

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 D^r 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-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;

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).

- **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 décélérer 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 %

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.

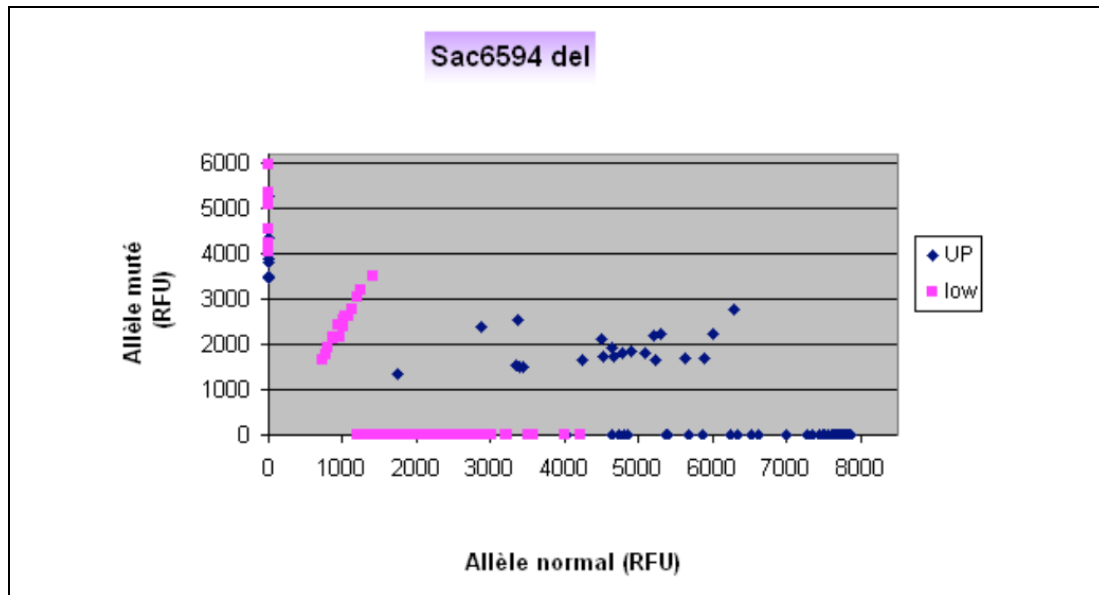
⁵ Les données de validation ont été fournies séparément pour chaque gène au moyen des formulaires d'ajout d'analyse tels que demandés par le MSSS à l'automne 2014. Les Dr François Rousseau, M.D., FRCPC, médecin biochimiste du CHU de Québec, et le Dr Grant Mitchell, M.D., FRCPC, médecin généticien du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

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.

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

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).

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 Mésappariements 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	Kirsten <i>et al.</i> , 2007
	S.o.	1	Oui	

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.

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.

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

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].

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].

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

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

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. 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

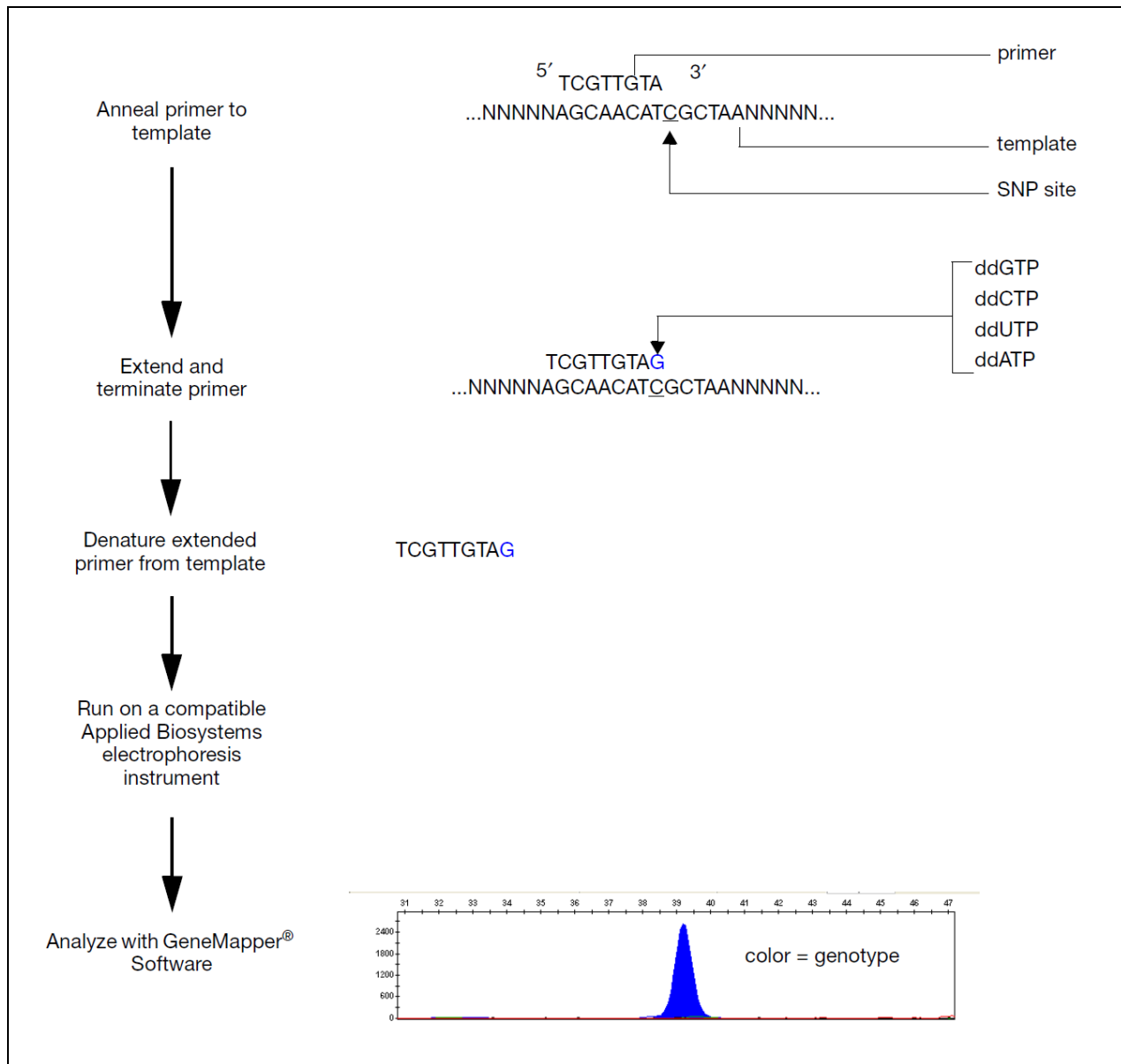
- Applied Biosystems. SNaPshot® Kit Analysis Getting Started Guide: GeneMapper® Software Version 4.1. Foster City, CA : Applied Biosystems; 2009. Disponible à : https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_070182.pdf.
- Bartlett DC, Lloyd C, McKiernan PJ, Newsome PN. Early nitisinone 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 saccin 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, B dard 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 saccin 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 sartin 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.