

JUIN 2017

AVIS

Analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* par séquençage de nouvelle génération

Transmission au ministre : 28 avril 2017
Publication officielle : 27 juin 2017

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

ANALYSE DU PROFIL MUTATIONNEL DU GÈNE *CFTR* PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (RÉFÉRENCE – 2016.03.003)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur :** Centre universitaire de santé McGill (CUSM)
- 1.2 Date de transmission de l'avis au ministre :** 28 avril 2017
- 1.3 Date de publication de l'avis :** 27 juin 2017

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information 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 Rosenblatt et le D^r Cédric Yansouni n'ont pas participé aux délibérations et se sont retirés au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

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

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

- D^r François-Pierre Counil, (pneumologue pédiatre, CHUS)
- D^r Sébastien Lévesque (médecin généticien, CHUS)

2 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

2.1 Nom de l'analyse

Analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* par séquençage de nouvelle génération (NGS, de l'anglais *next generation sequencing*).

2.2 Description brève de l'analyse et précisions techniques et cliniques

L'analyse proposée consiste à effectuer le séquençage des régions codantes du gène *CFTR* au moyen d'une approche à très haut débit afin d'identifier les mutations responsables de la fibrose kystique et des autres pathologies associées à ce gène. Le NGS fait référence aux différentes plateformes de séquençage qui permettent d'obtenir la séquence de plusieurs gènes simultanément. Cette technologie est caractérisée par un rendement de lecture très élevé, comparativement à la méthode de séquençage traditionnelle Sanger. Le NGS est

réalisé en trois étapes principales : la préparation de l'ADN génomique et de la librairie (ADN fragmenté), le séquençage et l'analyse des variants. Plusieurs plateformes de NGS utilisant des technologies et des chimies différentes sont offertes sur le marché. Pour le séquençage du gène *CFTR*, la plateforme MiSeq (Illumina^{MC}) sera utilisée.

La technique de séquençage utilisée par la plateforme MiSeq¹, aussi appelée séquençage par synthèse, repose sur l'amplification des fragments d'ADN sur un support solide suivi d'un séquençage par synthèse chimique de l'ADN préalablement amplifié. Une librairie de fragments d'ADN est d'abord générée. Les deux extrémités des fragments d'ADN sont liées à une séquence adaptatrice, hybridés à la surface d'un support solide puis amplifiés en grappes par PCR pour produire jusqu'à 1 000 copies de chacun des fragments d'ADN. Le séquençage est par la suite réalisé par l'incorporation de désoxynucléotides fluorescents (dNTP marqués) qui sont clivés enzymatiquement pour permettre l'incorporation du désoxynucléotide suivant. La fluorescence émise par chacune des grappes de fragments est captée. Après plusieurs cycles d'incorporation de nucléotides, les séquences obtenues sont alignées à une séquence de référence à l'aide d'un logiciel bio-informatique. L'analyse des variants détectés est effectuée à l'aide de logiciels utilisant des paramètres et des filtres bien définis.

Les régions codantes et les jonctions intron-exon du gène *CFTR* seront séquencées par NGS, afin de détecter les variants nucléotidiques simples, les petites insertions ou délétions ainsi qu'une mutation intronique située dans l'intron 22 (c.3717+12191C>T)². La présente analyse permettra de confirmer, chez les individus symptomatiques et les nouveau-nés, un diagnostic de fibrose kystique ou d'une pathologie liée au gène *CFTR*, mais également d'effectuer un test de porteur (planification familiale), un diagnostic prénatal pour les grossesses en cours avec statut de porteur connu des parents et permettre l'utilisation de traitements ciblés. Par ailleurs, le test sera utilisé pour confirmer un diagnostic, et ce, en combinaison à d'autres tests diagnostiques et à l'évaluation des symptômes cliniques et de l'histoire familiale.

2.3 Modalités d'administration du test

La trajectoire prévue est la même que pour l'analyse existante de 71 mutations du gène *CFTR* (code 55220). Le prélèvement sanguin est effectué dans un centre de prélèvement de la province puis acheminé au laboratoire de diagnostic moléculaire où l'ADN est extrait et le séquençage effectué. Les résultats de cette analyse sont qualitatifs et font l'objet d'un compte rendu écrit, signé par un médecin agréé.

Le temps de réponse, de la réception de l'échantillon sanguin au compte rendu, est de 4 semaines, ou de 2 semaines pour les cas urgents (ex. grossesses en cours).

Selon le demandeur, le NGS du gène *CFTR* est indiqué en l'absence de mutation(s) familiale(s) connue(s) ou, lorsque les mutations familiales connues ne permettent pas d'établir un diagnostic définitif (en présence d'un cas hétérozygote pour une mutation familiale connue et dont on voudrait connaître l'autre mutation). Chez les patients symptomatiques, la détection d'une variation pathogène, probablement pathogène ou d'un

¹ Illumina. An introduction to next-generation sequencing technology. San Diego, CA : Illumina, Inc.; 2016. Disponible à : http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (consulté le 14 novembre 2016).

² Cette mutation intronique a été détectée chez une patiente d'origine pakistanaise (homozygote pour l'haplotype B) présentant un phénotype léger de fibrose kystique et une concentration normale de chlorure dans la sueur. Cystic Fibrosis Mutation Database [site Web], disponible à : <http://www.genet.sickkids.on.ca/MutationDetailPage.external?sp=518> (consulté le 28 novembre 2016).

variant de signification inconnue (VUS, de l'anglais *variant of unknown significance*) sera confirmée par séquençage Sanger bidirectionnel à partir d'une nouvelle dilution d'ADN. En présence d'une mutation familiale connue, celle-ci sera analysée par séquençage direct de type Sanger (tableau 1). Pour le test de porteur, seuls les variants pathogènes ou probablement pathogènes seront rapportés. Chez les patients dont le NGS ne révèle aucune mutation du gène *CFTR*, une approche complémentaire telle que la MLPA (de l'anglais, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) sera utilisée afin de détecter un changement du nombre de copies du gène. La MLPA sera également utilisée pour vérifier la présence de grandes délétions chez les patients apparemment homozygotes pour des mutations causales.

Tableau 1 Utilisation prévue de l'analyse du gène *CFTR*

UTILISATION DU TEST	PATIENTS CIBLÉS	MUTATION	TECHNIQUE
Confirmation diagnostique (individus symptomatiques)	Suspicion FK	Inconnue	NGS
		Connue	Sanger
Test de porteur (individus asymptomatiques)	Diagnostic pré-conception (planification familiale)	Inconnue	NGS
	Diagnostic prénatal (grossesse en cours avec statut de porteur connu des parents)	Connue	Sanger (liquide amniotique ou biopsie villosités choriales)

Abréviations : FK : fibrose kystique; NGS : séquençage de nouvelle génération (de l'anglais *next generation sequencing*)

2.4 Société ou concepteur

Protocole maison

2.5 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

La méthode proposée n'a pas été homologuée par Santé Canada ou la FDA. Par contre, une méthode très similaire offerte par Illumina^{MC} (MiSeqDx Cystic Fibrosis clinical sequencing assay) a été homologuée par la FDA en 2014 (no. K132750). Selon le demandeur, cette dernière utilise une trousse de séquençage TruSeq Amplicon au coût de 1 000 \$ / patient.

2.6 Valeur pondérée : 275,08 (excluant le séquençage Sanger de confirmation)

3 CONTEXTE

3.1 Patients ciblés

Patients et familles à risque d'être atteints de fibrose kystique ou d'une autre pathologie associée au gène *CFTR* d'après l'histoire familiale ou les manifestations cliniques, comme le recommande le Canadian College of Medical Geneticists (CCMG) [2011].

3.2 Description de la maladie visée

La fibrose kystique est une maladie à transmission autosomique récessive causée par des mutations dans le gène régulateur de la perméabilité transmembranaire (*CFTR*, de l'anglais *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [Michl *et al.*, 2016]. Cette maladie se

manifeste selon divers phénotypes et inclut la maladie pulmonaire, l'insuffisance pancréatique et l'iléus méconial (occlusion intestinale du nouveau-né) [Biazotti *et al.*, 2015]. Les formes atypiques de fibrose kystique (aussi appelées maladies associées au gène *CFTR*) sont entre autres l'agénésie bilatérale du canal déférent (CBAVD, de l'anglais *congenital bilateral absence of the vas deferens*) causant l'azoospermie obstructive et l'infertilité masculine, la pancréatite récurrente aiguë, la pancréatite chronique et la bronchiectasie disséminée [Bombieri *et al.*, 2011; Castellani *et al.*, 2008].

Selon le Registre canadien sur la fibrose kystique³, en 2014, on dénombrait 4 128 personnes atteintes, dont 1 179 au Québec. Au Canada, 120 personnes ont reçu un diagnostic de fibrose kystique en 2014. À noter que l'incidence de la fibrose kystique varie selon l'ethnicité⁴. Elle est plus commune dans les populations caucasiennes, où un nouveau-né sur 3 500 reçoit un diagnostic de fibrose kystique.

Actuellement, on compte 2 011 variations du gène *CFTR*⁵. Parmi celles-ci, 127 sont des variations pathogènes clairement associées à la maladie [Michl *et al.*, 2016; Sosnay *et al.*, 2013]. Parmi ces 127 variations pathogènes, 23 comptent pour 87 % de toutes les anomalies du gène *CFTR* détectées chez les patients atteints de fibrose kystique dite classique [Michl *et al.*, 2016] et leur inclusion dans les panels de dépistage pour identifier les individus porteurs est recommandée par l'American College of Medical Genetics (ACMG) [Watson *et al.*, 2004] et l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) [2011].

La présence de deux variations pathogènes dites classiques (variants de classe I-III) du gène *CFTR* est généralement associée au phénotype classique de la fibrose kystique tandis que les autres pathologies associées au gène *CFTR* sont causées par la combinaison d'une variation avec une fonction résiduelle du gène *CFTR* (variants de classe IV et V, allèle 5T) et d'une variation pathogène classique ou de deux variations avec fonction résiduelle [Michl *et al.*, 2016]. Certains polymorphismes tels que l'allèle 5T (séquence répétitive du nucléotide T, de l'anglais *poly-T tract*) et les répétitions TG (séquences homopolymères des nucléotides T et G) situés dans l'intron 8 sont également fréquemment associés à l'infertilité masculine [Giuliani *et al.*, 2010; Tamburino *et al.*, 2008]. De plus, l'allèle 5T, précédé par une répétition TG plus ou moins longue, module l'effet de la mutation p.F508del du gène *CFTR*, ce qui génère un risque variable de développer la forme classique de la fibrose kystique [Lebo et Grody, 2007].

Près de 90 % des Canadiens atteints de fibrose kystique (dont 92,2 % sont caucasiens) sont porteurs d'au moins une copie de la mutation la plus courante à l'origine de la fibrose kystique, la mutation p.F508del³, dont la fréquence se situe à 66 % dans les populations caucasiennes⁶. Environ la moitié des patients atteints sont porteurs homozygotes de la mutation p.F508del, le génotype associé à la forme classique de la maladie caractérisé par une augmentation des électrolytes dans la sueur, une insuffisance pancréatique et une

³ Fibrose kystique Canada. Registre canadien sur la fibrose kystique : rapport annuel de 2014. Toronto, ON : 2016. Disponible à : <https://cysticfibrosis.uberflip.com/i/707616-le-registre-canadien-sur-la-fibrose-kystique> (consulté le 18 décembre 2016).

⁴ Baby's First Test. Cystic fibrosis [site Web]. Disponible à : <http://www.babysfirsttest.org/newborn-screening/conditions/cystic-fibrosis-cf> (consulté le 18 décembre 2016).

⁵ Cystic Fibrosis Mutation Database (*base de données CFTR*) [site Web], disponible à : <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html> (consulté le 24 janvier 2017).

⁶ Most common CFTR mutations in the world [site Web], disponible à : <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/resource/Table1.html> (consulté le 18 décembre 2016).

obstruction pulmonaire majeure⁷. Par ailleurs, 40 % des patients sont hétérozygotes composés avec p.F508del sur un allèle et une autre mutation du gène *CFTR* sur l'autre allèle et 10 % présentent une mutation autre que la p.F508del sur chaque allèle⁸.

3.3 Nombre prévu d'analyses et de patients visés

Selon le demandeur, environ 1 000 tests par an sont actuellement réalisés (945 en 2015-2016) à l'aide du panel de 71 mutations du gène *CFTR*, qui sera remplacé par le séquençage complet du gène en NGS. Pour le Québec, le nombre de tests annuel attendu dans les trois prochaines années est d'environ 3 000. Par ailleurs, une dizaine de cas de pancréatite chronique héréditaire potentiellement associée au gène *CFTR* font l'objet d'une analyse mutationnelle chaque année⁹.

3.4 Spécialités médicales concernées

Génétique, pédiatrie, pneumologie, obstétrique et gynécologie, médecine interne

3.5 Brève description de la situation actuelle

Chez la majorité des patients, les tests de première ligne utilisés pour le diagnostic de la fibrose kystique sont la détermination de la concentration en chlorure dans la sueur et le dosage de la trypsine immunoréactive (IRT, de l'anglais *immunoreactive trypsinogen*) dans le plasma [Brewington et Clancy, 2016]. Chez le nouveau-né, une concentration en chlorure inférieure à 30 mmol/l (40 mmol/l chez l'enfant et l'adulte¹⁰) est généralement considérée comme normale (Atlas 2016⁸, [Michl *et al.*, 2016]). Par ailleurs, une concentration supérieure ou égale à 60 mmol/l (deux tests positifs sur deux jours différents) en présence de deux variations pathogènes du gène *CFTR* sur deux allèles distincts permet d'obtenir un diagnostic clair de fibrose kystique [Brennan et Schrijver, 2016; Michl *et al.*, 2016]. Dans certains cas, le diagnostic est équivoque, particulièrement lorsque des VUS sont détectés ou lorsque la concentration en chlorure se situe entre 30 et 60 mmol/l [Michl *et al.*, 2016].

Actuellement, la recherche de mutations dans le gène *CFTR* est réalisée au CUSM à l'aide de la trousse de génotypage Luminex xTAG Cystic Fibrosis qui couvre 71 mutations incluant les 23 mutations recommandées par l'ACMG, 16 mutations européennes et 32 mutations nord-américaines¹¹. De plus, une mutation fréquente dans la population québécoise, la p.S489X [De Bie *et al.*, 2012] est recherchée par TAAN (test d'amplification des acides nucléiques). Si le résultat de l'analyse de ces 72 mutations s'avère négatif ou non-concluant, le séquençage complet du gène peut être effectué au SickKids de Toronto selon le niveau de suspicion et l'indication clinique.

Le séquençage complet du gène *CFTR* n'est pas offert au Québec. L'analyse du gène *CFTR* par NGS pour la fibrose kystique et les maladies associées à ce gène est disponible à certains endroits aux États-Unis, notamment chez Ambry Genetics¹² et Fulgent Diagnostics¹³, ainsi

⁷ Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Mucoviscidose et gène CFTR [site Web]. Disponible à : <http://atlasgeneticsononcology.org/Educ/CisticFibFr2.html> (consulté le 18 novembre 2016).

⁸ *Ibid.*

⁹ Communication électronique de M. Jean-Baptiste Rivière du CUSM (29 novembre 2016).

¹⁰ CFTR2 [site Web], disponible à : <https://www.cftr2.org/resources> (consulté le 22 décembre 2016).

¹¹ Luminex. xTAG Cystic Fibrosis [site Web]. Disponible à : <https://www.luminexcorp.com/clinical/genetic-testing/cystic-fibrosis/product-details/> (consulté le 24 février 2017).

¹² Ambry Genetics. Cystic fibrosis testing [site Web]. Disponible à : <http://www.ambrygen.com/tests/cystic-fibrosis-testing> (consulté le 12 janvier 2017).

¹³ Fulgent Diagnostics. CFTR single gene [site Web]. Disponible à : <https://www.fulgentgenetics.com/test/CFTR> (consulté le 12 janvier 2017).

qu'au Canada (SickKids, Toronto¹⁴ et CEN4GEN Institute, Edmonton¹⁵). La clinique Mayo (USA) offre le séquençage du gène *CFTR* lors d'une suspicion de fibrose kystique, en présence d'une ou d'aucune des mutations courantes ou dans les cas de présentation atypique de fibrose kystique. Il est toutefois mentionné que le séquençage du gène *CFTR* n'est pas utilisé d'emblée pour un test de porteur ou pour le diagnostic initial. Il est plutôt utilisé lorsque le résultat de l'analyse du panel de 106 mutations est négatif ou non concluant¹⁶.

3.6 Données médico-administratives

La version 2016-2017 du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* (ci-après nommé *Répertoire*) contient les codes d'analyses suivants :

- Fibrose kystique (CFTR) – séquençage mutation individuelle (55218) CUSM
- Fibrose kystique (CFTR) – panel de 71 mutations (55220) CUSM
- Fibrose kystique (CFTR) – TAAN mutation individuelle (55222) CUSM et CHU de Québec

La base de données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) concernant les analyses réalisées par les établissements du réseau et la liste des envois hors Québec (tableau 2) ont été consultés afin d'obtenir des statistiques de production.

Demandes d'analyses par les établissements du réseau en 2015-2016 :

- Code 55218 (VP : 196) : 79 demandes (total : 15 484\$)
- Code 55220 (VP : 156) : 945 demandes (total : 147 420\$)
- Code 55222 (VP : 27) : 2 861 demandes (total : 77 247\$), dont 945 par le CUSM

Tableau 2 Envois hors Québec 2014-2015

ANALYSE	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)	LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE
Séquençage <i>CFTR</i>	65	80 170	SickKids (Toronto)
	30	49 775	Ambry Genetics (USA)
	1	1 100	Molecular Genetics Laboratory (Vancouver)
Séquençage <i>CFTR</i> , <i>SPINK</i> , <i>CTRC</i> (pancréatite héréditaire)	9	19 965	Ambry Genetics (USA)
	1	2 153	Fulgent Diagnostics (USA)
Panel <i>CFTR</i> , <i>SPINK1</i> , <i>CTRC</i> , <i>PRSS1</i>	2	3 754	Fulgent Diagnostics (USA)

¹⁴ SickKids. Cystic fibrosis: CFTR sequencing [site Web]. Disponible à : <http://www.sickkids.ca/paediatriclabmedicinems/test-catalogue/genome-diagnostics/59019.html> (consulté le 12 janvier 2017).

¹⁵ CEN4GEN Institute. Test code: 700053 [site Web]. Disponible à : <http://diagnostics.cen4gen.org/diagnostics/rapid-genetic-testing/test-code-700053/> (consulté le 12 janvier 2017).

¹⁶ Mayo Clinic. Cystic fibrosis molecular diagnostic testing algorithm. 2016. Disponible à : http://www.mayomedicallaboratories.com/it-mmfiles/Cystic_Fibrosis_Molecular_Diagnostic_Testing_Algorithm.pdf (consulté le 13 décembre 2016).

3.7 Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, les avantages de l'analyse proposée sont :

- Élimination du biais ethnique propre à tout panel de mutations du gène *CFTR*;
- Arrêt de l'utilisation du code 55220 (panel de 71 mutations) du *Répertoire*;
- Réduction du temps de réponse pour les patients suspectés de fibrose kystique mais négatifs suite à l'analyse des 71 mutations du panel utilisé actuellement;
- Cesser d'envoyer l'analyse à l'extérieur du Québec et l'offrir localement à moindre coût (275 \$ contre 1 100 \$ à Toronto);
- Obtenir un portrait de la fréquence allélique de chaque mutation au Québec.

3.8 Assurance qualité

Le laboratoire du centre demandeur indique que les contrôles spécifiques suivants permettent d'assurer la fiabilité et l'intégrité des résultats :

- PCR: la concordance des numéros des échantillons d'ADN est systématiquement vérifiée par un deuxième membre du laboratoire (signature requise). Un contrôle négatif d'amplification (sans ADN gabarit) est inclus pour chaque réaction d'amplification afin de confirmer l'absence de contamination croisée.
- Séquençage : un contrôle de séquençage (génomique du bactériophage ΦX174) permet de vérifier la qualité et l'intégrité du séquençage. D'autres mesures permettent de vérifier la qualité du séquençage, dont la représentation relative des données de chaque patient (par code-barres moléculaires), le pourcentage de bases et de lectures de bonne qualité (Q30), la profondeur de séquençage et le nombre de variations génétiques par patient.
- Confirmation de mutations: toute mutation pertinente est confirmée par séquençage Sanger bidirectionnel à partir d'une nouvelle dilution d'ADN. Si applicable, le caractère homozygote ou hétérozygote composé des mutations est vérifié par le génotypage de ces mutations dans l'ADN des parents.

Le laboratoire du centre demandeur participe au programme de contrôle de qualité externe du College of American Pathologists (CAP) par le contrôle semestriel de mutations du gène *CFTR*. La participation au programme du CAP portant sur le séquençage de nouvelle génération ainsi que l'analyse d'une lignée cellulaire présentant des mutations connues du gène *CFTR* est également prévue.

3.9 Remplacement d'un autre test

La présente analyse permettrait de remplacer les analyses suivantes actuellement incluses au *Répertoire* :

- panel de 71 mutations (code 55220), analyse désignée au CUSM
- analyse de la mutation québécoise p.S489X par TAAN (code 55222); ce code sera par contre utilisé pour l'analyse d'une délétion de 21 kb (c.54-5940_273+10250del21kb)

4 DONNÉES PROBANTES

4.1 Valeur diagnostique

L'analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* permettra de confirmer un diagnostic de fibrose kystique ou d'une pathologie associée à ce gène, et d'identifier les individus porteurs de variations pathogènes pouvant comporter un risque pour leur descendance.

Biais ethnique

Les trousseaux commerciaux permettant la détection d'un panel restreint des mutations causales les plus fréquemment associées à la fibrose kystique, sont biaisées pour l'identification de porteurs chez les individus d'origine européenne [Lim *et al.*, 2016]. Par ailleurs, chez les caucasiens, le panel de 23 mutations recommandé par l'ACMG et l'ACOG, couvre 90,7 % des mutations détectées, le 9,3 % restant étant distribué en 44 mutations non incluses dans le panel. En comparaison, l'utilisation du panel de 23 mutations pour les personnes de races noire, hispanique et asiatique couvre 77,3 %, 73,1 % et 63 % des mutations détectées respectivement [Schrijver, 2011]. Le séquençage de l'ensemble des régions codantes du gène *CFTR* permettrait d'éliminer ce biais ethnique et d'augmenter le rendement diagnostique, particulièrement chez les individus asymptomatiques ou présentant un phénotype atypique.

Confirmation diagnostique

La contribution de l'analyse du gène *CFTR* pour la confirmation d'un diagnostic incertain de fibrose kystique chez des patients présentant un phénotype atypique ou subtil a été évaluée par Dal'Maso et ses collaborateurs [2013]. Cette étude transversale incluait 37 patients âgés de 14 ans ou plus, présentant des caractéristiques phénotypiques de fibrose kystique avec ou sans confirmation par le test de chlorure dans la sueur. Les individus présentant un phénotype subtil avaient reçu un diagnostic confirmé par les résultats du test de chlorure dans la sueur, une maladie pulmonaire bénigne sans insuffisance pancréatique, tandis que ceux présentant un phénotype atypique avaient des signes cliniques caractéristiques de la fibrose kystique sans confirmation par le test de chlorure. L'ensemble des 27 exons et des jonctions intron-exon ainsi que l'intron 8 du gène *CFTR* ont été analysés par séquençage Sanger. Au moins une mutation a été détectée chez 11 patients, dont la mutation p.F508del présente chez cinq d'entre eux. Le séquençage du gène *CFTR* a contribué au diagnostic définitif de fibrose kystique chez quatre (10,8 %) des 37 patients chez qui on a détecté deux mutations (dont un avec trois mutations). De ces quatre patients, trois avaient un phénotype atypique et un avait un phénotype subtil. Chez les sept (18,9 %) autres patients, une seule mutation a été détectée, tandis qu'aucune mutation n'a été détectée chez 26 patients (70,3 %). Les auteurs concluent que l'analyse des régions codantes du gène *CFTR* apporte une contribution limitée au diagnostic des patients avec suspicion d'une forme atypique ou subtile de fibrose kystique.

L'étude de Straniero et ses collaborateurs [2016] avait pour objectif d'évaluer l'utilisation du NGS pour l'analyse du gène *CFTR* chez des patients atteints de fibrose kystique dont le diagnostic était non concluant en dépit d'une évaluation génétique initiale, ou sans évaluation génétique. Le NGS a été réalisé à l'aide de la plateforme HiSeq2000 (Illumina^{MC}) dans un groupe de 23 patients atteints de fibrose kystique et d'un porteur hétérozygote

d'une délétion de 21 paires de bases, tous d'origine caucasienne, référés sur une période de cinq ans (tableau 3). Parmi ces 24 patients, 21 avaient obtenu une évaluation génétique dont 4 un diagnostic confirmé, ultérieurement utilisés comme témoins pour l'analyse NGS. De plus, trois patients n'ayant pas reçu d'évaluation génétique ont été inclus dans cette analyse.

Tableau 3 Analyse du gène *CFTR* par NGS dans les cas de diagnostic non concluant de fibrose kystique

ÉCHANTILLONS (n = 24)	ÉVALUATION GÉNÉTIQUE INITIALE*	GÉNOTYPE	RÉSULTAT NGS
4 (témoins)	Concluant	3 hétérozygotes composés	Mutations confirmées
		1 porteur hétérozygote (délétion 21 pb)	
17	Non concluant	5 sans mutation identifiée	Aucune mutation
		12 hétérozygotes (dont 2 avec F508del)	2 ^e allèle causal identifié (6/11 cas)
3	Non réalisé	s.o.	5 mutations connues

Source : Straniero *et al.*, 2016.

Abréviations : diag. : diagnostic; NGS : séquençage de nouvelle génération; s.o. : sans objet

* Séquençage Sanger et analyse du nombre de copies

Le NGS a permis d'identifier tous les variants pathogènes précédemment détectés lors de l'évaluation de routine (18 allèles pour un total de 13 mutations distinctes) incluant la délétion de 21 pb chez le témoin porteur hétérozygote. De plus, le NGS a permis d'identifier : trois mutations non détectées par Sanger et déjà rapportées dans la littérature comme étant associées à la fibrose kystique, une grande délétion, cinq mutations connues chez les trois patients non dépistés et 22 variants introniques de signification indéterminée. Parmi les 11 patients hétérozygotes avec diagnostic non concluant analysés avec succès, le NGS a permis de détecter la seconde mutation causale chez 6 (54,5 %) d'entre eux. Par ailleurs, à la suite de cette analyse par NGS, cinq patients sont demeurés sans mutation et la seconde mutation du gène *CFTR* n'a pas été détectée chez six autres patients. Sur la base de ces résultats, les auteurs proposent une approche en deux temps pour le diagnostic génétique de la fibrose kystique, soit un dépistage de la mutation p.F508del suivi du NGS pour les cas négatifs.

Diagnostic des pathologies associées au gène *CFTR*

L'utilité du séquençage complet du gène *CFTR* a été évaluée chez 99 patients atteints d'une pathologie associée au gène *CFTR* incluant 59 cas d'agénésie bilatérale du canal déférent (CBAVD, de l'anglais *congenital bilateral absence of the vas deferens*), 21 cas de pancréatite récurrente (PR) et 19 cas de bronchiectasie disséminée (BD) [Amato *et al.*, 2012]. L'ensemble des 27 exons et les jonctions intron-exon ont été analysés par séquençage Sanger et la présence de grands réarrangements a été recherchée par MLPA. Le séquençage du gène *CFTR* a permis de détecter 28 mutations distinctes dans 144 des 198 allèles (72,7 %) réparties sur 14 exons et 5 introns, soit 79,7 % des allèles CBAVD, 66,7 % des allèles PR et 57,9 % des allèles BD. Parmi ces 28 mutations, la mutation p.F508del était présente dans 30 (15,2 %) des 198 allèles et une nouvelle mutation (1525-1delG) a été détectée dans trois cas de CBAVD et un cas de PR. Aucun grand réarrangement n'a été identifié. Selon les auteurs,

11 mutations identifiées dans cette analyse et présentes dans 14 % des allèles des patients atteints d'une pathologie associée au gène *CFTR* ne sont pas incluses dans les panels restreints utilisés dans la plupart des études antérieures. Ainsi, les auteurs concluent que l'analyse du gène *CFTR* est importante dans l'évaluation des patients atteints d'une pathologie associée à ce gène.

Une étude de cohorte rétrospective menée par Thauvin-Robinet et ses collaborateurs [2013] avait pour objectif d'étudier le génotype et le phénotype des patients avec CBAVD qui présentaient deux mutations du gène *CFTR* dont la p.R117H¹⁷ sur au moins un allèle. Une analyse du gène *CFTR* avait été réalisée chez 179 patients en raison d'une CBAVD (136/179, 76 %), de symptômes respiratoires (18/179, 10 %), de l'histoire familiale (15/179, 8 %), d'une maladie pancréatique (5/179, 3 %) ou d'une autre raison (5/179, 3 %). Un diagnostic final de CBAVD a été posé chez 83 (46,4 %) d'entre eux suite à l'analyse génétique. Un enjeu important pour les couples affectés par une CBAVD causant l'infertilité masculine est l'évaluation adéquate de leur risque de mettre au monde un enfant atteint de fibrose kystique. Une session de conseil génétique a été offerte à 60 patients avec CBAVD et leur partenaire dont 53 avaient obtenu les résultats d'analyse du gène *CFTR*. Parmi les patients avec CBAVD présentant la mutation p.R117H, six porteurs d'une variation pathogène et un porteur d'une variation avec une fonction résiduelle du gène *CFTR* (p.S1235R-T5) ont été identifiés puis informés au sujet du diagnostic préimplantatoire et prénatal (tableau 4). À la suite d'un processus de reproduction assistée, huit enfants sont nés dont quatre étaient hétérozygotes composés pour la mutation p.R117H et une variation pathogène associée à la fibrose kystique. Les auteurs mentionnent que la pénétrance de la fibrose kystique classique chez les individus porteurs des mutations p.R117H (avec poly T¹⁸) et p.F508del est de 0,03 % [Thauvin-Robinet *et al.*, 2009]. En conclusion, les auteurs soulignent l'importance d'une évaluation clinique complète chez les patients avec CBAVD porteurs d'au moins une mutation p.R117H et d'une variation pathogène du gène *CFTR*. En présence d'une variation pathogène en *trans* de la mutation p.R117H, les partenaires de ces patients devraient se voir offrir l'analyse des mutations fréquentes du gène *CFTR* et, le cas échéant, un diagnostic prénatal ou préimplantatoire.

¹⁷ La mutation R117H est la troisième mutation la plus fréquente dans les cas de CBAVD dans la population française [Ratbi *et al.*, 2007].

¹⁸ Chaque copie du gène *CFTR* contient une séquence répétitive du nucléotide T (de l'anglais, *poly-T tract*). Selon la forme poly-T présente (5T, 7T ou 9T) en *cis* avec le variant R117H, différents phénotypes sont observés (CFTR2. Variant R117H overview [site Web]. Disponible à : <https://www.cftr2.org/r117h> (consulté le 13 janvier 2017)).

Tableau 4 Génotype des patients avec CBAVD et risque de fibrose kystique ou de pathologie associée au gène *CFTR* pour leur progéniture

GÉNOTYPE DU PATIENT CBAVD *	GÉNOTYPE DE LA PARTENAIRE	OPTIONS DE FÉCONDATION	NAISSANCES VIVANTES	RISQUE ASSOCIÉ
p.F508del ; p.R177H	p.F508del	Donneur de sperme	s.o.	FK ou PA-CFTR
p.F508del ; p.R177H	p.F508del	2001 : DPN suivi d'une grossesse gémellaire	2	FK ou PA-CFTR
		2005 : DPI suivi d'une grossesse gémellaire	2+	
p.F508del ; p.R177H	p.F508del	DPI, aucune grossesse	0	FK ou PA-CFTR
p.S1235R-T5† ; p.R117H	p.L88IfsX22	2 cycles ISIC, 2 transferts d'embryon, 1 grossesse gémellaire, aucun DPN	2§	PA-CFTR
p.A455E ; p.R117H	p.G551D	Aucune grossesse spontanée ni fécondation <i>in vitro</i>	0	FK ou PA-CFTR
p.L206W ; p.R117H	p.S1235R	2 cycles ISIC, aucune grossesse, donneur de sperme	0	PA-CFTR
p.F508del ; p.R177H	p.K1177SfsX15	2001 à 2006 : 6 cycles de préimplantation, 7 transferts d'embryon, 3 grossesses (incluant une triple)	2	FK ou PA-CFTR

Source : Thauvin-Robinet *et al.*, 2013.

Abréviations : CBAVD : agénésie bilatérale du canal déférent (de l'anglais *congenital bilateral absence of the vas deferens*); DPI : diagnostic préimplantatoire; DPN : diagnostic prénatal; FK : fibrose kystique; ISIC : injection de sperme intracytoplasmique; PA-CFTR : pathologie associée au gène *CFTR*; s.o. : sans objet

* Tous les patients atteints de CBAVD sont porteurs du variant T7 en *cis* avec p.R117H

† Les deux enfants présentent le génotype p.F508del ; R117H

‡ Selon la base de données CFTR2, ce variant ne cause pas la fibrose kystique. Results for S1235R and 5T [site Web], disponible à : <https://www.cftr2.org/mutation/general/S1235R/5T> (consulté le 22 décembre 2016).

§ Les deux enfants présentent le génotype p.L88IfsX22 ; R117H

Valeur ajoutée du NGS comparativement à un panel restreint de mutations connues

L'étude de Baker et ses collaborateurs [2016] avait pour objectif d'évaluer la faisabilité de l'utilisation du NGS pour améliorer le dépistage néonatal de la fibrose kystique à partir de spécimens de sang séché sur filtre. La plateforme MiSeqDx a été utilisée pour le séquençage des régions codantes et des jonctions intron-exon du gène *CFTR*. Parmi les données générées lors de l'analyse, seulement celles attribuées aux 162 mutations¹⁹ pour lesquelles l'impact clinique a été caractérisé via le programme CFTR2²⁰ ont été révélées. Le panel utilisé comprend des mutations causant la fibrose kystique, mais aussi des variants *CFTR* associés à des conséquences phénotypiques variables [Sosnay *et al.*, 2013].

¹⁹ Panel de 162 mutations fait sur mesure selon les spécifications du client. Le panel développé pour la fibrose kystique par la compagnie Illumina^{MC} sur la plateforme MiSeqDx incluant 139 variants est par ailleurs disponible commercialement.

²⁰ Le programme CFTR2 (de l'anglais, *The Clinical and Functional Translation of CFTR*) est une initiative internationale menée par une équipe de chercheurs et de cliniciens et supportée par la Fondation américaine de fibrose kystique qui vise à fournir des informations fonctionnelles et cliniques sur les mutations du gène *CFTR* (<http://www.cftr2.org/>) [Sosnay *et al.*, 2013].

Une étape de validation a d'abord été effectuée avec 67 spécimens comprenant 48 mutations distinctes connues du gène *CFTR* incluses dans le panel de 162 mutations. Une mutation a été détectée dans tous les spécimens analysés et toutes les mutations concordaient à 100 % avec celles qui avaient été détectées précédemment.

Par la suite, une étude rétrospective a été réalisée parmi les nouveau-nés considérés positifs lors du dépistage de routine selon la valeur quotidienne de l'IRT et la présence d'une ou deux mutations du gène *CFTR* parmi les 23 mutations recommandées par l'ACMG. Parmi les 184 patients présentant une mutation, le NGS a été réalisé chez les 165 nouveau-nés pour lesquels l'évaluation clinique et/ou les résultats du test de la sueur avaient été obtenus (tableau 5). Aucun variant pathogène supplémentaire n'a été détecté chez 151 nouveau-nés qui avaient par ailleurs un résultat normal au test de chlorure dans la sueur (< 30 mmol/l). Chez cinq nouveau-nés dont le test de la sueur était anormal, le NGS n'a pas permis de détecter la deuxième variation pathogène. Un test de confirmation par Sanger lors du suivi de dépistage néonatal a révélé une mutation chez deux d'entre eux. Toutefois, l'information transmise par les auteurs porte à croire que les trois autres nouveau-nés n'ont pas été testés par séquençage Sanger. Une mutation supplémentaire a été détectée chez 9 nouveau-nés dont 5 qui se révélaient en fait porteurs de deux mutations causant la fibrose kystique et 4 étant porteurs de variations avec conséquence phénotypique variable. Dans l'ensemble, suite au NGS six nouveau-nés ont reçu un diagnostic de fibrose kystique classique.

La valeur prédictive positive (VPP) du dépistage de routine IRT/ADN déterminant la présence des 23 mutations recommandées par l'ACMG suite à l'analyse de l'IRT était de 7,3 %. Lorsque les 165 échantillons dont une mutation avait été détectée étaient analysés par NGS au moyen du panel de 162 mutations, une VPP de 77,8 % aurait été obtenue lorsqu'un dépistage positif est défini comme étant la présence de deux variations causales. Cependant, la sensibilité de l'algorithme IRT/ADN serait diminuée de 50 % pour les cas de fibrose kystique classique lorsqu'un dépistage positif est défini par deux mutations causales en raison de la présence de mutations peu fréquentes détectées chez cinq patients atteints de fibrose kystique classique non incluses dans le panel de 162 mutations. Les auteurs concluent entre autres que l'algorithme de dépistage IRT/NGS permet de confirmer plus rapidement un diagnostic présumé de fibrose kystique et de potentiellement réduire le nombre de tests de chlorure en raison du risque extrêmement faible de fibrose kystique chez les enfants qui ont une seule mutation du gène *CFTR*.

Tableau 5 Séquençage du gène *CFTR* pour le dépistage néonatal de la fibrose kystique

DÉPISTAGE NÉONATAL Panel 23 mutations de l'ACMG (n)	NGS Panel 162 mutations (n)	TEST SUEUR (n)	DIAGNOSTIC (n)
2 mutations (8) 1 mutation (184)	Seconde mutation non détectée (156)	normal (151)	ND
		anormal (5) §	FK (3) SM-CFTR (2)
	Seconde mutation détectée (9) *	normal (3) † anormal (3) limite (1) ND (2)	FK (3) SM-CFTR (4) Porteur (2) ‡

Source : Baker *et al.*, 2016.

Abréviations : FK : fibrose kystique; SM-CFTR : syndrome métabolique associé au gène *CFTR*; n : nombre de patients; ND : information non disponible; NGS : séquençage de nouvelle génération (de l'anglais *next generation sequencing*)

* Incluant 5 patients dont la mutation supplémentaire était considérée causale et 4 patients dont les mutations détectées ont un impact variable sur la maladie (non classées comme causales). Un de ces 4 patients avait un résultat anormal du test de chlorure dans la sueur et trois un résultat normal.

† Pour un de ces trois patients, le résultat du premier test de chlorure dans la sueur était de 11 mmol/l et le second test n'a pas pu être effectué en raison d'une quantité insuffisante de sueur.

‡ Chez ces deux cas, le NGS a permis de détecter une mutation ayant un impact variable sur la maladie en plus de la variation pathogène p.F508del détectée lors du dépistage.

§ Chez deux de ces patients, les mutations ont été identifiées au moyen d'un test de confirmation par Sanger lors du suivi.

4.2 Valeur pronostique

La présente analyse n'a pas pour objectif d'évaluer le pronostic associé au profil mutationnel du gène *CFTR* chez les patients atteints de fibrose kystique ou d'une pathologie associée à ce gène.

4.3 Valeur thérapeutique

Deux options thérapeutiques sont actuellement disponibles pour le traitement de la fibrose kystique relativement au profil mutationnel du gène *CFTR* : l'ivacaftor et la combinaison lumacaftor-ivacaftor. L'ivacaftor (Kalydeco^{MC}, Vertex Pharmaceuticals) permettrait d'améliorer le transport des ions chlorure à travers les canaux CFTR en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux tandis que lumacaftor permettrait d'augmenter la quantité de protéines CFTR à la surface cellulaire [Moss *et al.*, 2015; Wainwright *et al.*, 2015].

Ivacaftor

Ivacaftor (Kalydeco^{MC}, Vertex Pharmaceuticals), est approuvé par Santé Canada²¹ pour le traitement de la fibrose kystique chez les patients âgés de 2 ans et plus qui ont la mutation p.G551D, p.G178R, p.S549N, p.S549R, p.G551S, p.G1244E, p.S1251N, p.S1255P, p.G1349D ou p.G970R, et chez les patients âgés de 18 ans et plus qui ont la mutation p.R117H.

Ce médicament n'est toutefois pas remboursé au Québec. En février 2016²², l'INESSS a recommandé au ministre de ne pas inscrire Kalydeco^{MC} sur les listes des médicaments pour le traitement des personnes souffrant de fibrose kystique et étant porteuses de la mutation

²¹ La monographie de Kalydeco^{MC} est disponible en accédant à la Base de données sur les produits pharmaceutiques de Santé Canada à : https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00033357.PDF (consultée le 7 décembre 2016).

²² INESSS. Kalydeco^{MC} – Fibrose kystique. Février 2016. Disponible à : http://www.INESSS.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2016/Kalydeco_2016_02_cav.pdf (consulté le 26 janvier 2017).

G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N, S549R ou G970R, car il ne satisfait pas au critère de la valeur thérapeutique. Pour les personnes souffrant de fibrose kystique et étant porteuses de la mutation G551D, il a été recommandé au ministre de ne pas inscrire Kalydeco^{MC} sur les listes de médicaments à moins que certaines conditions soient respectées.

Lumacaftor-Ivacaftor

Lumacaftor-Ivacaftor (Orkambi^{MC}, Vertex Pharmaceuticals) est approuvé par Santé Canada²³ pour le traitement de la fibrose kystique chez les patients âgés de 12 ans et plus qui sont homozygotes pour la mutation p.F508del du gène *CFTR*.

Ce médicament n'est toutefois pas remboursé au Québec. En octobre 2016²⁴, l'INESSS a recommandé au ministre de ne pas inscrire Orkambi^{MC} sur les listes des médicaments car il ne satisfaisait pas au critère de la valeur thérapeutique pour le traitement de la fibrose kystique chez les patients qui sont homozygotes pour la mutation p.F508del du gène *CFTR*.

À la suite de la réception d'une demande de réévaluation par le fabricant, Orkambi^{MC} est présentement en cours d'évaluation et fera l'objet d'une recommandation en juin 2017.

4.4 Validité analytique

Dans le contexte d'un test de porteur et du diagnostic néonatal, trois études de validation analytique du NGS pour le gène *CFTR* à l'aide de la plateforme MiSeq (Illumina^{MC}) ont été retenues [Lefterova *et al.*, 2016; Pagin *et al.*, 2016; Loukas *et al.*, 2015].

L'efficacité de trois méthodes de génotypage pour la détermination du statut de porteur de la fibrose kystique a été évaluée par Loukas et ses collaborateurs [2015]. Il s'agit d'une étude qui visait à comparer le NGS à deux panels permettant la détection d'un nombre limité de mutations. À cette fin, un panel commercial (celui de 23 mutations recommandé par l'ACMG, trousse d'Abbott), une analyse partielle permettant le séquençage des exons 1 à 24 du gène *CFTR* (séquençage Sanger couvrant 92 % des séquences codantes) ainsi que la détection de la délétion des exons 2 et 3 par PCR et, le NGS via la plateforme MiSeq (Illumina^{MC}) incluant l'ensemble des régions codantes, trois mutations introniques et les grands réarrangements du gène *CFTR*, ont été utilisés.

En premier lieu, une étape de validation divisée en trois essais distincts a été menée sur 28 échantillons (incluant cinq échantillons d'ADN de lignées cellulaires) dont le génotype avait été préalablement caractérisé. De plus, un essai de reproductibilité a été réalisé au moyen de neuf échantillons sélectionnés au hasard parmi les 28 échantillons de validation. Toutes les variations pathogènes ont été identifiées et attribuées correctement, indiquant une sensibilité et une spécificité de 100 %. La reproductibilité était de 100 %. Aucune différence significative n'a été observée entre les variants détectés dans les neuf échantillons de l'essai de reproductibilité et ceux détectés pour ces mêmes échantillons dans l'essai de validation.

À la suite de la validation, deux groupes d'individus ont été inclus pour un test de porteur. Un premier groupe de 824 cas consécutifs ont été soumis au génotypage à l'aide du panel

²³ La monographie d'Orkambi^{MC} est disponible en accédant à la Base de données sur les produits pharmaceutiques de Santé Canada à : https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00033606.PDF (consultée le 7 décembre 2016).

²⁴ INESSS. Orkambi^{MC} – Fibrose kystique. Octobre 2016. Disponible à : http://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Octobre_2016/Orkambi_2016_10.pdf (consulté le 26 janvier 2017).

de 23 mutations recommandé par l'ACMG. Le second groupe incluait 188 échantillons sélectionnés au hasard parmi les échantillons négatifs du premier groupe. Ceux-ci ont été séquencés par séquençage Sanger et par NGS. À des fins diagnostiques, un groupe de 12 échantillons supplémentaires obtenus de nouveau-nés ayant un résultat d'IRT positif ont été analysés par NGS. Un total de 200 échantillons a ainsi été analysé par NGS au cours de dix essais distincts. Parmi les 824 cas du premier groupe, 22 porteurs de variations pathogènes du gène *CFTR* ont été repérés au moyen du panel de l'ACMG, dont 16 avec la mutation p.F508del. Parmi les 188 cas déclarés non porteurs avec le panel de l'ACMG, l'analyse « maison » a permis de détecter deux cas hétérozygotes supplémentaires, également détectés par NGS. De plus, le NGS a permis l'identification de deux autres porteurs comparativement à l'analyse « maison ». Les auteurs concluent que le séquençage complet du gène *CFTR* sera éventuellement utilisé par les laboratoires cliniques, et ce, préférentiellement à l'ajout de mutations à un panel existant afin d'obtenir une légère augmentation du taux de détection des porteurs.

L'étude de Lefterova et ses collaborateurs [2016] visait à développer et valider l'essai CFseq pour le séquençage de nouvelle génération du gène *CFTR* à partir de spécimens de sang séché sur filtre recueillis chez 193 nouveau-nés. De ces 193 spécimens, 142 ont été séquencés entre avril 2013 et mai 2014 par la méthode Sanger et 51, dont les variants associés à la fibrose kystique étaient connus, ont été récupérés. Suite à une amplification ciblée par PCR multiplex, le NGS a été réalisé au moyen de la plateforme MiSeq (Illumina^{MC}) pour les exons, les jonctions exon-intron et certaines régions non-codantes du gène *CFTR*. Parmi les 190 spécimens qui rencontraient les critères de qualité, 499 variants nucléotidiques simples et petites insertion-délétion (dont un hors de la région d'intérêt) ont été identifiés par séquençage Sanger et/ou par analyse mutationnelle par panel, pour un total de 111 variants uniques. Parmi ceux-ci, 16 mutations font partie des 23 mutations recommandées par l'ACMG et l'ACOG. Relativement au séquençage Sanger, une sensibilité analytique de 100 % a été obtenue par NGS (IC95 % : 99,2 % - 100,0 %), soit la détection de la totalité des 498 variants inclus dans la région d'intérêt. Par ailleurs, trois variants non suspectés dans les 190 spécimens à l'étude ont été identifiés par NGS puis par la suite confirmés par séquençage Sanger. La reproductibilité intra- et inter-essai pour l'identification des variants ainsi que la valeur prédictive positive étaient de 100 % (IC95 % : 98,3 % - 100,0 %).

Une étude de validation et de performance de l'analyse du gène *CFTR* par NGS (plateforme MiSeq, Illumina^{MC}) a été menée par Pagin et ses collaborateurs [2016] dans le but de détecter tous les variants (incluant les grands réarrangements) des régions codantes et de trois loci introniques. La validation consistait en l'analyse de 65 échantillons d'ADN préalablement caractérisés incluant 44 échantillons avec certaines des variations pathogènes les plus fréquentes et/ou potentiellement difficiles à détecter (insertion/délétion, homopolymère, variation du nombre de copies) et 21 échantillons négatifs (sans variation pathogène). Les 65 échantillons ont été séquencés lors de deux essais distincts avec une profondeur de lecture moyenne de 607X. L'ensemble des 68 variants pathogènes connus (dont un homozygote) et des variants neutres fréquents ont été identifiés à l'aide de deux systèmes bio-informatiques indépendants. Aucun variant non documenté et potentiellement pathogène n'a été identifié et aucun résultat faux positif n'a été observé, pour une sensibilité et spécificité de 100 % pour les variations uniques de séquence et les insertion/délétion.

Par la suite, un suivi de performance à long terme dans un contexte diagnostique de routine

a été réalisé. Cette analyse incluait 163 patients suspectés d'être atteints d'une forme classique ou atypique de fibrose kystique, ainsi que 94 individus asymptomatiques et 21 témoins positifs. Suite à une amplification ciblée par PCR multiplex, le NGS a été réalisé au moyen de la plateforme MiSeq (Illumina^{MC}) sur total de 278 échantillons. Les variants potentiellement pathogènes ont été confirmés par séquençage Sanger ou MLPA. Un seuil de fréquence allélique pour la détection des variants, établi à 10 % lors de la validation, a été utilisé pour les deux systèmes bio-informatiques. Les 278 échantillons ont été séquencés lors de 15 essais distincts avec une profondeur de lecture moyenne de 752X, se situant en moyenne entre 186 et 2 032 par patient. Pour les 257 patients et 21 témoins positifs, 64 variants (dont un homozygote) et 19 variants (dont un homozygote) ont été identifiés respectivement lors de l'analyse par les deux systèmes bio-informatiques. Aucun résultat faux positif n'a été observé. L'analyse de variation du nombre de copies a révélé un profil normal chez 240 patients (93,4 %), tandis que les 17 autres qui avaient un résultat limite comparativement aux témoins positifs, se sont avérés être des faux positifs lors de la vérification par MLPA. L'analyse de séquences homopolymères (TG)mTn a montré une concordance de 100 % entre le NGS et le séquençage Sanger pour les 23 échantillons et le témoin positif testés. La reproductibilité du NGS pour la détection de trois types de variants (variations uniques de séquence, variation du nombre de copies, homopolymères) évaluée lors de 14 essais distincts était de 100 %. Le témoin positif CFTRdele2_3 ajouté a été identifié avec succès dans chacun des 14 essais. De plus, les cinq variants non pathogènes et l'haplotype (TG)11T7/(TG)10T9 ont été identifiés lors des 14 essais. Les auteurs concluent que l'analyse du gène *CFTR* par NGS a montré des performances diagnostiques équivalentes au séquençage Sanger et au MLPA avec l'avantage de la détection simultanée des variations uniques de séquence et des grands réarrangements.

4.5 Données fournies par le demandeur

La trousse Luminex xTAG® Cystic Fibrosis 71 Kit v2 actuellement utilisée par le centre demandeur permet la détection de 70 sites de mutations distinctes et d'une délétion de 21 kb englobant les exons 2 et 3 du gène *CFTR*. Le NGS ne permettant pas la détection de variations du nombre de copies, cette délétion a été analysée séparément par TAAN.

L'analyse de 47 échantillons à l'aide de la trousse Luminex a permis de détecter un total de 53 mutations dont 7 indels réparties sur 31 sites. Aucune mutation n'a été détectée aux 39 autres sites couverts par la trousse Luminex.

Le NGS a permis de couvrir l'ensemble des 70 sites du panel Luminex avec une profondeur de lecture supérieure ou égale à 100 fois, pour un potentiel de détection de 3 290 mutations (47 échantillons x 70 sites). Les 53 mutations sur 31 sites détectées par Luminex l'ont été par NGS, révélant ainsi une sensibilité de détection de 100 % (IC95 : 93,3 % - 100 %). Un total de 3 237 vrais négatifs ont été obtenus par NGS pour une spécificité de 100 % (IC95 : 99,9 % - 100 %).

Le séquençage de 47 échantillons comprenant 50 sites de variants distincts préalablement identifiés et confirmés à l'aide de la trousse Luminex xTAG® Cystic Fibrosis 71 Kit v2 et/ou par séquençage direct Sanger, a été réalisé par NGS (plateforme MiSeq, Illumina^{MC}). Comparativement à la méthode de référence actuellement utilisée dans le laboratoire du centre demandeur (génotypage Luminex), le NGS a permis de détecter 75 mutations réparties sur les 50 sites de variant connus, dont 22 mutations réparties en 19 sites non couverts par le génotypage Luminex. Une sensibilité de détection de 100 % (IC95 : 92,9 % - 100 %) a été obtenue.

5 IMPACTS BUDGÉTAIRES

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* par séquençage de nouvelle génération (NGS, de l'anglais *next generation sequencing*). Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée au tableau 6. Les principales hypothèses émises pour les fins de l'analyse sont les suivantes :

- L'ajout de cette analyse au *Répertoire* permettrait de remplacer l'usage du panel Luminex de 71 mutations du gène *CFTR* (code : 55220). En 2015-16, 945 analyses ont été réalisées à une VP de 156.
- L'ajout de cette analyse entraînerait aussi l'élimination d'un nombre équivalent de tests réalisés par TAAN permettant la détection de la mutation p.S489X (code : 55222) qui ne figure pas dans le panel et dont la VP est de 27.
- Toutefois, considérant l'incapacité du NGS à détecter la délétion de 21 kb (c.54-5940_273+10250del21kb), la détection de celle-ci serait toujours effectuée en parallèle par TAAN sous le code 55222 à une VP de 27.
- L'analyse proposée a fait l'objet de 96 envois hors Québec au cours de l'année 2014-15 pour un coût moyen de 1 365,05\$. Le rapatriement de l'ensemble de ces tests est prévu dès la première année suivant l'ajout de l'analyse au *Répertoire*. Cela exclut les séquençages réalisés par panel (*CFTR*, *CTRC*, *PRSS1* et *SPINK*) dans un contexte de pancréatite chronique héréditaire.
- Selon la plus récente mise à jour du bilan démographique du Québec de l'Institut de la statistique du Québec, le taux d'accroissement de la population était de 0,61 % en 2015.
- Ainsi, 957, 962 et 968 analyses seraient réalisées au cours des trois années suivant son ajout au *Répertoire*.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 275,08.
- La confirmation des cas positifs identifiés par NGS serait effectuée par séquençage Sanger dont la VP est de 196. La fréquence de positivité est estimée à 40 %.
- Ces analyses représenteraient 100 % des analyses prévues pour les patients du système de santé public québécois.
- Aucune modification significative de la prise en charge des patients n'est anticipée suivant cette analyse par rapport aux analyses existantes au *Répertoire* ou effectuées hors Québec.

Tableau 6 Coûts liés à l'introduction au Répertoire de l'analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* par séquençage de nouvelle génération

SCÉNARIOS	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : sans l'ajout de l'analyse du gène <i>CFTR</i> par NGS au Répertoire				
Nombre d'analyses				
Panel de 71 mutations	957	962	968	2 887
Mutation p.S489X	957	962	968	2 887
Envois hors Québec	98	98	99	295
Coûts	308 906 \$	309 821\$	312 284\$	931 011 \$
Nouveau scénario : ajout de l'analyse du gène <i>CFTR</i> par NGS au Répertoire				
Nombre d'analyses				
NGS	957	962	968	2 887
TAAN délétion de 21 kb	957	962	968	2 887
Confirmation par Sanger	383	385	387	1 155
Coûts	364 119 \$	366 022 \$	368 305 \$	1 098 446 \$
Impact net	55 213 \$	56 201 \$	56 021 \$	167 435 \$

Ainsi, l'ajout de l'analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* par séquençage de nouvelle génération pourrait générer des coûts d'environ 167 000 \$ pour le total des trois premières années.

6 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Le séquençage de l'ensemble des régions codantes du gène *CFTR* permettrait d'éliminer le biais ethnique propre à l'utilisation de tout panel restreint de mutations. Les troupes commerciales permettant la détection d'un panel restreint des mutations causales les plus fréquemment associées à la fibrose kystique sont biaisées pour l'identification de porteurs chez les individus d'origine européenne [Lim *et al.*, 2016]. Ainsi, un enjeu ethnique serait à considérer en raison de la diversité présente dans le monde actuel.

Le diagnostic précoce a permis d'améliorer l'issue clinique des patients atteints de fibrose kystique [Brennan et Schrijver, 2016]. En effet, il y a quelques décennies, les patients n'atteignaient pas l'âge scolaire [Michl *et al.*, 2016], alors qu'en 2014, l'âge médian de survie des Canadiens atteints de fibrose kystique était évalué à 51,8 ans²⁵.

²⁵ Fibrose kystique Canada. Registre canadien sur la fibrose kystique : rapport annuel de 2014. Toronto, ON : 2016. Disponible à : <https://cysticfibrosis.uberflip.com/i/707616-le-registre-canadien-sur-la-fibrose-kystique> (consulté le 18 décembre 2016).

7 POSITIONS OU ORIENTATIONS DES PRINCIPALES ORGANISATIONS CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

- L'ACMG et l'ACOG recommandent l'analyse de 23 mutations du gène *CFTR* associées à la forme classique de la fibrose kystique et présentes à une fréquence allélique d'au moins 0,1 % afin d'identifier les individus porteurs [American College of Obstetricians and Gynecologists, 2011; Watson *et al.*, 2004].
- Selon l'ACOG [2011], l'analyse complète du gène *CFTR* par séquençage n'est pas appropriée pour le test de porteur car il peut générer des résultats difficiles à interpréter. Ce type d'analyse est généralement réservé aux patients atteints de fibrose kystique, aux patients ayant une histoire familiale de fibrose kystique, aux hommes présentant une CBAVD ou aux nouveau-nés dont le résultat de l'analyse du panel de 23 mutations standard est négatif en dépit d'un test de dépistage positif.
- L'Association canadienne d'urologie (CUA) recommande une analyse génétique en lien avec la fibrose kystique chez tous les hommes atteints de CBAVD ainsi que pour leurs partenaires [Jarvi *et al.*, 2015].
- L'Association européenne d'urologie (EAU) recommande l'analyse des mutations courantes et de l'allèle 5T dans la région non codante du gène *CFTR* chez tous les hommes présentant une CBAVD, ainsi que leurs partenaires. Si la seconde mutation n'est pas détectée par l'analyse des mutations courantes, le séquençage complet du gène *CFTR* est conseillé [Jungwirth *et al.*, 2015].

8 SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION

L'analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* associé à la fibrose kystique par NGS permettra de confirmer un diagnostic de fibrose kystique ou d'une pathologie liée au gène *CFTR* mais également d'effectuer un test de porteur, un diagnostic prénatal et l'utilisation de traitements ciblés. Le séquençage du gène *CFTR* permettra d'éliminer le biais ethnique propre à tout panel de mutations, notamment le panel de 71 mutations utilisé actuellement.

Valeur diagnostique

Le séquençage du gène *CFTR* permet dans certains cas de confirmer un diagnostic de fibrose kystique en présence d'un phénotype atypique ou de résultats équivoques suite à l'analyse au moyen d'un panel restreint de mutations. Le diagnostic des pathologies associées au gène *CFTR* est également bonifié par l'analyse complète du gène comparativement à l'analyse partielle au moyen de panels restreints de mutations principalement associées à la forme classique de la fibrose kystique. L'utilisation du NGS permet de détecter certaines mutations non détectées par séquençage Sanger et de détecter la seconde mutation causale chez des individus hétérozygotes dont le diagnostic n'est pas concluant.

Valeur thérapeutique

Les deux options thérapeutiques sont actuellement disponibles pour le traitement de la fibrose kystique relativement au profil mutationnel du gène *CFTR* sont : Kalydeco^{MC} (ivacaftor) et Orkambi^{MC} (lumacaftor-ivacaftor). Ces deux médicaments sont approuvés par Santé Canada et ne sont pas remboursés au Québec.

Validité analytique

Les études retenues ont montré que le NGS du gène *CFTR* à l'aide de la plateforme MiSeq (Illumina^{MC}) offrait une sensibilité et une spécificité de 100 %. La reproductibilité intra- et inter-essai pour l'identification des variants ainsi que la valeur prédictive positive étaient de 100 %. Les résultats de validation du centre demandeur ont également montré une sensibilité et une spécificité de 100 %. Comparativement à la méthode de référence actuellement utilisée (génotypage Luminex), le NGS (plateforme MiSeq, Illumina^{MC}) a permis de détecter 75 mutations réparties sur les 50 sites de variants connus, dont 22 mutations réparties sur 19 sites non couverts par le génotypage Luminex.

Impact budgétaire

L'ajout de l'analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* associé à la fibrose kystique par séquençage de nouvelle génération pourrait générer des coûts d'environ 30 000 \$ pour le total des trois premières années. Ceci tient compte de l'algorithme proposé où le panel de 71 mutations en première intention est éliminé.

Position d'autres organisations

L'analyse d'un panel de 23 mutations associées à la fibrose kystique classique est recommandée par l'ACMG et l'ACOG. Selon l'ACOG, l'analyse complète du gène *CFTR* n'est pas appropriée pour le test de porteur mais est indiquée pour les individus atteints de fibrose kystique ou ayant une histoire familiale de fibrose kystique, aux hommes présentant une CBAVD ainsi que pour les nouveau-nés dont le résultat de l'analyse du panel standard de 23 mutations est négatif. Concernant les patients présentant une CBAVD, l'Association canadienne d'urologie recommande l'analyse génétique en lien avec la fibrose kystique et l'Association européenne d'urologie recommande l'analyse complète du gène *CFTR* si l'analyse des mutations courantes ne permet pas de détecter la seconde mutation.

9 RECOMMANDATION de l'INESSS

Analyse du profil mutationnel du gène *CFTR* par séquençage de nouvelle génération

La recommandation de l'INESSS

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

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Les membres du comité reconnaissent la pertinence clinique du test au regard des données cliniques publiées et présentées en appui.
- ✓ L'introduction de cette analyse au *Répertoire* favoriserait le rapatriement d'analyses réalisées actuellement à l'extérieur du Québec.
- ✓ Toutefois, la validité analytique doit être réalisée pour l'ensemble des 71 mutations incluses dans la trousse actuellement utilisée. Une procédure et une politique de communication des variants et de leur signification devraient être mises sur pied.

RÉFÉRENCES

- Amato F, Bellia C, Cardillo G, Castaldo G, Ciaccio M, Elce A, et al. Extensive molecular analysis of patients bearing CFTR-related disorders. *J Mol Diagn* 2012;14(1):81-9.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol* 2011;117(4):1028-31.
- Baker MW, Atkins AE, Cordovado SK, Hendrix M, Earley MC, Farrell PM. Improving newborn screening for cystic fibrosis using next-generation sequencing technology: A technical feasibility study. *Genet Med* 2016;18(3):231-8.
- Biazotti MC, Pinto Junior W, Albuquerque MC, Fujihara LS, Suganuma CH, Reigota RB, Bertuzzo CS. Preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis: A case report. *Einstein (Sao Paulo)* 2015;13(1):110-3.
- Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10(Suppl 2):S86-102.
- Brennan ML et Schrijver I. Cystic fibrosis: A review of associated phenotypes, use of molecular diagnostic approaches, genetic characteristics, progress, and dilemmas. *J Mol Diagn* 2016;18(1):3-14.
- Brewington J et Clancy JP. Diagnostic testing in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2016;37(1):31-46.
- Canadian College of Medical Geneticists (CCMG). CF testing/Screening guidelines. Ottawa, ON : CCMG; 2011. Disponible à : https://www.ccmg-ccgm.org/images/CCMG_PractGuid_MOL_CF_Testing_20Jan2011.pdf.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis: Mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7(3):179-96.
- Dal'Maso VB, Mallmann L, Siebert M, Simon L, Saraiva-Pereira ML, Dalcin PdTR. Diagnostic contribution of molecular analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in patients suspected of having mild or atypical cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 2013;39(2):181-9.
- De Bie I, Agatep R, Scott P, Ruchon A. Report on the p.Ser489X (p.Ser489*) CFTR mutation, a variant with severe associated phenotype and high prevalence in a Quebec French-Canadian cystic fibrosis patient population. *Genet Med* 2012;14(10):883-6.
- Giuliani R, Antonucci I, Torrente I, Grammatico P, Palka G, Stuppia L. Identification of the second CFTR mutation in patients with congenital bilateral absence of vas deferens undergoing ART protocols. *Asian J Androl* 2010;12(6):819-26.
- Jarvi K, Lo K, Grober E, Mak V, Fischer A, Grantmyre J, et al. CUA guidelines: The workup and management of azoospermic males. *Can Urol Assoc J* 2015;9(7-8):229-35.
- Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. EAU Guidelines on male infertility. Arnhem, Pays-Bas : European Association of Urology (EAU); 2015. Disponible à : http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male-Infertility_LR1.pdf.

- Lebo RV et Grody WW. Variable penetrance and expressivity of the splice altering 5T sequence in the cystic fibrosis gene. *Genet Test* 2007;11(1):32-44.
- Lefterova MI, Shen P, Odegaard JI, Fung E, Chiang T, Peng G, et al. Next-generation molecular testing of newborn dried blood spots for cystic fibrosis. *J Mol Diagn* 2016;18(2):267-82.
- Lim RM, Silver AJ, Silver MJ, Borroto C, Spurrier B, Petrossian TC, et al. Targeted mutation screening panels expose systematic population bias in detection of cystic fibrosis risk. *Genet Med* 2016;18(2):174-9.
- Loukas YL, Thodi G, Molou E, Georgiou V, Dotsikas Y, Schulpis KH. Clinical diagnostic Next-Generation sequencing: The case of CFTR carrier screening. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75(5):374-81.
- Michl RK, Tabori H, Hentschel J, Beck JF, Mainz JG. Clinical approach to the diagnosis and treatment of cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Expert Rev Respir Med* 2016 [Epub ahead of print].
- Moss RB, Flume PA, Elborn JS, Cooke J, Rowe SM, McColley SA, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: A double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2015;3(7):524-33.
- Pagin A, Devos A, Figeac M, Truant M, Willoquaux C, Broly F, Lalau G. Applicability and efficiency of NGS in routine diagnosis: In-depth performance analysis of a complete workflow for CFTR mutation analysis. *PLoS ONE* 2016;11(2):e0149426.
- Ratbi I, Legendre M, Niel F, Martin J, Soufir JC, Iazard V, et al. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Hum Reprod* 2007;22(5):1285-91.
- Schrijver I. Mutation distribution in expanded screening for cystic fibrosis: Making up the balance in a context of ethnic diversity. *Clin Chem* 2011;57(6):799-801.
- Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, Sharma N, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 2013;45(10):1160-7.
- Straniero L, Solda G, Costantino L, Seia M, Melotti P, Colombo C, et al. Whole-gene CFTR sequencing combined with digital RT-PCR improves genetic diagnosis of cystic fibrosis. *J Hum Genet* 2016;61(12):977-84.
- Tamburino L, Guglielmino A, Venti E, Chamayou S. Molecular analysis of mutations and polymorphisms in the CFTR gene in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2008;17(1):27-35.
- Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, de Becdelièvre A, Jimenez C, Lalau G, et al. CFTR p.Arg117His associated with CBAVD and other CFTR-related disorders. *J Med Genet* 2013;50(4):220-7.
- Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Génin E, Bellis G, Gautier E, et al. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: A reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J Med Genet* 2009;46(11):752-8.

- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015;373(3):220-31.
- 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.