient la technique ELISA (technique similaire au lineblot) pour la détection des anti-SLA/LP. La fréquence de détection est supérieure à la trousse EUROLINE dans l'étude de Zhang et ses collaborateurs [2014] et la fréquence de négatifs détectés est très élevée et similaire à la trousse EUROLINE pour les deux études.

Il faut souligner que la trousse proposée par le demandeur inclut neuf antigènes mais que seulement trois seront utilisés pour le diagnostic de l'HAI.

7.3 Validité analytique

Pour la trousse à huit antigènes, la reproductibilité (% CV) de l'analyse automatisée des bandelettes est supérieure pour les échantillons positifs (anti-LKM1 : 0,8 %, anti-LC1 : ND⁶⁷, anti-SLA/LP : 0,9 %) comparativement aux échantillons proches du seuil positif (anti-LKM1 : 3,9 %, anti-LC1 : 1,5 %, anti-SLA/LP : 4,9 %). La spécificité analytique de la trousse est de 96,9 %. Aucun effet de matrice n'a été observé. Les données locales de validation analytique ont été obtenues par comparaison de la trousse EUROLINE (9 antigènes) avec la technique ELISA réalisée dans le laboratoire de recherche du centre demandeur. La concordance est de 94 % pour l'anti-LKM, de 91 % pour l'anti-LC1 et de 75 % pour l'anti-SLA.

7.4 Recommandations d'autres organismes

L'AASLD recommande l'utilisation de tests sérologiques pour appuyer le diagnostic de l'hépatite auto-immune. La détection des autoanticorps conventionnels (ANA, SMA, anti-LKM1, anti-LC1) devrait être réalisée en complément à l'évaluation clinique du patient, des résultats d'analyses biochimiques et de l'histologie du tissu hépatique.

La BSG recommande l'utilisation des critères révisés de l'IAIHG pour guider le diagnostic des cas atypiques d'HAI. L'utilisation du profil sérologique pour le diagnostic de l'HAI n'est pas incluse dans les recommandations de la BSG, mais on recommande un traitement de maintien pour les patients anti-LKM ou SLA positifs.

⁶⁷ ND : non déterminé.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Profil sérologique de l'hépatite auto-immune par lineblot

Statut de la technologie diagnostique

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

Recommandation de l'INESSS

- ☒ Avis de recommandation d'introduction (voir Note)
- ☐ Avis de refus d'introduction
- ☐ Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle

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

NOTE

Il y a un intérêt à étendre l'offre de cette analyse à la population adulte, surtout que la trousse utilisée par le demandeur mesure neuf anticorps, dont trois sont indiqués pour le diagnostic de l'hépatite auto-immune et les six autres seraient utiles au diagnostic d'autres maladies hépatiques auto-immunes présentes surtout chez l'adulte.

RÉFÉRENCES

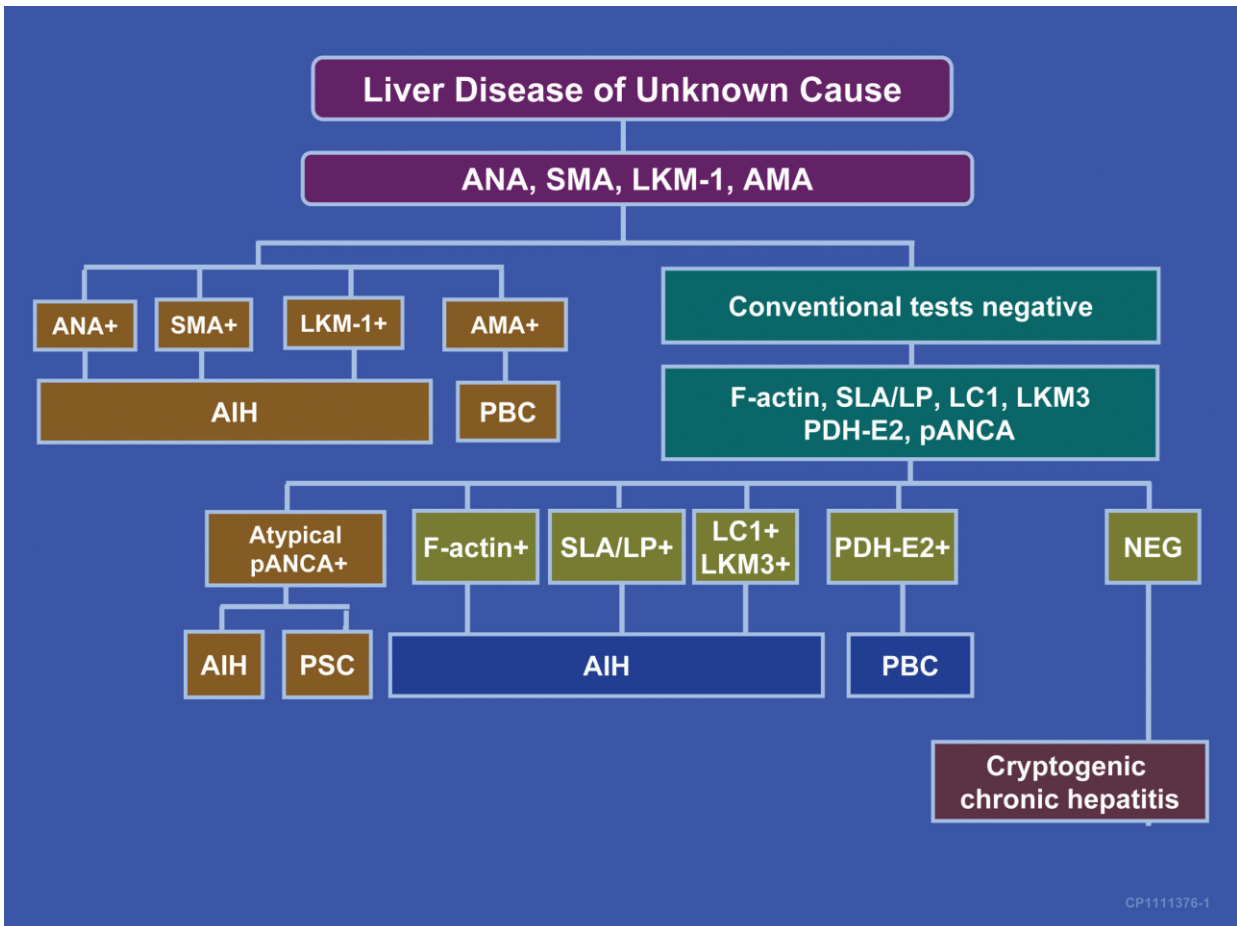
- Achenza MI, Meda F, Brunetta E, Selmi C. Serum autoantibodies for the diagnosis and management of autoimmune liver diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;6(6):717-29.
- Alvarez F. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Liver Dis* 2006;10(1):89-107, vi.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31(5):929-38.
- Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, Wies I, Kanzler S, Cancado EL, et al. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: Specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 2002;51(2):259-64.
- Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008;14(21):3374-87.
- Castiella A, Zapata E, Lucena MI, Andrade RJ. Drug-induced autoimmune liver disease: A diagnostic dilemma of an increasingly reported disease. *World J Hepatol* 2014;6(4):160-8.
- Chen CY, Ho MC, Wu JF, Jeng YM, Chen HL, Chang MH, et al. Development of autoantibodies after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant* 2013;17(2):144-8.
- Czaja AJ. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2012;57(9):2248-66.
- Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;30(3):394-401.
- Fiel MI et Schiano TD. Plasma cell hepatitis (de-novo autoimmune hepatitis) developing post liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17(3):287-92.
- Floreani A, Liberal R, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis: Contrasts and comparisons in children and adults—A comprehensive review. *J Autoimmun* 2013;46:7-16.
- Gleeson D et Heneghan MA. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut* 2011;60(12):1611-29.
- Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: A 20-year experience. *Hepatology* 1997;25(3):541-7.
- Grunwald D, Kothari D, Malik R. Noninvasive markers in the assessment and management of autoimmune liver diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014;26(10):1065-72.

- Heneghan MA. Serologic markers of autoimmune hepatitis. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2013. Disponible à : <http://www.uptodate.com/contents/serologic-markers-of-autoimmune-hepatitis>.
- Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48(1):169-76.
- Kanzler S, Weidemann C, Gerken G, Lohr HF, Galle PR, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31(4):635-40.
- Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): A new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003;170(3):1481-9.
- Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2013;46:17-24.
- Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009;50(1):291-308.
- Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51(6):2193-213.
- Mieli-Vergani G et Vergani D. De novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *J Hepatol* 2004;40(1):3-7.
- Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97(10):2614-8.
- Saito H, Takahashi A, Abe K, Okai K, Katsushima F, Monoe K, et al. Autoantibodies by line immunoassay in patients with primary biliary cirrhosis. *Fukushima J Med Sci* 2012;58(2):107-16.
- Stinton LM, Swain M, Myers RP, Shaheen AA, Fritzler MJ. Autoantibodies to GW bodies and other autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2011;163(2):147-56.
- Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk TV, O'Hara SP, LaRusso NF. Physiology of cholangiocytes. *Compr Physiol* 2013;3(1):541-65.
- Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, et al. Liver autoimmune serology: A consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004;41(4):677-83.
- Villalta D, Girolami E, Alessio MG, Sorrentino MC, Tampoia M, Brusca I, et al. Autoantibody profiling in a cohort of pediatric and adult patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Lab Anal* 2014a [Epub ahead of print].

- Villalta D, Sorrentino MC, Girolami E, Tampoia M, Alessio MG, Brusca I, et al. Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplexed line-blot assay. *Clin Chim Acta* 2014b;438C:135-8.
- Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Marceau G, Beland K, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity* 2004;37(3):217-22.
- Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002;35(8):485-92.
- Zachou K, Gampeta S, Gatselis NK, Oikonomou K, Goulis J, Manoussakis MN, et al. Anti-SLA/LP alone or in combination with anti-Ro52 and fine specificity of anti-Ro52 antibodies in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2015;35(2):660-72.
- Zhang WC, Zhao FR, Chen J, Chen WX. Meta-analysis: diagnostic accuracy of antinuclear antibodies, smooth muscle antibodies and antibodies to a soluble liver antigen/liver pancreas in autoimmune hepatitis. *PLoS One* 2014;9(3):e92267.

ANNEXE A

Algorithme d'utilisation des autoanticorps dans le diagnostic de l'hépatite auto-immune [Manns *et al.*, 2010]



ANNEXE B

Critères diagnostiques simplifiés pour l'hépatite auto-immune [Hennes *et al.*, 2008]

VARIABLE	POINTS
Titre ANA ou SMA $\geq 1:40$	1
Titre ANA $\geq 1:80$, SMA $\geq 1:80$, anti-LKM $\geq 1:40$ ou SLA positif*	2
IgG > VNS**	1
IgG > 1,10 VNS (> 10 % au-dessus VNS)	2
Histologie du foie : atypique, compatible ou typique de l'HAI	0, 1 ou 2
Absence d'hépatite virale	2

* Maximum 2 points si les deux résultats sont atteints

** VNS : valeur normale supérieure

Pointage total : ≥ 6 = HAI probable, ≥ 7 HAI confirmée

DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-ADAMTS-13 (RÉFÉRENCE - 2014.03.11)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission des demandes d'examen au MSSS** : 30 septembre 2014
- 1.3 **Date de réception des demandes à l'INESSS** : 1^{er} novembre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

Mise en garde

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

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Détection des anticorps anti-ADAMTS-13 (en routine et en STAT⁶⁸) par méthode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

La méthode ELISA est utilisée pour la détection des anticorps non neutralisants dirigés contre ADAMTS-13 chez des patients avec un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) acquis et une activité d'ADAMTS-13 effondrée (< 10 % de la normale). Le demandeur utilise un protocole « maison » comprenant les étapes suivantes :

- dépôt d'ADAMTS-13 recombinant dans une plaque en polystyrène à 96 puits;
- détection des anticorps dirigés contre ADAMTS-13 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.

Selon l'information fournie par le requérant, le temps de réponse (phase analytique) attendu est de 14 jours (en routine) et de 24 heures (en STAT).

⁶⁸ 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 les indiquer sur les requêtes : l'urgence médicale (STAT) sera faite et communiquée immédiatement, alors que le prélèvement STAT sera fait immédiatement, mais son analyse n'est pas urgente.

2.3 Société ou développeur

Analyse « maison ». Selon l'information fournie par le demandeur, cette analyse a été testée dans leur laboratoire clinique sur des sujets non atteints et des patients atteints de PTT.

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Des trousse commerciales sont disponibles, mais ne sont pas homologuées par Santé Canada : TECHNOZYM[®] ADAMTS-13 INH par méthode ELISA (Technoclone, Vienne, Autriche) et IMUBIND[®] ADAMTS13 Autoantibody ELISA (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, É.-U.). Le demandeur n'aura pas recours à ces trousse.

Valeur pondérée : 53,03 unités (en routine) et 389,78 unités (en STAT).

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

3.1 Patients ciblés

Patients avec des signes cliniques évocateurs de microangiopathie thrombotique et une activité ADAMTS-13 effondrée (< 10 % de la normale).

3.2 Description de la maladie visée

Le PTT est une maladie rare dont l'incidence est de 4 cas par million d'habitants par année qui cible l'adulte jeune, à prédominance féminine, et évolue par poussées entrecoupées de périodes de rémission [Veyradier *et al.*, 2011]. Le PTT fait partie du syndrome de microangiopathie thrombotique⁶⁹ et associe cliniquement une anémie hémolytique mécanique⁷⁰, une thrombopénie périphérique et une atteinte multiviscérale sous forme d'ischémie, notamment aux niveaux rénale et cérébrale [Coppo, 2011; Veyradier *et al.*, 2011]. Devant un tableau clinique peu spécifique, le diagnostic précoce du PTT est difficile à obtenir et, en absence de traitement, le pronostic est grave [Coppo, 2011; Veyradier *et al.*, 2011] avec un taux de mortalité de 85 % à 100 % [Veyradi *et al.*, 2011; Just, 2010].

Dans 90 % des cas, un déficit sévère de l'activité d'ADAMTS-13 (< 10 %) est responsable du PTT. La protéine ADAMTS-13⁷¹ est une métalloprotéase dont le rôle est de limiter la formation d'un agrégat plaquettaire lors d'une brèche vasculaire en procédant au clivage spécifique des multimères de haut poids moléculaire du facteur von Willebrand⁷². Le déficit sévère de l'activité d'ADAMTS-13 est relié dans moins de 5 % des cas à une mutation du gène d'ADAMTS-13 (forme héréditaire) et dans plus de 95 % des cas à la présence d'autoanticorps dirigés contre ADAMTS-13 (forme acquise) fréquente chez les adultes. Ces anticorps sont fréquemment de type IgG avec un effet inhibiteur sur ADAMTS-13 [Coppo, 2011], soit par action inhibitrice directe du site catalytique d'ADAMTS-13 (anticorps

⁶⁹ Syndrome causé par la présence de microthrombus obstruant la microcirculation.

⁷⁰ Présence de schizocytes (globules rouges fragmentés) visibles sur frottis de sang périphérique.

⁷¹ ADAMTS-13 : 13^e protéine de la famille ADAMTS (A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin-1 repeats).

⁷² Le facteur de von Willebrand (FvW) est une glycoprotéine circulant sous forme de multimères, synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Le FvW est présent dans le plasma, les granules α (alpha) des plaquettes, les cellules endothéliales et le sous-endothélium. Son rôle est l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium (hémostase primaire) et l'agrégation des plaquettes.

neutralisants), soit en formant des complexes immuns avec ADAMTS-13 contribuant ainsi à l'augmentation de sa clairance (anticorps non neutralisants). Ces deux types d'autoanticorps neutralisants et non neutralisants peuvent coexister dans un PTT acquis [Veyradier *et al.*, 2011].

Le diagnostic de PTT est avant tout clinique. Compte tenu de l'urgence, le traitement doit commencer avant que le diagnostic ne soit confirmé par des tests de laboratoire (mesure de l'activité ADAMTS-13 et détection des anticorps anti-ADAMTS-13 [Blombery et Scully, 2014]). Le traitement instauré précocement est essentiel pour améliorer la survie et prévenir la progression avec une défaillance organique [Plaimauer *et al.*, 2011].

Sur le plan thérapeutique, les échanges plasmatiques ou l'aphérèse s'avèrent efficaces puisqu'ils permettent de préserver un taux de survie de 90 % [Veyradier *et al.*, 2011]. Dans le cas de PTT acquis avec des titres élevés d'inhibiteurs de l'activité d'ADAMTS-13 ou réfractaire à l'aphérèse, un traitement immunosuppresseur à base de cyclophosphamide, cyclosporine et rituximab s'est montré efficace [Zheng *et al.*, 2010]. Dans de 20 % à 50 % des cas, une rechute est possible et se définit par un épisode de PTT acquis plus de 30 jours après la rémission. Le Groupe canadien d'aphérèse estime qu'après une période de suivi de plus de 10 ans, le risque de rechute est de 36 % [Scully *et al.*, 2012].

3.3 Nombre de patients visés

Sur la base du nombre de tests réalisés au CHU Sainte-Justine, le demandeur estime entre 25 et 50 analyses (en routine) et entre 2 et 5 analyses (en STAT) par année le nombre de tests attendus pour le Québec, les trois prochaines années.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Hémo-oncologie, néphrologie, neurologie.

3.5 Modalités d'administration du test

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

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

La détection des anticorps anti-ADAMTS-13 est une nouvelle analyse, complémentaire au dosage quantitatif de l'activité d'ADAMTS-13, analyse inscrite au répertoire des procédures de biologie médicale (code 20107). Elle est réalisée en seconde intention seulement si l'activité d'ADAMTS-13 est < 10 %.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le dosage de l'activité d'ADAMTS-13 est l'analyse de première intention devant toute suspicion de PTT. Si cette activité est < 10 %, la recherche d'anticorps anti-ADAMTS-13 est recommandée (avec titrage des IgG) ainsi que celle d'une activité inhibitrice circulante par méthode Bethesda. La positivité de l'une ou de l'autre de ces analyses permet de poser le diagnostic de PTT acquis d'origine auto-immune [Veyradier *et al.*, 2011].

Deux approches permettent la détection des anticorps anti-ADAMTS-13. La première est basée sur la recherche d'anticorps neutralisants ou inhibiteurs de l'activité d'ADAMTS-13

par des tests fonctionnels. Ces tests consistent à induire l'inhibition de l'activité d'ADAMTS-13 d'un plasma normal en le mélangeant au plasma du patient à tester avec un diagnostic de PTT (méthode Bethesda). Le mélange est préincubé généralement à une température de 56°C pour inactiver toute activité résiduelle d'ADAMTS-13. Bien qu'elle soit utile, cette méthode semi-quantitative est coûteuse, laborieuse [Jin *et al.*, 2008] et peu sensible. De plus, il n'existe pas de consensus quant à l'expression des résultats [Bovet, 2013; Peyvandi *et al.*, 2010].

La seconde approche consiste à détecter à la fois l'activité neutralisante et non neutralisante des anticorps anti-ADAMTS-13 de type IgG et à mesurer la concentration de ces autoanticorps. Les méthodes *Western blot* et ELISA sont utilisées pour la détection ou le titrage des anticorps anti-ADAMTS-13 [Veyradier *et al.*, 2011; Kremer Hovinga et Lämmle, 2012]. Bien que plus sensible que la méthode ELISA, la méthode *Western blot* n'est pas une méthode quantitative [Peyvandi *et al.*, 2010]. La méthode ELISA peut non seulement refléter la concentration des anticorps, mais aussi les affinités et la cinétique de liaison de ces anticorps [Plaimauer *et al.*, 2011].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La détection des anticorps anti-ADAMTS-13 permet de confirmer le diagnostic de PTT acquis auto-immune, de suivre l'évolution de la maladie et d'évaluer l'efficacité de la thérapie immunosuppressive.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

La détection des anticorps anti-ADAMTS-13 ne remplace aucune autre analyse disponible dans le *Répertoire*.

5.1.2 Valeur diagnostique

La présence de l'anémie hémolytique microangiopathique et de la thrombocytopénie sans autre cause évidente est suffisante pour établir un premier diagnostic de PTT et d'initier le traitement par échange de plasma. Ce traitement ne devrait pas être retardé par les résultats de dosage de l'activité ADAMTS-13 [George *et al.*, 2014].

Pour certains auteurs, le dosage de l'activité ADAMTS-13 et des anticorps anti-ADAMTS-13 est essentiel pour distinguer la forme idiopathique de la forme congénitale du PTT et pour différencier le PTT des autres processus microangiopathiques (par exemple, une tumeur maligne associée à la microangiopathie thrombotique et le syndrome hémolytique et urémique atypique) qui ont des implications importantes pour le traitement. La détection des anticorps anti-ADAMTS-13 (de type IgG essentiellement) est une analyse de seconde intention pratiquée uniquement en cas de déficit sévère de l'activité d'ADAMTS-13 (< 10 %) [Blombery et Scully, 2014].

La valeur ajoutée du dosage d'anticorps anti-ADAMTS-13 pour le diagnostic initial et la décision de traiter demeure incertaine, d'autant plus que ces résultats peuvent ne pas être disponibles pendant plusieurs jours, alors que la décision de traiter doit être entreprise [Kaplan *et al.*, 2014]. Pour d'autres experts qui ont participé en 2013 à une conférence de

consensus de l'*American Society for Apheresis* (ASFA) sur la prise en charge du PTT, l'intérêt clinique de la détection des anticorps anti-ADAMTS-13 (non neutralisants) est inconnue [Sarode *et al.*, 2013]. En outre, il a été rapporté que les anticorps anti-ADAMTS-13 peuvent être décelables chez les sujets sains entre 13 % et 15 % des cas, par les trousse commerciales ELISA disponibles, limitant l'utilité de ces méthodes de détection pour distinguer la forme acquise de la forme congénitale ou pour identifier les patients à risque de récives par suite d'un épisode aigu de PTT acquis [Kremer Hovinga et Lämmle, 2012].

Le tableau 1 présente les résultats des études qui ont analysé la prévalence des anticorps anti-ADAMTS-13 détectés par ELISA dans un contexte clinique de PTT acquis chez des adultes avec une activité d'ADAMTS 13 < 10 %. La majorité des études montre la présence de ces anticorps entre 97 % et 100 % des cas, sauf une [Bovet, 2013] qui détecte des IgG dans 64 % des cas pour un seuil de positivité de 25 UI/ml. Les titres seuils de positivité sont variables d'une étude à l'autre. Deux études indiquent la présence d'anticorps anti-ADAMTS-13 de type IgG dans le groupe témoin entre 6,6 % et 9,6 %, malgré une activité ADAMTS-13 normale ou proche de la normale [Tsai *et al.*, 2006; Rieger *et al.*, 2005].

Tableau 1 Prévalence des anticorps anti-ADAMTS-13 (type IgG) détectés par méthode ELISA durant la phase aiguë du PTT acquis avec un déficit sévère d'ADAMTS-13 < 10 %

ÉTUDE	PATIENTS AVEC PTT ACQUIS		GROUPE TÉMOIN	
	N	ANTI-ADAMTS-13 (IGG)*	TÉMOIN	n/N (%)
		PRÉVALENCE n/N (%)		
Bovet, 2013	11 PTTA	7/11 (64)	NS	
Ferrari <i>et al.</i> , 2014	68 PTTAI‡	68/68 (100)	NS	
Plaimauer <i>et al.</i> , 2011	34 PTTA	34/34 (100)	NS	
Zheng <i>et al.</i> , 2010	59 PTTAI	58/59 (98)	NS	
Ferrari <i>et al.</i> , 2009	58§ 53 PTTAI 5 PTTAS	58/58 (100)	NS	
Tsai <i>et al.</i> , 2006	53 PTTAI	53/53 (100)	40 VS 34 hospitalisés choisis au hasard 61 autres MAT	13/135 (9,6)
Rieger <i>et al.</i> , 2005	36 PTTA 33 PTTAI 3 PTTAS	35/36 (97)	111 donneurs de sang 15 MAT avec activité ADAMTS-13 > 10 % 50 MAT avec thrombocytopénies 55 syndromes antiphospholipides 15 hémophilie A 40 LES	19/286 (6,6)

Abréviations : LES : lupus érythémateux systémique; MAT : microangiopathie aiguë thrombotique; N : nombre total de patients; n : nombre de patients positifs; NS : non signalé; PTTA : purpura thrombotique thrombocytopénique acquis; PTTAI : purpura thrombotique thrombocytopénique acquis idiopathique; PTTAS : purpura thrombotique thrombocytopénique acquis secondaire; VS : volontaires sains.

* Les valeurs seuils utilisées sont variables et exprimées en différentes unités. ‡ Parmi les 68 patients, 48 ont connu leur premier épisode de PTTA et 20 avaient une récive. § Parmi les 58 patients, 44 ont été analysés durant leur premier épisode de PTT et 14 durant une récive. || Âge des patients : 10 ans et plus.

5.1.3 Valeur pronostique

La présence d'anticorps anti-ADAMTS-13 dans un PTT acquis en rémission n'est pas exclue. Ferrari et ses collaborateurs [2014] ont montré que 75 % des patients en rémission avaient des anticorps anti-ADAMTS-13 décelables, quoique les titres avaient diminué significativement (médiane 600 versus 25; $p < 0,001$). Tsai et ses collaborateurs [2006] précisent la présence de titres élevés d'anticorps anti-ADAMTS-13 chez 75 % des patients après échanges plasmatiques et chez 45 % durant la rémission, et une corrélation inverse entre les titres des anticorps anti-ADAMTS-13 et l'activité résiduelle d'ADAMTS-13 pour les échantillons de PTT acquis ($r = -0,69$; $p < 0,0001$) ou pour les échantillons de PTT acquis traités par plasmaphérèse ou en rémission ($r = -0,78$; $p < 0,0001$) [Tsai *et al.*, 2006].

Pour certains auteurs [Ferrari *et al.*, 2007], la présence en phase aiguë d'anticorps anti-ADAMTS-13 associée avec des titres élevés d'inhibiteurs d'ADAMTS-13 était prédictive de la persistance d'une activité ADAMTS-13 basse en rémission et le taux de rechutes était significativement élevé chez les patients (38,5 %) dont l'activité ADAMTS-13 demeurait non détectable en phase de rémission versus ceux (5 %) qui présentaient une activité ADAMTS-13 détectable. Le risque de rechutes associé à une prévalence élevée des anticorps anti-ADAMTS-13 est également signalé par d'autres auteurs, [rapport des cotes ou RC = 3,1; IC à 95 % : de 1,4 à 7,3] surtout lorsqu'il y a persistance d'une très faible activité d'ADAMTS-13 < 10 % [RC = 3,6 (IC à 95 % : de 1,4 à 9,0)] [Peyvandi *et al.*, 2008]. Dans une autre étude, durant la phase de rémission, le risque de récides est 5 fois plus élevé pour les patients ayant une faible activité d'ADAMTS-13 (< 10 %) [QRI⁷³ = 4,89 (IC à 95 % : de 2,00 à 11,99) ou en présence d'IgG [QRI = 4,99 (IC à 95 % : de 2,08 à 12,00); $p < 0,001$] [Bettoni *et al.*, 2012]. Pour Jin et ses collaborateurs [2008], seule l'activité d'ADAMTS-13 en période de rémission a un potentiel de prédiction de récides ($p=0,03$), alors que ce potentiel n'a pas été signalé pour les anticorps anti-ADAMTS-13. La corrélation entre l'activité d'ADAMTS-13 et la concentration des anticorps anti-ADAMTS-13 dans 157 échantillons prélevés durant la période de rémission est faible ($r = -0,028$). Peyvandi et ses collaborateurs [2010] concluent à la nécessité d'évaluer, avec des études prospectives à grande échelle, la valeur prédictive de récides des anticorps anti-ADAMTS-13.

5.1.4 Valeur thérapeutique

La présence des anticorps anti-ADAMTS-13 peut justifier la nécessité de poursuivre les échanges plasmatiques jusqu'à obtention d'une rémission [Manucci *et al.*, 2012] et la possibilité de bénéficier de l'addition de glucocorticoïdes du rituximab en cas d'inefficacité des échanges plasmatiques [George *et al.*, 2014]. Pour Scully et ses collaborateurs [2007], la décision d'avoir recours au rituximab est appuyée par la clinique, l'activité d'ADAMTS-13 et les niveaux d'anti-ADAMTS-13, et l'efficacité du rituximab est déterminée par une augmentation de l'activité ADAMTS-13 et une réduction des anti-ADAMTS-13. Ces auteurs ont montré une relation de réciprocité entre les niveaux d'anticorps anti-ADAMTS-13 et l'activité ADAMTS-13 chez 25 adultes atteints de PTT acquis idiopathique réfractaire aux échanges plasmatiques ou avec des récides apparues plus de 6 mois suivant un épisode de PTT aigu, traités au rituximab. Après quatre semaines de traitement au rituximab, on a observé une augmentation de l'activité ADAMTS-13 et une réduction des anticorps anti-ADAMTS-13 [médiane de 55 % (15-140 %) à 6 % (2-21 %)] significatives ($p < 0,0001$) témoignant de l'intérêt des anti-ADAMTS-13 (IgG) pour le suivi du traitement au rituximab.

⁷³ Quotient de risque instantané; en anglais *Hazard Ratio* ou HR.

5.2 Validité clinique

Aucune étude portant sur la validité clinique de la détection des anticorps anti-ADAMTS-13 par ELISA n'a été repérée.

5.3 Validité analytique (ou technique)

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

Précision

La précision inter-essai de la méthode ELISA a été déterminée par l'analyse d'un plasma humain normal et d'un plasma de référence avec PTT acquis (positif pour les titres d'anticorps anti-ADAMTS-13, IgG et IgM) dans 27 et 20 dosages consécutifs pour la détection des IgG et IgM, respectivement, à différents jours. Le coefficient de variation (CV) inter-essai était < 20 % [Rieger *et al.*, 2005].

Les variations inter-essai et intra-essai de la méthode ELISA (trousse IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA) sont acceptables : CV < 16 % pour 10 essais, pour des mesures d'anticorps anti-ADAMTS-13 variant de 37,5 à 12 000 µg/ml [Jin *et al.*, 2008].

Tsai et ses collaborateurs [2006] ont évalué la précision de la méthode ELISA (trousse IMUBIND, American Diagnostics, Stamford, CT, É.-U.) en établissant une courbe de référence sur 5 séries de dilution du plasma d'un patient hospitalisé porteur du PTT, choisi au hasard et dont le titre d'anticorps anti-ADAMTS-13 est connu (60 AU/ml). La courbe de référence (relation graphique entre les dilutions du plasma et la valeur de la densité optique avec une absorbance à 450 nm) est obtenue pour chaque dilution de sérum. Globalement, la méthode ELISA (trousse IMUBIND, American Diagnostics, Stamford, CT, É.-U.) fournit une bonne résolution pour de 2 à 60 AU/ml. L'équation de régression de la courbe de référence fournit un coefficient de détermination proche de la valeur 1, $r^2 = 0,9998$. Les échantillons de plasma avec des niveaux élevés d'IgG sont dilués et réanalysés. Les coefficients de variation intra-essai et inter-essai sont de 6,7 % et de 7,8 % respectivement.

Données du requérant sur la méthode ELISA « maison »

La reproductibilité intra-essai a été mesurée sur 10 essais pour différentes dilutions. Le CV est < 6 % pour des dilutions de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 et le CV est < 20 % pour des dilutions entre 1/800 et 1/6400.

Corrélation

Corrélation faible entre les titres d'anticorps anti-ADAMTS-13 mesurés par ELISA et les inhibiteurs de l'activité ADAMTS-13 recherchés par tests fonctionnels avec un coefficient de Spearman (r) de 0,502; $p < 0,001$ [Plaimauer *et al.*, 2011].

Concordance

La recherche d'anticorps neutralisants anti-ADAMTS-13 (inhibiteurs) par d'autres méthodes (*residual ristocetin cofactor activity residual collagen-binding activity immunoblotting*) a donné des résultats négatifs chez 6 patients dont la présence d'anticorps anti-ADAMTS-13 a été confirmée par la méthode ELISA [Rieger *et al.*, 2005].

Interférence et effet de matrice (*matrix effect*)

Monographie de la trousse IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA [2012] :

Les échantillons de plasma doivent être exempts de plaquettes, ne doivent pas être congelés et décongelés plus de deux fois et ne doivent pas être recueillis sur un anticoagulant tel que l'EDTA⁷⁴. Les échantillons plasmatiques ictériques, lipémiques et hémolysés peuvent interférer avec le dosage et doivent être rejetés.

Monographie de la trousse TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA Technoclone [2007] :

Les échantillons avec des concentrations élevées d'autoanticorps, autres que ceux dirigés contre ADAMTS-13, peuvent être considérés comme étant faiblement positifs ou dans la zone limite.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Au Royaume-Uni, le *British Committee for Standards in Haematology* recommande de mesurer l'activité d'ADAMTS-13 et de détecter les anticorps anti-ADAMTS-13 avant d'instaurer un traitement (grade 1B⁷⁵). Cette recommandation s'applique à un contexte clinique de PTT et ne vise pas de façon spécifique la forme idiopathique [Scully *et al.*, 2012].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : Il n'a pas été analysé.

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

Elles n'ont pas été analysées.

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

Ils n'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Le diagnostic d'un PTT est avant tout clinique; il doit être établi en temps opportun afin d'initier rapidement un traitement à base d'échanges plasmatiques. Durant la phase aiguë, les mesures d'ADAMTS-13 sont utiles pour un diagnostic de confirmation, dans la mesure où

⁷⁴ EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

⁷⁵ Recommandation de grade 1 : forte. Les cliniciens sont très certains que le bénéfice l'emporte ou ne l'emporte pas sur les risques et les effets indésirables.

Recommandation de grade B : modérée. Des recherches futures sont susceptibles d'avoir un impact important sur notre confiance dans l'estimation de l'effet et peuvent changer cette estimation. British Committee for Standards in Haematology (BCSH). Evidence levels and grades of recommendation: Grade [site Web]. Disponible à :

http://www.bcsghguidelines.com/BCSH_PROCESS/EVIDENCE_LEVELS_AND_GRADES_OF_RECOMMENDATION/43_GRADE.html.

le dosage de l'activité ADAMTS-13 évalue la gravité du déficit ($>$ ou $<$ à 10 %) et dans un contexte de déficience sévère de l'activité d'ADAMTS-13 $<$ 10 %, la détection des anticorps anti-ADAMTS-13 est une analyse de seconde intention utile qui permet de confirmer l'origine auto-immune du déficit d'ADAMTS-13 et d'exclure un PTT congénital.

La recherche de ces anticorps en phase thérapeutique permet de justifier la prescription des médicaments immunosuppresseurs, le cas échéant.

Durant le suivi et en phase de rémission, la nécessité de détecter des anticorps anti-ADAMTS-13 (IgG) est encore discutée.

7.2 Validité clinique

Aucune étude sur la validité clinique de cette analyse n'a été repérée.

7.3 Validité analytique

Les données disponibles suggèrent une bonne performance analytique des trousses commerciales disponibles. Quant à la méthode maison, la répétabilité et la reproductibilité ont été validées.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Le seul guide de pratique clinique disponible, celui du *British Committee for Standards in Haematology*, recommande de mesurer l'activité d'ADAMTS-13 et de détecter les anticorps anti-ADAMTS-13 avant d'instaurer un traitement (grade 1B).

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Détection des anticorps anti-ADAMTS-13

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

- ☐ Avis de recommandation d'introduction
- ☐ Avis de refus d'introduction
- ☒ Avis de réévaluation lorsque :
 - plus de données d'utilité et de validité seront disponibles;
 - la démonstration de la valeur ajoutée de l'utilisation pour une seule catégorie de patients sera faite;
 - la preuve de l'effet réel de l'analyse sur la prise en charge du PTT chez les adultes sera faite.

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

- Bettoni G, Palla R, Valsecchi C, Consonni D, Lotta LA, Trisolini SM, et al. ADAMTS-13 activity and autoantibodies classes and subclasses as prognostic predictors in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2012;10(8):1556-65.
- Blombery P et Scully M. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura: Current perspectives. *J Blood Med* 2014;5:15-23.
- Bovet J. Etude rétrospective de 11 patients de 2006 à 2012 suivis pour Purpura Thrombotique Thrombocytopénique au centre hospitalier du Mans [thèse]. Angers, France : Université d'Angers; 2013. Disponible à : <http://dune.univ-angers.fr/fichiers/20106886/2013MCEM2119/fichier/2119F.pdf>.
- Coppo P. Microangiopathies thrombotiques : de la physiopathologie aux applications thérapeutiques. Dans : Lesavre P, Drüeke T, Legendre C, Niaudet P, réd. Actualités néphrologiques Jean Hamburger - Hôpital Necker. Paris, France : Lavoisier / Médecine Sciences Publications; 2011 : 109-25. Disponible à : <http://www.soc-nephrologie.org/PDF/enephro/publications/actualites/2011/09-coppo.pdf>.
- Ferrari S, Palavra K, Gruber B, Kremer Hovinga JA, Knobl P, Caron C, et al. Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2014;99(4):779-87.
- Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheifflinger F. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2009;7(10):1703-10.
- Ferrari S, Scheifflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood* 2007;109(7):2815-22.
- George JN, Leung LL, Tirmauer JS. Causes of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome in adults. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com/contents/causes-of-thrombotic-thrombocytopenic-purpura-hemolytic-uremic-syndrome-in-adults>.
- Jin M, Casper TC, Cataland SR, Kennedy MS, Lin S, Li YJ, Wu HM. Relationship between ADAMTS13 activity in clinical remission and the risk of TTP relapse. *Br J Haematol* 2008;141(5):651-8.
- Just S. Methodologies and clinical utility of ADAMTS-13 activity testing. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(1):82-90.

- Kaplan AA, George JN, Leung LL, Tirmauer JS. Treatment and prognosis of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndromes in adults. Waltham, MA : Wolters Kluwer Health; 2014. Disponible à : <http://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prognosis-of-thrombotic-thrombocytopenic-purpura-hemolytic-uremic-syndromes-in-adults>.
- Kremer Hovinga JA et Lämmle B. Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:610-6.
- Mannucci PM et Franchini M. Advantages and limits of ADAMTS13 testing in the prognostic assessment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Presse Med* 2012;41(3 Pt 2):e157-62.
- Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010;8(4):631-40.
- Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Battaglioli T, et al. ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica* 2008;93(2):232-9.
- Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C, Wolfsegger MJ, Skalicky S, Schmidt M, et al. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost* 2011;9(5):936-44.
- Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, et al. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood* 2005;106(4):1262-7.
- Sarode R, Bandarenko N, Brecher ME, Kiss JE, Marques MB, Szczepiorkowski ZM, Winters JL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2012 American Society for Apheresis (ASFA) consensus conference on classification, diagnosis, management, and future research. *J Clin Apher* 2014;29(3):148-67.
- Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol* 2012;158(3):323-35.
- Sekisui Diagnostics. IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA (REF 814RUO). Stamford, CT : Sekisui Diagnostics; 2012. Disponible à : <http://www.mediatec.com/arg/files/814RUO%20Inserto.pdf>.
- Technoclone. Technozym® ADAMTS-13 INH ELISA (REF 5450401). Vienne, Autriche : Technoclone; 2007. Disponible à : <http://cryopep.com/medias/notice-Technoclone-4-5450401-4-5450451-4-5450461-4-5450463-Technozym-ADAMTS-13-INH.pdf>.
- Tsai HM, Raoufi M, Zhou W, Guinto E, Grafos N, Ranzurmal S, et al. ADAMTS13-binding IgG are present in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2006;95(5):886-92.

Veyradier A, Wolf M, Stepanian A, Coppo P. ADAMTS13, la protéase spécifique de clivage du facteur von Willebrand. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie médicale, 90-20-0003-A; 2011.
Disponible à : <http://site.geht.org/UserFiles/file/Enseignement/EMC%20ADAMTS13%20emb-56567.pdf>.

Zheng XL, Wu HM, Shang D, Falls E, Skipwith CG, Cataland SR, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2010;95(9):1555-62.

RECHERCHE DE PROTOZOAIRES INTESTINAUX PAR PCR MULTIPLEX EN TEMPS RÉEL (RÉFÉRENCE – 2014.03.12)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Centre universitaire de santé McGill
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 29 septembre 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 3 novembre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 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.

Conflit d'intérêts

Le D^r David S. Rosenblatt du CUSM se retire au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Recherche des protozoaires intestinaux pathogènes *Cryptosporidium* sp⁷⁶, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia* dans les selles par qPCR (réaction en chaîne par polymérase en temps réel) multiplex.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'extraction d'ADN est réalisée avec la trousse Nuclisense easyMAG™, étape qui consiste à agiter les spécimens pendant cinq minutes avec des billes de verres. Le demandeur utilise la trousse RIDA®GENE pour l'amplification et la détection des cibles. L'analyse par qPCR permet la détection qualitative et la différenciation des protozoaires entériques *Cryptosporidium* sp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia*. La réaction PCR amplifie un fragment du gène 18S-ITS spécifique aux quatre protozoaires. Le fragment amplifié est détecté par des sondes d'hydrolyse (TaqMan) (RIDA®GENE Parasitic Stool Panel I de R-Biopharm). L'analyse est réalisée sur un appareil LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche Diagnostics). Le mélange réactionnel contient également un contrôle interne permettant d'évaluer l'efficacité de l'amplification et de la détection [R-Biopharm AG, 2013]. Des contrôles positifs sont également fournis à des concentrations respectives de 1×10^3 (*Cryptosporidium* sp., *D. fragilis* et *G. lamblia*) et de 1×10^4 copies/ μ l (*E. histolytica*).

L'appareil détecte les différentes séquences amplifiées selon la fluorescence émise et selon le point de fusion de l'ADN double-brin qui en résulte [R-Biopharm AG, 2013].

⁷⁶ sp : espèce non précisée.

2.3 Société ou développeur

- Manufacturier de la trousse Nuclisense easyMAG™ : Biomérieux (Canada).
- Manufacturier de la trousse RIDA®GENE : R-Biopharm AG (Allemagne).

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

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

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

RIDAGENE Parasitic Stool Panel : numéro d'homologation de Santé Canada 91377, obtenue le 23 mai 2013.

2.7 Valeur pondérée : 34,7.

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

3.1 Patients ciblés

Les patients chez qui on soupçonne une diarrhée d'origine parasitaire.

3.2 Description de la maladie visée

L'infection par ces parasites intestinaux se produit suivant l'ingestion de kystes se trouvant dans l'eau ou la nourriture contaminées; elle peut être transmise de personne à personne ou sous forme de zoonose.

Bien que *Cryptosporidium parvum* et *C. hominis* soient les agents causant le plus souvent la cryptosporidiose, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. anderson* et *C. muris* peuvent également engendrer des symptômes cliniques [Fayer, 2010]. Chez les gens immunocompétents, l'infection se manifeste par de la diarrhée, des malaises, des douleurs abdominales et des vomissements. D'autres symptômes également présents sont la fièvre, des nausées, une perte d'appétit et de poids [Ravel *et al.*, 2013]. Les individus immunocompromis développent souvent une maladie plus grave, chronique et parfois fatale [Leitch et He, 2012; Blanshard *et al.*, 1992].

Dientamoeba fragilis est un protozoaire entérique dont le caractère pathogène et son implication dans les maladies gastro-intestinales a été démontrée récemment. Sa présence dans la flore intestinale peut être asymptomatique ou se manifester par la diarrhée et des douleurs abdominales [Barratt *et al.*, 2011; Stark *et al.*, 2006].

Entamoeba histolytica, le seul organisme pathogène du genre *Entamoeba*, cause l'amibiase. La majorité des personnes infectées est asymptomatique. Dans 10 % des cas, l'infection se manifeste par de la diarrhée, des douleurs abdominales ainsi que des ballonnements. Plus rarement, l'amibiase extra-intestinale affecte le foie (abcès hépatique) [Ravel *et al.*, 2013]. L'ingestion de moins de 10 kystes suffit à infecter l'hôte [Idowu et Rowland, 2006].

Giardia lamblia, un protozoaire flagellé qui parasite l'intestin [Huang et White, 2006], cause la giardiose. Celle-ci se manifeste par des douleurs abdominales, des ballonnements, de la diarrhée, de la fatigue et une perte de poids [Ravel *et al.*, 2013]. L'ingestion de 10 à 25 kystes suffit à infecter une personne. L'infection se déclenche à l'intérieur de 7 à 10 jours et les

symptômes persistent pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines [Vesey et Peterson, - 1999].

Épidémiologie

Une étude, réalisée au Centre des maladies tropicales de l'Université McGill avec l'objectif d'évaluer la reproductibilité de la microscopie, a montré qu'*Entamoeba histolytica*/*E. dispar* était présent dans 4,7 % des 9376 échantillons analysés entre avril 2002 et mars 2004, *Giardia lamblia* dans 4,2 %, *Dientamoeba fragilis* dans 2,9 %, *Cryptosporidium* sp. dans 0,2 % des spécimens [Libman *et al.*, 2008]. Dans une étude publiée sous forme de résumé, Lungrin a analysé rétrospectivement la prévalence des différents parasites intestinaux pathogènes et les tendances observables entre 2008 et 2012, à partir de 239 475 spécimens de selles prélevées de résidents de l'Ontario. Il a déterminé que la prévalence de parasites intestinaux pathogènes était de 5,0 %. Des protozoaires représentaient 85,1 % de ceux-ci. Les protozoaires pathogènes les plus fréquents étaient *D. fragilis* (59,6 %), *G. lamblia* (24,7 %), *E. histolytica/dispar* (11,4 %) et *Cryptosporidium* sp. (2,3 %) [Lungrin *et al.*, 2014].

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur fait actuellement la recherche de parasites dans les selles pour environ 210 spécimens par semaine, soit pour environ 105 patients par semaine. Le demandeur prévoit que ce nombre doublera (discussion avec le demandeur), quoiqu'un seul spécimen sera nécessaire pour le qPCR.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Parasitologie, gastroentérologie, infectiologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Cette analyse s'effectue sur des spécimens de selles fraîches ou congelées, non préservées. Les patients prélèvent eux-mêmes une selle dans un pot sans agent de préservation. Lors de sa réception au laboratoire du CUSM, le spécimen est acheminé vers le secteur de biologie moléculaire où l'analyse est effectuée quotidiennement. Une série d'amplifications permet d'analyser jusqu'à 94 spécimens par jour. L'analyse est effectuée chaque jour ouvrable.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

La détection des protozoaires intestinaux pathogènes par qPCR multiplex est une méthode complémentaire à la microscopie pour la recherche de parasites intestinaux. La microscopie devient ainsi une analyse de deuxième ligne, pertinente lorsqu'il y a une suspicion clinique de pathogène entérique non compris dans le panel utilisé.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

La microscopie est actuellement utilisée en première ligne pour la détection des parasites intestinaux, protozoaires et helminthes. Comme la microscopie ne permet pas de distinguer *E. histolytica* (pathogène) d'*E. dispar*, lorsque le résultat indique la présence de ce parasite, un spécimen de plus doit être prélevé et acheminé au LSPQ pour la différenciation entre les deux amibes par TAAN (code 80570, *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*).

Une recherche de *Cryptosporidium* sp. et de *Giardia lamblia* par immunofluorescence est également disponible au Québec (code 41151). Celle-ci est plus appropriée que la microscopie (codes 41152 et 41153) lorsque l'un des deux organismes est spécifiquement recherché, p. ex. lors d'une éclosion.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La raison principale du changement de technique est le très grand volume de spécimens reçus par le centre demandeur. La demande en parasitologie clinique a augmenté en raison d'un intérêt croissant envers les parasites en tant que cause de diarrhées chroniques et d'autres symptômes, ainsi que de morbidité chez des individus immunocompromis [Bruijnesteijn van Coppenraet *et al.*, 2009]. De plus, la microscopie demande beaucoup de temps et de travail technique [Ten Hove *et al.*, 2009].

Au Centre universitaire de santé McGill, le délai actuel entre la réception du spécimen et la diffusion du résultat porte déjà atteinte à la pertinence clinique de la recherche de parasites dans les selles par microscopie. Le temps de réponse médian était de 12 jours au cours de la dernière année. Bien que 10 % des analyses aient été réalisées à l'intérieur de 7 jours, une proportion de 10 % a pris plus de 18 jours avant l'émission d'un résultat. L'analyse par qPCR permettra de réduire le temps de réponse.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

La recherche de protozoaires entériques par qPCR multiplex remplace la recherche de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp. par immunofluorescence.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Un diagnostic précis et rapide des protozoaires intestinaux est important dans la prise de décision du plan de traitement, minimisant le risque de développer une maladie grave. Il est également important pour la santé publique, en permettant la détection rapide d'éclosion, et pour la surveillance épidémiologique afin de comprendre la distribution et la voie de transmission des pathogènes [Van Lieshout et Verweij, 2010].

5.1.3 Valeur thérapeutique : Ne s'applique pas.

5.2 Validité clinique

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

Données locales

Le CUSM a comparé localement la microscopie et la trousse RIDA®GENE. Au total, 56 564 spécimens provenant de 15 338 patients ont été analysés par les deux méthodes sur une période de 45 mois (de janvier 2011 à septembre 2014). La méthode RIDA®GENE a permis de détecter 90,4 % des protozoaires pathogènes détectés par la microscopie (voir le tableau 2). La microscopie permet également la détection des helminthes, qui ne font pas partie des pathogènes recherchés par la trousse RIDA®GENE. Cette dernière détecte alors 85,6 % des pathogènes (protozoaires et helminthes confondus) trouvés en microscopie. Cliniquement, la méthode RIDA®GENE a permis la détection de protozoaires intestinaux chez 1500 des 1558 patients trouvés positifs par microscopie. La méthode RIDA®GENE a ainsi présenté une sensibilité de 96,3 % pour la détection des patients porteurs de protozoaires intestinaux pathogènes. La microscopie détectant également les helminthes, la sensibilité globale de la méthode RIDA®GENE est alors de 91,0 % pour la détection des patients porteurs de parasites intestinaux pathogènes.

Tableau 2 Validité clinique de la détection des parasites intestinaux des méthodes PCR en temps réel (qPCR)

ÉTUDES	NOMBRE DE PATIENTS OU SPÉCIMENS	COMPARATEUR	PARASITES (POSITIFS)	SENSIBILITÉ %	SPÉCIFICITÉ %	VPP %	VPN %
Validation locale	15 338 patients	Microscopie	Protozoaires et helminthes	91,0	100	100	98,9
			Protozoaires pathogènes	96,3	100	100	99,5
	56564 spécimens	Microscopie	Protozoaires et helminthes	85,6	100	100	99,0
			Protozoaires pathogènes	90,4	100	100	99,4
Lloyd <i>et al.</i> , 2014	101 spécimens	Microscopie	<i>C. parvum/hominis</i> (20)	100	-	n.d.	n.d.
			<i>G. lamblia</i> (24)	100	-	n.d.	n.d.
			<i>D. fragilis</i>	85,7	-	n.d.	n.d.
			<i>E. histolytica/dispar</i> (7)*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	24		<i>B. hominis</i> (24 ctrl-)	0	-	n.d.	n.d.
Simons <i>et al.</i> , 2013	218	PCR maison	<i>Cryptosporidium</i> sp. (28)	96,4	99,5	96,4	99,5
			<i>D. fragilis</i> (37)	97,4	100	100	98,3
			<i>E. histolytica</i> (29)	100	100	100	100
			<i>G. lamblia</i> (38)	95,0	100	100	98,9

ÉTUDES	NOMBRE DE PATIENTS OU SPÉCIMENS	COMPARATEUR	PARASITES (POSITIFS)	SENSIBILITÉ %	SPÉCIFICITÉ %	VPP %	VPN %
Stark <i>et al.</i> , 2011	472 spécimens	qPCR maison	<i>Cryptosporidium</i> sp. (9)	100	100	n.d.	n.d.
			<i>D. fragilis</i> (26)	100	100	n.d.	n.d.
			<i>E. histolytica</i> (11)	100	100	n.d.	n.d.
			<i>G. lamblia</i> (28)	100	100	n.d.	n.d.
Bruijnesteijn van Coppenraet <i>et al.</i> , 2009	397 TFT	Microscopie	<i>C. parvum/hominis</i> (2)	100	99,7	67,0	100
			<i>G. lamblia</i> (29)	96,5	95,6	63,6	99,7
			<i>D. fragilis</i> (69)	92,7	82,3	52,5	98,2
			<i>E. histolytica</i> (1)	100	100	100	100

Abréviations : ctrl- : contrôle négatif; n.d. : non disponible; PCR : réaction en chaîne de polymérase; TFT : analyses de 3 spécimens (three feces tests); VPN : valeur prédictive négative; VPP : valeur prédictive positive.

* La microscopie ne distingue pas *E. histolytica* de *E. dispar*.

Sensibilité et spécificité

Une étude visant à évaluer la sensibilité et la spécificité de deux méthodes multiplex commercialisées a été réalisée par Lloyd et ses collaborateurs au Calgary Laboratory Services. Une collecte de 101 spécimens de selles contenant les parasites *C. parvum/hominis*, *G. lamblia*, *D. fragilis* et *E. histolytica/dispar* a été testée de manière rétrospective. Puis, 24 spécimens contenant le protozoaire *Blastocystis hominis* ont été testés et se sont révélés négatifs (voir le tableau 2) [Lloyd *et al.*, 2014]. La trousse RIDA®GENE a présenté une sensibilité de 100 % pour *Cryptosporidium* sp. et *Giardia lamblia* et de 85,7 % pour *D. fragilis*. Les résultats présentés pour *E. histolytica/dispar* ne sont pas suffisants pour déterminer la sensibilité des trousse. Pour ce faire, les sept spécimens utilisés devraient être testés par une méthode permettant de distinguer entre *E. histolytica* et *E. dispar*.

Dans une étude rétrospective, Bruijnesteijn et ses collaborateurs ont évalué l'utilisation d'une méthode qPCR jumelée à un algorithme pour l'utilisation de la microscopie pour la détection des quatre protozoaires intestinaux. Ils ont établi que parmi les spécimens de 2 887 patients, il n'y avait que neuf résultats positifs de parasites intestinaux non protozoaires et que ceux-ci étaient pris en compte par l'algorithme.

Les spécimens de selles de 397 patients recueillis entre janvier et avril 2007 ont été testés en raison de douleurs gastro-intestinales ou d'une diarrhée persistant plus de sept jours ou encore dans des cas d'adoption. Deux méthodes PCR en temps réel ont été comparées à la microscopie pour la détection des quatre protozoaires : *Cryptosporidium* sp., *E. histolytica*, *G. lamblia* et *D. fragilis*. L'amplification des trois premiers a été effectuée par une PCR multiplex alors que celle du dernier a été effectuée par une PCR simple. Dans les deux cas, les réactions contenaient un contrôle interne d'amplification PhHV (phocid herpes virus). Les analyses par PCR ont été effectuées en parallèle et comparées à la microscopie (voir le

tableau 2). La qPCR multiplex a présenté une sensibilité $\geq 92,7\%$ et une spécificité $\geq 82,3\%$ pour chacun des parasites [Bruijnesteijn van Coppenraet *et al.*, 2009].

Une étude de validation de la trousse RIDA®GENE Parasitic Stool Panel a été réalisée par R-Biopharm AG au Bernhard-Nocht-Institute (BNI) for Tropical Medicine à Hambourg en Allemagne. L'évaluation a été effectuée sur 218 spécimens de patients symptomatiques qui ont préalablement été testés par la microscopie et par des méthodes PCR maison utilisées sur place. La méthode RIDA®GENE montre une sensibilité supérieure à la microscopie pour les 4 pathogènes, et une spécificité plus grande pour *E. histolytica* puisqu'il discrimine *E. dispar*. La corrélation avec les PCR déjà en utilisation à l'Institut et le Parasitic Stool Panel est de 213/218 spécimens. Pour les 4 pathogènes, la sensibilité est $\geq 95\%$, la spécificité est $\geq 99,5\%$, la valeur prédictive positive (VPP) est $\geq 96,4\%$ et la valeur prédictive négative est $\geq 98,3\%$ (voir le tableau 2) [Simons *et al.*, 2013].

Stark et ses collaborateurs [2011] ont fait une étude de validation d'une méthode MT-PCR (multiplex tandem PCR – méthode hybride de PCR nichée et de qPCR) sur des spécimens soumis pour trouver la cause de la diarrhée chez 472 patients. Ils ont comparé les résultats obtenus par microscopie et par 4 méthodes qPCR spécifiques à chacun des parasites. Ils ont obtenu une concordance de 100 % entre les qPCR et la MT-PCR. Les deux méthodes présentent des sensibilités et spécificités de 100 %. Relativement à ces deux techniques, la microscopie a présenté une sensibilité variant entre 38 % et 56 % pour les différents parasites (voir le tableau 2) [Stark *et al.*, 2011].

5.3 Validité analytique (ou technique)

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

Données locales

Le CUSM a validé localement la trousse RIDA®GENE Parasitic Stool Panel. Une cueillette prospective de spécimens de selles fraîches ou congelées a été réalisée sur une période de 6 mois. Des spécimens positifs pour *Cryptosporidium* sp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia* ont pu être conservés pour la validation de la méthode PCR. La méthode a été validée selon les recommandations du CLSI, MM3-A2 (Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; 2006) soit avec au moins 20 spécimens positifs et 50 négatifs pour chaque parasite ciblé. Onze spécimens positifs ont pu être analysés pour *E. histolytica*, un pathogène qui n'est pas fréquent. Des spécimens positifs pour un pathogène ont également été utilisés comme contrôles négatifs pour les autres pathogènes. Quarante-trois spécimens ont ainsi été analysés. La sensibilité pour les 4 parasites est $\geq 94\%$ et la spécificité est ≥ 97 (information fournie par le demandeur).

Tableau 2 Tableau de la validité analytique de la trousse RIDA®GENE Parastic Stool Panel par rapport à la microscopie

PROTOZOAIRE (N = 93)	SENSIBILITÉ (%) [IC]	SPÉCIFICITÉ (%) [IC]	M+/P+	M+/P-	M-/P+	M-/P-
<i>Cryptosporidium</i> sp.	100,0 [83,2-100,0]	100 [95,1-100,0]	20	0	0	73
<i>D. fragilis</i>	94,4 [81,3-99,3]	98,3 [90,6-100,0]	34	2	1	56
<i>E. histolytica</i>	100,0 [71,5-100,0]	97,6 [91,5-99,7]	11	0	2	80
<i>G. lamblia</i>	96,2 [80,4-99,9]	98,5 [91,7-100,0]	25	1	1	66

Abréviations : IC : Intervalle de confiance; M : microscopie; P : panel (échantillon); VPP : valeur prédictive positive; VPN : valeur prédictive négative.

Répétabilité et reproductibilité

Un groupe de huit spécimens a été analysé après des dilutions en série de 1:5, jusqu'à une dilution de 1:625 (40 tubes). Les spécimens ont été analysés à nouveau la semaine suivante par une deuxième technologiste. La répétabilité a été de 39/40 et l'unique résultat discordant a été obtenu avec un tube à dilution 1:625 (information fournie par le demandeur).

Seuil de détection

Des dilutions en série de spécimens contenant *Cryptosporidium* sp. ont été effectuées et testées en parallèle avec un standard d'ADN fourni par le Centre national de référence en parasitologie du Québec. La méthode RIDA®GENE a permis de détecter la présence de *Cryptosporidium* sp. à des concentrations de 80 oocystes par gramme de selles dans plusieurs spécimens différents (information fournie par le demandeur).

La trousse RIDA®GENE Parasitic Stool Panel présente un seuil de détection ≤ 50 copies d'ADN par réaction (10 copies d'ADN/µl) pour les 4 protozoaires.

Spécificité analytique

La trousse RIDA®GENE Parasitic Stool Panel ne présente aucune réactivité croisée avec les pathogènes suivants : *Adenovirus* (types 40, 41), *Aeromonas hydrophila*, *Arcobacter butzleri*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. sordelii*, *Escherichia coli* entéropathogène, *E. coli* entérotoxigénique, *E. coli* entérohémorragique, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Norovirus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Serratia liquefaciens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* (livret de la trousse – PG1705RIDAGENE_PSP_ENG_13_04_02.pdf).

5.4 Recommandations d'autres organismes

Il n'a aucune recommandation quant au délai à l'intérieur duquel un résultat de recherche de parasites devrait être émis, ni quant à la méthode qui devrait être utilisée pour la recherche clinique des parasites intestinaux.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

Réduction du temps technique nécessaire à la réalisation des recherches de parasites dans les selles.

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

Elles n'ont pas été analysées.

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

Ils n'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Il est démontré que cette technique de détection des parasites intestinaux est plus rapide et demande moins de temps technique que la microscopie. Toutefois, il n'y a aucune norme quant au délai dans lequel une telle analyse devrait être offerte et aucune étude ne montre l'impact clinique du délai d'émission du résultat.

7.2 Validité clinique

Pour les parasites pris séparément, la qPCR présente :

- une sensibilité de 85,7 % à 100 %;
- une spécificité de 82,3 % à 100 %;
- une valeur prédictive positive de 52,5 % à 100 %;
- une valeur prédictive négative de 98,2 % à 100 %.

Pour la détection de l'ensemble des parasites chez 15338 patients, la qPCR présente :

- une sensibilité de 91,0 %;
- une spécificité de 100 %;
- une valeur prédictive positive de 100 %;
- une spécificité de 98,9 %.

7.3 Validité analytique

La qPCR multiplex présente :

- une répétabilité de 39/40 sur des spécimens dilués;
- un seuil de détection à 80 oocystes par gramme de selles;
- une sensibilité pour les 4 parasites ≥ 94 %;
- une spécificité ≥ 97 %;
- aucune réactivité croisée avec 29 germes dans des spécimens similaires.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Il n'y a aucune recommandation à l'effet d'utiliser ou non des méthodes PCR pour la détection des parasites intestinaux.

Il n'y a pas de recommandation quant au délai à l'intérieur duquel l'analyse devrait être offerte.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Recherche de protozoaires intestinaux par PCR multiplex en temps réel

Le statut de la technologie diagnostique

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

La recommandation de l'INESSS

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

Recommandation additionnelle

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

RÉFÉRENCES

- Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: Several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes* 2011;2(1):3-12.
- Blanshard C, Jackson AM, Shanson DC, Francis N, Gazzard BG. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Q J Med* 1992;85(307-308):813-23.
- Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(9):869-74.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010;124(1):90-7.
- Huang DB et White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35(2):291-314, viii.
- Idowu OA et Rowland SA. Oral fecal parasites and personal hygiene of food handlers in Abeokuta, Nigeria. *Afr Health Sci* 2006;6(3):160-4.
- Leitch GJ et He Q. Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res* 2012;25(1):1-16.
- Libman MD, Gyorkos TW, Kokoskin E, Maclean JD. Detection of pathogenic protozoa in the diagnostic laboratory: Result reproducibility, specimen pooling, and competency assessment. *J Clin Microbiol* 2008;46(7):2200-5.
- Lloyd T, Carson J, Chan W, Pillai D. Rida® Gene Parasitic Stool Panel and xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel for the detection of common intestinal parasites. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2014;25(2):e23-e4 [abstract C01].
- Lungrin D, James D, Leto D, Almohri H. The prevalence of common intestinal parasitic pathogens from community patients in Ontario 2008-2012. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2014;25(2):e24 [abstract C02].
- Ravel A, Nesbitt A, Pintar K, Macarthur A, Wang HL, Marshall B, Pollari F. Epidemiological and clinical description of the top three reportable parasitic diseases in a Canadian community. *Epidemiol Infect* 2013;141(2):431-42.
- R-Biopharm AG. RIDA® GENE Parasitic Stool Panel. Darmstadt, Allemagne : R-Biopharm AG; 2013. 2013-04-02. Disponible à : http://bioconsult.cz/index.php?controller=attachment&id_attachment=215.

Simons A, von Thien H, Tannich E. Evaluation of a novel RIDA®GENE Parasitic Stool Panel assay for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* and *Dientamoeba fragilis* in stool specimen [abstract T71]. 29th Clinical Virology Symposium; Daytona Beach, FL; 26 avril-1er mai 2013. Pan American Society for Clinical Virology (PASCV); 2013. Disponible à : http://pascv.ivdnews.net/public/show_abstract/1373.html.

Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol* 2011;49(1):257-62.

Stark DJ, Beebe N, Marriott D, Ellis JT, Harkness J. *Dientamoebiasis*: Clinical importance and recent advances. *Trends Parasitol* 2006;22(2):92-6.

Ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(9):1045-53.

Van Lieshout L et Verweij JJ. Newer diagnostic approaches to intestinal protozoa. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23(5):488-93.

Vesey CJ et Peterson WL. Review article: The management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13(7):843-50.