

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF*

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

Direction des services de santé et de
l'évaluation des technologies

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION DES GÈNES *F8* et *VWF* (RÉFÉRENCE – 2018.03.008)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres du comité présent à la rencontre ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré 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^{re} Margaret Warner, hématologue au Centre universitaire de Santé McGill;
- D^r Régen Drouin, généticien au CHU de Québec – Université Laval.

2. RÉSUMÉ

	Séquençage de nouvelle génération de gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i>
Demandeur	CHU Sainte-Justine.
Nom et objectif de l'analyse	- Diagnostic moléculaire de : - l'hémophilie A (HA); - la Maladie de von Willebrand (MvW). - Déterminer le risque de développer des inhibiteurs chez les patients atteints d'HA légère à modérée (L/M).
Situation actuelle	Actuellement, les analyses de première ligne pour le diagnostic d'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand sont des tests phénotypiques. Les analyses moléculaires figurant dans le <i>Répertoire</i> sont : - Inversion des introns 1 et 22 du gène <i>F8</i> pour les HA grave; - Aucune analyse moléculaire pour le diagnostic d'HA L/M et de la MvW types 1 et 3; - Séquençage des exons 18 à 21 et 28 à 31 du gène <i>VWF</i> pour la MvW type 2. Les cas jugés urgents sont envoyés pour une analyse moléculaire à l'extérieur du Québec.
Nombre d'analyses prévues	Le demandeur prévoit 150 analyses par an.
Avantages allégués par le demandeur	- Le SNG est l'outil idéal pour établir un diagnostic précis des différentes formes d'HA et de MvW qui peuvent être présentes simultanément chez un même sujet. - Les patients HA L/M à risque de développer des inhibiteurs recevraient des traitements alternatifs aux concentrés de facteurs VIII. - Un SNG des 2 gènes représente une économie de temps et d'argent en réduisant le nombre de consultations médicales avec investigations cliniques en séquences. - L'analyse permettrait d'offrir un diagnostic moléculaire à l'ensemble des patients atteints par ces 2 maladies.
Valeur diagnostique	- Le génotypage des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i> par SNG permet de poser ou de préciser le diagnostic d'HA et de MvW chez 99 % des patients. - Le SNG du gène <i>VWF</i> permet de corriger un diagnostic erroné dans environ 27 % des patients.
Valeur thérapeutique	Certaines mutations du gène <i>F8</i> sont associées à un risque de développer des inhibiteurs suivant une exposition à des concentrés de FVIII (0 % à 42 %). L'utilisation du SNG chez des patients atteints d'HA L/M permet d'estimer ce risque sur une base individuelle et de proposer des thérapies alternatives.

Données de validation locales	• Le SNG a présenté une profondeur de lecture moyenne de 200x et 99 % de la séquence est couverte à au moins 30x. • La qualité de lecture Q30 est supérieure à 90 %. • Le SNG a été validé avec 14 échantillons présentant des mutations du gène <i>F8</i>, du gène <i>VWF</i> ou des 2 gènes.
Impact budgétaire	La valeur pondérée de l'analyse a été fixée à 576,51 par le demandeur. Considérant que le financement par le National Program for Hemophilia Mutation Testing prendra fin sous peu, l'ajout de l'analyse par SNG des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i> au <i>Répertoire</i> pourrait engendrer une réduction de coûts d'environ 141 000 \$ pour le total des trois premières années.
Positions et orientations d'organisme d'intérêts	Le Nordic Hemophilia Council et la United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation (UKHCDO) recommandent que le génotypage du gène <i>F8</i> soit réalisé chez les patients atteints d'HA grave qui ne présentent pas d'inversion des introns 1 et 22 et chez ceux atteints d'HA L/M. La UKHCDO recommande que les analyses génétiques soient utilisées si bénéfiques pour clarifier le diagnostic de la MvW ou aider à la prise en charge des patients. La Canadian Hemophilia Society et l'American Society of Hematology proposent des algorithmes diagnostiques dans lesquels figurent des analyses génétiques pour la MvW.
Enjeux particuliers	• La disponibilité du séquençage <i>F8</i> et <i>VWF</i> sans frais hors Québec prendra possiblement fin prochainement selon le demandeur. • Un volume d'analyse supplémentaire est à prévoir en raison de l'analyse rétrospective de patients qui n'ont pas encore de confirmation moléculaire. • Le SNG tel que proposé ne permet pas de détecter des duplications ou de grandes délétions.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* pour diagnostiquer l'hémophilie A et la maladie de von Willebrand. L'analyse vise également à déterminer la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'hémophilie A modérée à légère selon leur risque de développer des inhibiteurs.

3.2. Description de la méthode

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) désigne les différents systèmes qui permettent le séquençage de plusieurs gènes simultanément. Cette technologie est caractérisée par un rendement de lecture très élevé en comparaison de la méthode classique, soit le séquençage de Sanger.

Concernant la présente demande, le système MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC} sera utilisé pour détecter des mutations germinales présentes dans la région promotrice, les exons, les sites d'épissage et les régions introniques des gènes *F8* (Facteur VIII) et *VWF* (Facteur von Willebrand [FvW]) à l'exception de séquences répétées (tableau 1). Les régions codantes des gènes *F8* et *VWF* sont couvertes à 100 % à l'exception des exons 15 et 26 du gène *VWF* qui présentent un défaut de couverture et qui seront séquencés par Sanger.

Le SNG est réalisé en trois étapes principales, soit la préparation de l'ADN génomique et de la librairie d'ADN fragmenté, le séquençage et l'analyse des variants. L'ADN génomique des patients est fragmenté par sonicateur Covaris^{MC} puis une librairie est préparée à partir des fragments générés. La capture des régions d'intérêt et l'amplification des librairies sont réalisées à l'aide de la trousse SureSelect XT^{MC}. Les librairies sont ensuite séquencées sur une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC} par la synthèse cyclique d'un brin complémentaire à la matrice en utilisant des nucléotides fluorescents. Contrairement au séquençage classique, le SNG réalise des millions de réactions simultanément. Les séquences obtenues sont ensuite assemblées et alignées à une séquence de référence.

L'analyse des variants est réalisée à l'aide d'outils de prédiction de la protéine (Polyphen, Sift, Mutation Tester). La fréquence du variant dans les bases de données publiques (1000G, GnomAD) permet d'éliminer les variants communs dans la population. Des bases de données plus spécifiques comme les EAHAD coagulation factor variant databases permettent également de sélectionner les variants d'intérêt.

Seule la séquence codante sera analysée. En absence de mutations dans la séquence codante la séquence non codante pourra être analysée afin de détecter des variations pathogéniques déjà documentées. Les variants pathogéniques relevés seront validés par séquençage de Sanger.

Tableau 1 Couverture des gènes *F8* et *VWF* par séquençage de nouvelle génération

GÈNES	POSITION GÉNOMIQUE	SÉQUENCE TOTALE	TAILLE DE LA CIBLE	COUVERTURE	NB DE SONDES
<i>F8</i>	chrX : 5'UTR : 154255269 3'UTR : 154059877	195 392	383 457	323 489	3 292
<i>VWF</i>	Chr12 : 5'UTR : 6245051 3'UTR : 6056921	188 065			

Abréviations : Chr : Chromosome; Pb : Paires de bases; UTR : Régions non traduites, de l'anglais *untranslated regions*.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

L'échantillon sanguin est acheminé au laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine pour extraction de l'ADN génomique. L'ADN est conservé à 4 °C. Les bibliothèques sont préparées, multiplexées puis séquencées sur place. Les analyses bio-informatiques sont réalisées par un professionnel spécialisé en biologie moléculaire pour l'identification de variations génétiques significatives et la validation de celles-ci par séquençage de type Sanger.

3.4. Société ou concepteur

Trousse SureSelect XT^{MC} d'Agilent^{MC}.

Plateforme de séquençage MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}.

3.5. Homologation

Cette analyse n'a fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

3.6. Valeur pondérée : 576,51

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Sujets avec manifestations cliniques de tendance hémorragique chez qui une histoire personnelle et familiale, de même que des tests fonctionnels permettent de suspecter une hémophilie A ou une des multiples formes de maladie de von Willebrand.

4.2. Description de la maladie visée

L'hémophilie A est une maladie génétique récessive liée au chromosome X caractérisée par un déficit congénital en facteur VIII de coagulation. Sa prévalence est de moins d'une personne sur 10 000 [SCH, 2018] soit 3 110 Canadiens en 2016 [WFH, 2016]. Il s'agit de l'hémophilie dite classique puisqu'elle constitue la forme la plus commune de déficit en facteurs de coagulation. Ce déficit se traduit par un temps de coagulation prolongé menant à de fréquents épisodes de saignements aux articulations (hémarthroses) et aux tissus mous [Duan *et al.*, 2014]. Le déficit en facteur VIII est qualifié de grave, modéré ou léger lorsque la concentration

plasmatique mesurée est respectivement : inférieure à 1 %, entre 1 et 5 % et entre 5 et 40 %, et ce, comparativement aux personnes sans trouble de la coagulation. La prise en charge des patients atteints d'hémophilie A grave inclut le traitement épisodique et la prophylaxie au moyen de facteur VIII de remplacement [Srivastava *et al.*, 2013].

La demi-vie du facteur VIII est d'une heure comparativement à 12 heures lorsqu'il est lié au facteur von Willebrand (FvW) [Pipe *et al.*, 2016; Oldenburg et Albert, 2014]. Pour cette raison, un déficit en FvW peut mimer une hémophilie A. Ce déficit est nommé maladie de von Willebrand et est présent chez 4 180 canadiens [WFH, 2016].

La maladie de von Willebrand est divisée en plusieurs sous-types selon les anomalies du FvW. Les maladies de von Willebrand de types 1 et 3 sont respectivement causées par un déficit quantitatif partiel et par un déficit complet du FvW alors que la maladie de von Willebrand de type 2 est causée par un déficit fonctionnel du FvW (annexe A) [Favaloro, 2017].

La prise en charge des patients atteints de la maladie de von Willebrand inclut le traitement avec des concentrés de FVIII/FvW dérivés du plasma, la desmopressine et l'acide tranexamique (annexe B).

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur prévoit un minimum de 150 analyses par an pour les 3 prochaines années, soit 125 analyses pour la maladie de von Willebrand et 25 analyses pour l'hémophilie A.

4.4. Situation actuelle

Actuellement, les analyses de première ligne pour le diagnostic d'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand sont des tests phénotypiques.

Une analyse par TAAN qui permet de détecter l'inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 du gène *F8* (code 25026) est réalisée chez les patients qui présentent des symptômes d'hémophilie A grave. Les patients négatifs à cette analyse et ceux dont les tests phénotypiques pointent vers une hémophilie A modérée à légère sont prévus être testés par séquençage Sanger à l'extérieur du Québec. Ceux suspectés d'une maladie de von Willebrand de type 2N, 2A, 2B et 2M sont testés par un séquençage Sanger partiel du gène *VWF* qui couvre les exons 18 à 21 et 28 à 31 (code 25070). Ceux dont le phénotype suggère une maladie de von Willebrand de type 1 ou 3, ne bénéficient pas de test moléculaire permettant de confirmer leur diagnostic.

Selon le demandeur, les échantillons des cas plus urgents et dont le séquençage partiel du gène *VWF* est négatif sont acheminés à Kingston pour réaliser le séquençage Sanger de toutes les régions codantes du gène *VWF*. Les autres échantillons négatifs sont conservés en attendant que l'analyse proposée soit introduite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* (ci-après nommé *Répertoire*). Les analyses réalisées à Kingston sont actuellement défrayées par un financement du National Program for Hemophilia Mutation Testing. Le demandeur indique que ce financement est limité et prendra fin prochainement.

Le demandeur propose de remplacer le séquençage partiel du gène *VWF* par le SNG des gènes *F8* et *VWF* et il ne serait plus nécessaire de réaliser des séquençages hors Québec pour le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand. Tous les patients dont les tests phénotypiques permettent de suspecter une hémophilie A ou une maladie de von Willebrand bénéficieraient d'une analyse complète de toutes les séquences codantes des gènes *F8* et *VWF* (annexe C).

4.5. Données médico administratives

D'après les données d'envois hors Québec du ministère de la Santé et des Services sociaux pour la période 2016-17, le séquençage du gène *VWF* a été facturé à l'extérieur du réseau à 3 reprises au coût total de 11 154 \$ alors que celui du gène *F8* a été facturé à 6 reprises au coût total de 4 308 \$. Actuellement les analyses acheminées à Kingston ne sont pas comptabilisées. Le demandeur indique que 3 séquençages ont été réalisés à Kingston au cours de la dernière année à la suite d'une analyse négative du gène *VWF*.

Les analyses impliquées dans le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand figurant au *Répertoire* ainsi que les volumes d'activités sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 Données médico administratives des analyses liées au diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand en 2017-2018

CODE	ANALYSE	VP	VOLUME D'ANALYSES	COÛT (\$)
Facteur VIII				
20080	Facteur de coagulation (II, V, VII, VIII, IX, X, XI et XII) (activité)	6	21 078	126 468
20122	Facteur VIII (détermination de la concentration) (méthode chromogène)*	23	-	-
20143	Anti-facteur VIII (détection) (ELISA)	7,8	275	2 145
25026	Hémophilie A Facteur VIII; inversion intron 22 (IVS22 inv) (TAAN)	242	25	6 050
25022	Facteur VIII haplotype (hémophilie A) (TAAN)	231	2	462
25028	Hémophilie A ou B (diagnostic de porteuses et prénatal, mutation connue) (séquençage)	160	83	13 612
Facteur Von Willebrand				
20088	Facteur von Willebrand (activité) (ELISA)	12,3	2 090	25 707
20089	Facteur von Willebrand (antigène)	6	4 654	27 924
20090	Facteur von Willebrand (multimères du)	77	758	58 366
20249	Test de liaison du FVW au collagène	12,9	9	116
20250	Test de liaison du FVIII au FVW	10,4	1†	10
20009	Anti Facteur von Willebrand (anti-FVW)	12,7	-†	-
25070	Von Willebrand type 2 (2A, 2B, 2M, 2N); VWF (exons 18 à 21 et 28 à 31) mutations associées (séquençage)	227	131	29 737

Abréviations : VP : Valeur pondérée.

* Analyse ajoutée au *Répertoire* en 2018-2019.

† Aucune analyse réalisée au cours des années administratives 2014-2105, 2015-2016, 2016-2017.

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, le SNG est l'outil technique idéal pour établir un diagnostic précis et fiable de plusieurs formes d'hémophilie A et de maladies de von Willebrand qui peuvent être présentes simultanément chez un même sujet, ce qui est à peu près impossible à déterminer de façon certaine par les méthodes d'études fonctionnelles conventionnelles.

Pour les sujets avec Hémophilie A légère, dont les mutations sont associées à un haut risque de développer des inhibiteurs, on évitera les concentrés de FVIII et on remplacera par des traitements non spécifiques comme la desmopressine, l'acide tranexamique et le Facteur VII recombinant activé. Pour les sujets avec maladie de von Willebrand de type 2N, on évitera les concentrés de FVIII recombinant qu'on remplacera par du concentré de FVIII dérivé du plasma et renfermant du FvW.

Un séquençage combiné par SNG de *F8* et *VWF* représente une économie de temps et d'argent en éliminant les multiples consultations médicales avec investigations cliniques et biologiques séquentiellement, pour éventuellement conduire de toute façon à des séquençages Sanger séparés dans le temps.

Cette analyse permettrait d'offrir un diagnostic moléculaire complet de la maladie de von Willebrand puisqu'à ce jour l'analyse d'une infime portion du gène est offerte. La technologie de séquençage de nouvelle génération permet d'offrir une analyse complète et de diagnostiquer des individus qui ne pouvaient pas l'être auparavant.

4.7. Assurance qualité

Le demandeur a des ententes ratifiées de partages biannuels d'échantillons présentant des mutations des gènes *F8* et *VWF* avec le département de pathologie et de médecine moléculaire de la Queen's University à Kingston en Ontario et avec le laboratoire d'hémostase du CHU de Lille en France.

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* en parallèle

La recherche documentaire a permis de repérer 2 études dans lesquelles le diagnostic d'hémophilie A ou de maladie de von Willebrand, établi au moyen de tests phénotypiques, a été confirmé par le séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* [Bastida *et al.*, 2017; Bastida *et al.*, 2016]. Le détail des études est présenté à l'annexe D.

La première étude [Bastida *et al.*, 2017] avait pour objectif d'évaluer l'utilité d'un algorithme de diagnostic moléculaire incluant le SNG chez des patients atteints d'hémophilie A et d'hémophilie B. L'algorithme proposé est le suivant : 1) détection des inversions dans l'intron 22 et ensuite dans l'intron 1 du gène *F8* chez les patients atteints d'hémophilie A grave; 2) SNG des gènes *F8*, *F9* et *VWF* chez les patients sans inversions détectées et chez les patients atteints d'hémophilie A non grave et atteints d'hémophilie B; 3) amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligature (MLPA de l'anglais, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) du gène *F8* chez les patients sans variant pathogène détecté par les autres analyses. Les échantillons provenant de 102 patients ont été analysés.

L'inversion dans l'intron 22 du gène *F8* a été détectée chez 11 patients atteints d'hémophilie A grave et chez 1 femme porteuse obligatoire. L'inversion dans l'intron 1 n'a été décelée chez aucun patient. Par la suite, le SNG a permis de détecter des mutations pathogéniques des gènes *F8* et *VWF* chez 8 des 9 patients atteints d'un déficit grave en FVIII sans inversion, chez 57 des 58 patients atteints d'un déficit léger à modéré en FVIII et chez 4 femmes porteuses obligatoires ou symptomatiques.

Les auteurs ont conclu que l'utilisation de l'algorithme moléculaire proposé a permis de détecter les mutations responsables de la maladie chez 99 % des patients avec une concentration faible de FVIII et de FIX et d'assigner un diagnostic de maladie de von Willebrand pour certains patients (tableau 3).

La 2^e étude [Bastida *et al.*, 2016] a été réalisée avec un panel de 23 gènes¹ analysés par SNG. Parmi les 20 patients testés, un diagnostic phénotypique d'hémophilie A et de maladie de von Willebrand avaient respectivement été posés chez 8 patients et 2 patients. Le SNG a permis de valider le diagnostic d'hémophilie A de 7 patients et de maladie de von Willebrand des 2 patients par la détection de mutations pathogéniques connues ou déterminées pathogéniques par différents outils bio-informatiques². L'autre patiente suspectée d'être porteuse symptomatique d'une mutation du gène *F8* en raison d'une activité réduite du facteur VIII (40 %), ne présentait aucune mutation de ce gène. Le SNG a par ailleurs permis de déceler une mutation faux sens homozygote située dans le 20^e exon du gène *VWF*, qui correspond au domaine de liaison avec le FVIII. Cette mutation avait déjà été documentée comme étant associée à la maladie de von Willebrand de type 2N [Mazurier *et al.*, 2001].

Les auteurs ont conclu que cette approche peut être précise, reproductible et représenter un outil fiable pour établir le diagnostic génétique des désordres héréditaires de la coagulation sanguine.

¹ Les gènes séquencés dans le panel sont : *F2, F5, F7, F8, F9, F10, F11, F13A1, F13B, FGA, FGB, FGG, FIBCD1, GGCX, LMAN1, MCFD2, PLAT, PLAUR, PLG, PLGRKT, TFPI, VKORC1* et *VWF*.

² Afin de déterminer l'impact sur la structure, la fonction et la pathogénicité des nouveaux variants, les outils Poly-Phen2, SIFT, SNPs&GO, SNAP et HANSA ont été consultés par les auteurs.

Tableau 3 Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* pour le diagnostic de l'hémophilie A et des maladies de von Willebrand

ÉTUDES	DIAGNOSTIC		DIAGNOSTICS CORRIGÉS
	PHÉNOTYPIQUE	FINAL	
Bastida <i>et al.</i> , 2017	HA graves : 20	HA graves : 20*	Aucun
	HA M/L : 58	HA M/L : 52 [†] MvW : 6 (types 1 et 2N)	6
	Porteuses obligatoires de HA : 5	Porteuses de HA : 3 [‡] MvW : 2 (type 2N)	2
Bastida <i>et al.</i> , 2016	HA : 8	HA : 7 MvW : 1 (type 2N)	1
	MvW : 2	MvW : 2	Aucun

Abréviations : HA : Hémophilie A; M/L : Modérée à légère; MvW : Maladie de von Willebrand.

* 11 confirmés par la présence d'une inversion de l'intron 22 et n'ont pas été testés par SNG, 8 confirmés par le SNG et une délétion décelée par MLPA.

[†] 51 avec des mutations détectées par SNG (47 dans la séquence codante et 4 dans les introns) et 1 sans mutation détectable par aucune des méthodes.

[‡] 1 avec inversion de l'intron 22, et 2 avec mutations détectées par SNG.

Séquençage de nouvelle génération du gène *VWF*

La recherche documentaire a permis de repérer 3 études dans lesquelles des patients ont reçu un diagnostic de maladie de von Willebrand au moyen de tests phénotypiques et dont le gène *VWF* a été analysé par SNG sur une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC} [Borràs *et al.*, 2017; Fidalgo *et al.*, 2016; Boylan *et al.*, 2015]. Les caractéristiques ainsi que les principaux résultats des études présentées dans cette section sont résumés à l'annexe E.

Borràs et ses collaborateurs [2017] ont réalisé une étude prospective dans laquelle ils présentent, entre autre, les résultats d'une analyse de corrélation génotype-phénotype chez 556 individus dont 442 qui ont reçu un diagnostic phénotypique de maladie de von Willebrand.

Les 52 exons, les sites d'épissages et la région promotrice du gène *VWF* ont été analysés par SNG avec une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}. Les mutations détectées ont été validées par séquençage Sanger ainsi que les régions faiblement couvertes.

Globalement, l'analyse mutationnelle des 556 patients a permis de reclasser le sous-type de maladie de von Willebrand de 105 patients, d'en exclure 5 et d'établir un diagnostic de maladie de von Willebrand chez 43 cas qui avaient été exclus (tableau 4).

Tableau 4 Répercussions du SNG sur le diagnostic final des patients référés pour la maladie de von Willebrand

DIAGNOSTIC (556 PATIENTS)		DIAGNOSTICS CORRIGÉS
PHÉNOTYPIQUE	FINAL	
Type 1 : 126	Type 1 : 113 13 reclassés : type 1H, porteur type 3, type 2M, type 2B	13
Type 1H : 22	Type 1H : 14 8 reclassés : type 1, porteur type 3, incertain	8
Type 3 : 44	Type 3 : 41 3 reclassés : non MVW	3
Porteurs type 3 : 5	Porteurs type 3 : 0 6 reclassés : type 1, type 1H	6 [†]
Type 2A : 59	Type 2A : 57 2 reclassés : non MVW, type 2B	2
Type 2A/2M : 38	Type 2A/2M : 31 7 reclassés : type 1, type 2A	7
Type 2B : 23	Type 2B : 21 2 reclassés : type 2A	2
Type 2M : 32	Type 2M : 31 1 reclassé : type 2A	1
Type 2N : 9	Type 2N : 9 Aucun changement	Aucun
Porteurs type 2N : 10	Porteurs type 2N : 10 Aucun changement	Aucun
Type Incertain : 74	Type Incertain : 6 68 reclassés : type 1, type 3, porteur type 3, type 2A, type 2A/2M, type 2B, type 2M, non MVW)	68
Non-MVW : 114	Non MVW : 71 43 reclassés (type 1, type 1H, porteur type 3, type 2A, type 2M, porteur type 2N)	43

Adaptée de Borràs *et al.*, 2017.

Abréviations : MvW : Maladie de von Willebrand; N : Nombre; SNG : Séquençage de nouvelle génération.

* Les anomalies génétiques ont été détectées par SNG, à l'exception de 2 délétions détectées par MLPA.

Les auteurs ont conclu que le SNG du gène *VWF* permet de corriger un diagnostic erroné dans 27 % des patients. Par ailleurs, les auteurs affirment que le SNG pourrait être utilisé comme test diagnostique de routine de première ligne pour cette catégorie de patients.

L'étude réalisée par Fidalgo et ses collaborateurs [2016] avait pour buts de parfaire la compréhension de la corrélation génotype-phénotype des différents types de maladie de von Willebrand et de comparer les résultats obtenus par le séquençage Sanger et par SNG.

Le diagnostic de 92 patients a été déterminé par les tests phénotypiques. Les anomalies génétiques engendrant les différents types de maladie de von Willebrand ont été détectées par séquençage Sanger et par SNG au moyen d'une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}.

Le SNG a permis de confirmer toutes les mutations décelées par séquençage Sanger et de détecter 26 mutations supplémentaires, soit 6 mutations faux-sens, 6 mutations synonymes et 17 mutations introniques. Les analyses génétiques ont permis de corriger le diagnostic phénotypique de 4 patients (tableau 5).

Tableau 5 Corrélation génotype-phénotype des patients atteints de la maladie de von Willebrand

DIAGNOSTIC FINAL		INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES RÉVÉLÉES PAR LES ANALYSES MOLÉCULAIRES
TYPE DE MVW	NOMBRE DE PATIENTS	
1	7	1 porteur htz d'une mutation associée à MVW type 3. 1 htz composé dont la mère présente un phénotype type 2M.
3	15	1 patient htz composé dont 1 parent présente un phénotype type 1 et l'autre est asymptomatique. 1 hmz pour 1 mutation dont la contribution à un phénotype sévère reste à démontrer.
2B	6	1 diagnostic de syndrome de Bernard-Soulier écarté. 1 diagnostic de MVW corrigé pour MVW-LP par le séquençage de <i>GP1BA</i> .
2N	12	1 htz composé dont les mutations étaient associées au type 2N et au type 3. 2 avaient auparavant reçu un diagnostic erroné d'HA légère.
2A	9	8 avec des mutations concordantes 1 avec une mutation <i>VWF</i> non informative (p.Cys1130Arg)
2M	11	1 patient htz composé dont la mère a un phénotype type 1

Source : Fidalgo *et al.*, 2016.

Abréviations : Ex. : Exon; HA : Hémophilie A; Hmz : Homozygote; Htz : Hétérozygote; MVW : Maladie de von Willebrand; MvW-LP : MvW liée aux plaquettes; Phéno. : Phénotype; Tx : Traitement.

Les auteurs ont conclu que le SNG est une excellente technologie qui permet un diagnostic plus rapide et suggèrent l'utilisation du SNG lorsque l'activité du FvW est inférieure à 30 % ou lorsque le ratio FVIII : FvW est inférieur à 0,5. De plus, cette approche leur a permis de distinguer des phénotypes similaires tels que la maladie de von Willebrand de type 2N de l'hémophilie A légère, la maladie de von Willebrand de type 2B du syndrome de Bernard-Soulier et la maladie de von Willebrand liée aux plaquettes de la maladie de von Willebrand de type 2B.

Boylan et ses collaborateurs [2015] ont réalisé une étude qui avait pour but d'investiguer la présence de saignements inexpliqués chez 37 patients atteints d'hémophilie A sans mutation connue du gène *F8*, en évaluant la concentration plasmatique du FvW et sa capacité à se lier au FVIII ainsi que le génotype *VWF*. Un groupe de 65 témoins atteints d'hémophilie A non grave avec mutations connues du gène *F8* a également été testé.

Les analyses phénotypiques ont été réalisées et chaque exon plus ou moins 20 paires de bases ont été analysés sur la plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}. Les variants détectés ont été validés par séquençage de Sanger.

Le SNG a permis de valider un diagnostic de maladie de von Willebrand de type 3 pour 4 patients sans mutation connue du gène *F8* et de reconnaître un patient atteint de maladie de von Willebrand de type 1 parmi les patients du groupe témoin. De plus, des mutations dans le gène *VWF* et possiblement contributives au phénotype de tendance hémorragique ont été détectées chez 6 patients et chez 5 témoins (tableau 6).

Tableau 6 Séquençage de nouvelle génération du gène *VWF* pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand

PATIENTS RECRUTÉS (N)	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	RÉSULTATS DES ANALYSES MOLÉCULAIRES
HA sans mutation <i>F8</i> connue : 37	MvW type 3 suspectée : 4	MvW type 3 : 4
	MvW suspectée : 8	HA sans mutation <i>F8</i> porteurs d'une mutation du gène <i>VWF</i> pouvant contribuer à un phénotype de saignement : 3
	MvW non suspectée : 25	HA sans mutation <i>F8</i> porteurs d'une mutation du gène <i>VWF</i> pouvant contribuer à un phénotype de saignement : 3
HA non grave avec mutation <i>F8</i> : 65 (témoins)	MvW type 1 ou 2 suspectée : 1	MvW type : 1
	MvW suspectée : 6	Mutation du gène <i>VWF</i> : 0
	MvW non suspectée : 58	HA avec mutation <i>F8</i> et mutation <i>VWF</i> pouvant contribuer au phénotype de saignement : 5

Adapté de Boylan *et al.*, 2015.

Abréviations : HA : Hémophilie A; MvW : Maladie de von Willebrand; N : Nombre.

Les auteurs ont conclu que l'ajout des analyses phénotypiques du FvW et génotypiques à l'analyse du gène *F8* chez les patients qui ont reçu un diagnostic d'hémophilie A permettrait de détecter certains cas d'erreur diagnostique.

5.2. Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3. Valeur thérapeutique

La recherche documentaire a permis de repérer une étude évaluant le risque des patients atteints d'hémophilie A non grave de développer des inhibiteurs selon leur génotype *F8*, en tenant compte de l'exposition cumulative des concentrés de FVIII [Eckhardt *et al.*, 2013]. Cette étude est détaillée dans l'annexe F.

L'étude a été réalisée sur 895 patients atteints d'hémophilie A non grave et dont le génotype du gène *F8* était connu. Parmi ces patients traités avec des concentrés de FVIII à au moins une reprise, 51 ont développé des inhibiteurs du FVIII (5,7 %).

Parmi les patients ayant développé des inhibiteurs, 19 mutations différentes ont été détectées, toutes des mutations faux-sens localisées dans le domaine A2 de la chaîne lourde et dans les domaines A3, C1 et C2 de la chaîne légère du FVIII. Ces mutations ont également été décelées chez 282 patients sans inhibiteur, pour un total de 333 patients.

Pour l'ensemble des patients, le risque de développer des inhibiteurs à 20 jours, 50 jours et 100 jours d'exposition aux concentrés de FVIII était de 3,5 % (IC95 % : 2,1 à 4,9), 6,7 % (IC95 % : 4,5 à 8,9) et 13,3 % (IC95 % : 9,6 à 17,0) respectivement. Le risque a été calculé à 20 jours et à 50 jours d'exposition pour chaque mutation présente chez au moins 10 patients (tableau 7).

Tableau 7 Risque de développer des inhibiteurs selon le génotype *F8* des patients atteints d'hémophilie A non grave.

MUTATIONS <i>F8</i> ASSOCIÉES AU DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE PATIENTS AVEC INHIBITEURS (%)	RISQUE DE DÉVELOPPER DES INHIBITEURS % (IC95 %)*	
			20 JOURS D'EXPOSITION	50 JOURS D'EXPOSITION
Arg531Cys	35	1 (2,9)	s. o.	s. o.
Arg593Cys	106	12 (11,3)	9,1 (2 à 16)	18,3 (7 à 30)
Asn618Ser	58	1 (1,7)	2,9 (0 à 9)	2,9 (0 à 9)
Asp2074Gly	11	3 (27,3)	21,2 (0 à 47)	21,2 (0 à 47)
Arg2150His	57	9 (15,8)	2,2 (0 à 7)	12,2 (1 à 24)
Arg2159Cys	21	3 (14,3)	9,1 (0 à 26)	39,4 (3 à 75)
Trp2229Cys	10	5 (50,0)	41,7 (5 à 78)	41,7 (5 à 78)
Autres mutations	35	17 (48,6)	s. o.	s. o.
Total	333	51	s. o.	s. o.

Abréviation : IC95 % : Intervalle de confiance à 95 %; s. o. : Sans objet.

* Le risque individuel cumulé de développer des inhibiteurs a été calculé à l'aide de courbes Kaplan-Meier.

Selon les auteurs, les résultats soulignent l'importance du génotypage du gène *F8* chez les patients atteints d'hémophilie A non grave pour estimer leur risque individuel de développer des inhibiteurs lorsqu'exposés à des concentrés de FVIII.

5.4. Validité analytique

Aucune étude de validation analytique du séquençage de nouvelle génération sur les gènes *F8* et *VWF* n'a été repérée.

5.5. Données fournies par le demandeur

Le demandeur a fourni des données de profondeur de lecture par exon pour 16 échantillons (gène *F8* : tableau 8 et annexes G et H; gène *VWF* : tableau 9 et annexe I).

Tableau 8 Couverture du gène *F8* par exon et par échantillon

Gène F8	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 26	X:154065872-154066027	240	224	96	75	224	304	227	107	229	125	129	200	189	208	162	155
exon 25	X:154088707-154088883	169	188	96	78	179	243	182	96	168	106	104	166	162	218	122	125
exon 24	X:154089993-154090141	230	242	109	121	189	315	223	110	251	138	137	203	201	240	170	151
exon 23	X:154091358-154091502	257	259	118	133	235	362	255	120	225	154	157	230	226	330	188	182
exon 22	X:154124352-154124507	282	257	141	121	258	346	315	175	273	145	148	215	231	289	213	181
exon 21	X:154128141-154128226	227	225	100	108	193	298	236	127	211	143	132	207	188	231	164	155
exon 20	X:154129646-154129717	260	252	144	114	227	314	231	145	243	136	117	237	197	309	178	164
exon 19	X:154130326-154130442	246	239	120	123	213	371	275	113	232	130	107	210	242	228	156	155
exon 18	X:154132181-154132363	240	257	94	126	207	338	257	138	248	117	147	228	179	273	201	160
exon 17	X:154132571-154132799	293	285	129	144	222	397	312	150	264	190	153	277	247	283	209	202
exon 16	X:154133086-154133298	259	176	116	105	197	309	289	105	215	148	135	206	198	241	155	132
exon 15	X:154134695-154134848	185	156	101	71	164	178	187	118	131	91	113	140	128	200	134	103
exon 14	X:154156846-154159951	275	249	121	124	226	364	275	131	263	148	141	244	219	294	196	174
exon 13	X:154175973-154176182	272	224	146	138	207	397	256	125	245	150	156	251	229	296	206	204
exon 12	X:154182167-154182317	244	233	120	111	195	323	247	130	259	145	163	209	172	282	168	155
exon 11	X:154185232-154185446	231	242	112	97	226	326	256	122	218	135	134	210	196	301	184	166
exon 10	X:154189350-154189443	228	204	125	111	186	287	265	117	214	103	135	213	173	228	170	144
exon 9	X:154194245-154194416	228	203	106	121	205	294	244	96	207	122	109	226	189	118	143	142
exon 8	X:154194701-154194962	224	221	118	132	198	324	277	113	264	157	136	213	214	139	208	183
exon 7	X:154197606-154197827	252	252	123	119	236	322	251	146	246	122	136	244	218	146	205	142
exon 6	X:154212962-154213078	343	321	114	148	273	457	325	161	285	153	176	288	282	182	225	215
exon 5	X:154215512-154215580	196	217	112	96	167	261	211	112	180	110	101	182	141	123	190	143
exon 4	X:154221211-154221423	270	253	125	94	224	367	242	128	251	161	135	241	219	143	212	181
exon 3	X:154225248-154225370	274	313	114	137	260	418	317	146	306	177	192	261	265	157	219	213
exon 2	X:154227754-154227875	297	241	143	131	211	350	304	102	233	154	124	252	204	139	182	141
exon 1	X:154250685-154250827	248	218	127	127	215	309	286	130	214	149	128	234	224	109	160	179

Couverture >100 >200 >300

Tableau 9 Couverture du gène VWF par exon et par échantillon

Gène VWF	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 52	12:6058181-6058369	179	167	155	166	177	226	171	188	196	194	198	184	158	220	99	249
exon 51	12:6058952-6059049	195	208	170	181	165	248	201	182	185	221	233	192	163	244	117	292
exon 50	12:6061010-6061049	290	258	223	236	192	317	290	236	255	285	309	280	190	325	174	353
exon 49	12:6061557-6061685	273	248	264	287	197	369	272	291	289	310	317	248	265	312	164	381
exon 48	12:6062662-6062760	287	249	226	233	197	302	269	227	259	244	256	227	192	267	180	303
exon 47	12:6076652-6076768	130	123	88	103	75	109	116	146	112	127	130	141	102	132	79	152
exon 46	12:6077293-6077333	179	134	170	156	183	205	121	162	144	200	151	152	153	185	79	175
exon 45	12:6078377-6078557	123	102	121	114	82	143	133	145	120	132	116	96	107	127	61	131
exon 44	12:6080765-6080875	185	164	164	140	134	215	167	187	145	192	143	153	150	182	73	183
exon 43	12:6085277-6085426	146	122	138	142	104	178	151	140	121	170	178	110	127	175	85	150
exon 42	12:6090952-6091157	194	176	174	174	152	222	219	183	168	212	199	192	155	214	135	239
exon 41	12:6092316-6092420	204	168	147	139	180	218	196	214	177	204	206	169	138	225	111	261
exon 40	12:6094211-6094285	230	193	187	164	166	289	205	264	195	244	223	204	171	262	135	273
exon 39	12:6094729-6094831	88	52	64	47	45	71	71	76	73	74	75	59	42	63	27	93
exon 38	12:6100985-6101184	207	212	207	174	175	277	272	211	202	186	222	213	164	256	116	263
exon 37	12:6103028-6103369	186	174	158	162	150	236	190	188	172	180	180	150	143	206	110	203
exon 36	12:6103581-6103773	277	269	282	273	222	398	314	266	271	276	307	261	222	310	222	367
exon 35	12:6105168-6105388	239	250	214	204	198	327	245	221	198	256	273	242	187	242	121	297
exon 34	12:6120783-6120960	142	159	134	138	132	166	163	165	148	181	122	136	118	165	73	173
exon 33	12:6121253-6121296	213	256	258	207	192	303	229	249	237	261	251	233	203	285	199	296
exon 32	12:6122647-6122811	254	255	233	217	231	336	278	269	223	256	294	233	208	266	166	337
exon 31	12:6125255-6125398	231	236	247	209	234	369	253	276	258	283	238	224	215	277	118	334
exon 30	12:6125682-6125822	208	212	198	197	162	268	195	200	223	284	249	197	197	226	136	257
exon 29	12:6125920-6126036	191	149	159	176	132	191	195	207	179	175	205	145	143	170	105	230
exon 28	12:6127531-6128909	146	124	125	126	115	167	146	132	124	133	142	127	123	144	79	174
exon 27	12:6131066-6131201	186	214	197	219	176	322	217	208	227	235	263	188	220	236	158	298
exon 26	12:6131906-6132064	2	2	2	3	1	1	3	2	3	2	1	1	0	1	1	1
exon 25	12:6132797-6132953	224	226	211	226	183	272	222	232	216	234	220	221	202	219	97	262
exon 24	12:6134746-6134859	138	117	111	104	105	192	128	128	124	131	149	141	84	130	63	157
exon 23	12:6135072-6135212	228	165	186	177	181	247	213	204	174	246	196	198	169	212	116	256
exon 22	12:6138508-6138654	225	217	226	239	178	284	253	215	200	242	226	207	192	245	150	275
exon 21	12:6140610-6140744	207	186	199	151	171	269	202	187	201	205	202	171	159	218	134	237
exon 20	12:6143854-6143992	232	191	172	186	145	251	223	208	191	218	206	203	174	206	110	243
exon 19	12:6145554-6145657	204	190	188	194	149	248	233	167	174	207	187	196	168	190	113	215
exon 18	12:6153457-6153617	224	191	173	200	163	225	226	216	183	210	191	210	146	210	119	273
exon 17	12:6155889-6155983	242	228	218	195	190	346	269	264	221	254	301	246	178	268	175	331
exon 16	12:6161709-6161949	185	157	149	159	156	235	184	163	165	190	199	168	157	219	98	183
exon 15	12:6166023-6166238	14	13	17	13	15	26	23	22	16	19	17	16	15	23	7	21
exon 14	12:6167015-6167210	77	70	70	73	67	101	72	84	59	93	93	58	56	72	46	73
exon 13	12:6172120-6172220	115	84	94	87	99	140	117	101	93	128	111	101	88	89	49	107
exon 12	12:6173412-6173550	112	119	104	103	114	150	109	104	99	96	118	103	104	128	69	153
exon 11	12:6174303-6174439	223	211	240	235	209	301	285	237	220	272	238	228	202	251	113	298
exon 10	12:6180463-6180509	240	195	216	229	203	286	208	208	232	229	247	221	178	236	126	278
exon 9	12:6181497-6181608	147	128	126	117	127	196	139	154	154	159	143	112	89	159	78	180
exon 8	12:6182785-6182907	186	241	200	230	204	275	237	205	214	256	223	207	171	243	127	256
exon 7	12:6184501-6184717	118	127	113	140	90	138	135	119	111	159	115	115	103	135	48	146
exon 6	12:6204626-6204750	242	229	240	247	256	337	251	269	278	284	263	242	232	285	145	334
exon 5	12:6219540-6219748	254	271	249	245	230	376	280	263	250	311	295	234	228	284	149	346
exon 4	12:6220032-6220134	244	193	200	206	210	254	214	249	213	232	218	211	176	270	140	251
exon 3	12:6230340-6230504	170	181	172	119	131	200	190	164	160	187	199	162	146	195	80	221
exon 2	12:6232308-6232362	156	161	180	180	161	251	159	193	191	189	170	144	162	201	138	195
	Couverture	>100	>200	>300													

Le SNG a conservé une qualité de lecture ($Q \geq 30$) pour 94,1 % et 94,6 % de la cible dans les 2 essais de validation.

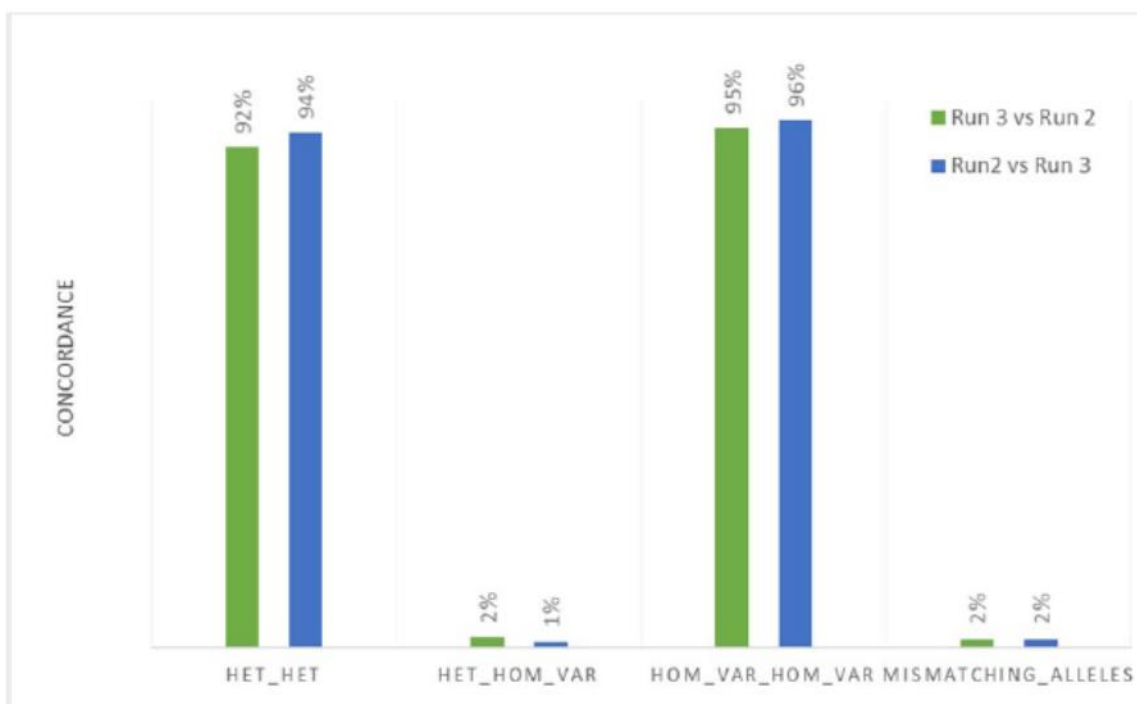
Le SNG a été validé par comparaison avec le séquençage de Sanger sur 16 échantillons témoins. Une concordance de 100 % a été obtenue entre les 2 méthodes (tableau 10).

Tableau 10 Performance du séquençage de nouvelle génération contre le séquençage de Sanger

CTRLs	Mutations détectées par analyse Sanger		Mutations détectées par analyse NGS		Concordance	Couverture position ¹	Couverture allèle mutée ²
	F8	VWF	F8	VWF	Oui/Non		
échan1	-	p.Pro1413Gln	-	p.Pro1413Gln	Oui	184	93
échan2	p.Asp2150Ala	-	p.Asp2150Ala	-	Oui	251	133
échan3	-	p.Arg1308Cys	-	p.Arg1308Cys	Oui	144	68
échan4	-	p.Thr791Met het; p.Pro812Argfs*31	-	p.Thr791Met het; p.Pro812Argfs*31	Oui	164;205	85;98
échan5	p.Glu739Lys	p.Pro1413Leu	p.Glu739Lys	p.Pro1413Leu	Oui	195	87
échan6	-	p.Arg1374His	-	p.Arg1374His	Oui	176	95
échan7	p.Trp274Ser	-	p.Trp274Ser	-	Oui	228	89
échan8	p.Asn637Ser	-	p.Asn637Ser	-	Oui	121	120
échan9	-	p.Val1229Gly; p.Asn1231Thr	-	p.Val1229Gly; p.Asn1231Thr	Oui	124; 119	124; 119
échan10	p.Met110Val	-	p.Met110Val	-	Oui	172	171
échan11	p.Gly2000Ala	-	p.Gly2000Ala	-	Oui	98	97
échan12	-	-	-	-	-	-	-
échan13	-	p.Arg854Gln	-	p.Arg854Gln	Oui	225	225
échan14	-	-	-	-	-	-	-
échan15	p.Arg2326*	-	p.Arg2326*	-	Oui	136	61
échan17	p.Lys1031Leufs*9	-	p.Lys1031Leufs*9	-	Oui	126	126
	¹ Couverture de la position (allèle normale et mutée)						
	² Couverture de l'allèle mutée						

Abréviations : CTRLs : Échantillons contrôles; échan : Échantillons; NGS : Séquençage de nouvelle génération.

Un échantillon a été testé à 2 reprises et la concordance entre les variants détectés aux 2 reprises a été déterminée selon leur présence à l'état hétérozygote, homozygote, hétérozygote dans une analyse et homozygote dans l'autre ou de mésappariements. La concordance entre les 2 essais a été jugée excellente (Figure 1).



Abréviations : Het : Hétérozygote; hom : Homozygote; run : Essai; var : Variants.

Figure 1 Concordance de détection des variants de l'échantillon 13 lors de 2 essais distincts

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse par séquençage de nouvelle génération (SNG) des gènes *F8* et *VWF* pour diagnostiquer l'hémophilie A légère et modérée et la maladie de von Willebrand. Les coûts liés à ce test sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du MSSS. L'analyse porte sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans le tableau 11. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- L'analyse proposée par le demandeur serait complémentaire au TAAN permettant la détection de l'inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 (code : 25026) chez les patients atteints d'hémophilie A grave. L'analyse serait aussi complémentaire aux tests 20087, 20122, 20143 pour les patients atteints d'hémophilie A et aux tests 20088, 20089, 20090 et 20009 pour les patients atteints de la maladie de von Willebrand. Toutes ces analyses figurent actuellement au *Répertoire*.
- L'analyse proposée pourrait toutefois remplacer le test suivant : von Willebrand type 2 (2A, 2B, 2M, 2N); *VWF* (exons 18 à 21 et 28 à 31) mutations associées (séquençage) (code : 25070) figurant au *Répertoire*. La valeur pondérée de cette analyse est de 227. En 2017-2018, 131 analyses ont été effectuées pour un coût total de 29 737 \$.
- En 2016-2017, 3 analyses de séquençage du gène *VWF* ont été acheminées

hors Québec pour un coût moyen par analyse de 3 718 \$. Dans cette même période, 6 analyses de séquençage pour le gène *F8* ont également été acheminées hors Québec pour un coût moyen par analyse de 718 \$. Le rapatriement de ces envois hors Québec serait prévu dès la première année suivant l'ajout du SNG des gènes *F8* et *VWF* au *Répertoire*.

- Les patients suspectés d'être atteints de la maladie de von Willebrand de type 2N négatifs au séquençage du gène *VWF* (exons 18-21, 28-31 [code : 25070]), recevront un séquençage complet des régions codantes du gène *VWF*. Actuellement, ce test est réalisé dans le cadre du National Program for Hemophilia Mutation Testing à Kingston, en Ontario.
- Selon les informations soumises par le demandeur, l'analyse proposée pourrait combler ces envois au laboratoire de Kingston, dont le financement dépend de l'Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Ce financement devrait prendre fin prochainement, selon le demandeur.
- Il est estimé que 65 échantillons pourraient actuellement requérir un envoi au laboratoire de Kingston pour y être analysés. Advenant que le programme ne soit plus financé, ces échantillons devraient être acheminés chez Prevention Genetics au Wisconsin aux États-Unis, où le coût³ de l'analyse par SNG est de 1 371,01 \$ pour une analyse combinée des 2 gènes.
- Le demandeur anticipe que 25, 25 et 30 analyses seraient réalisées au cours de chacune des trois prochaines années pour le diagnostic de l'hémophilie A, alors que 125 analyses par année seraient effectuées au cours de chacune des trois prochaines années pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand.
- Il est prévu que toutes ces analyses soient réalisées au CHU Sainte-Justine et qu'elles permettraient de répondre aux besoins de l'ensemble du Québec.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 576,51.

³ Prix obtenu en dollars américains (1 030 USD pour l'analyse combinée des 2 gènes), puis converti en dollars canadiens selon le taux de change en vigueur le 20 novembre 2018.

Tableau 11 Coûts liés à l'introduction au Répertoire de l'analyse par SNG des gènes *F8* et *VWF* pour le diagnostic de l'hémophilie A légère et modérée et de la maladie de von Willebrand

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : Sans ajout de l'analyse par SNG des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i>				
Analyses exons 18-21 et 28-31 du gène <i>VWF</i> (code : 25070)				
Analyses	131	131	131	393
Coûts	29 737 \$	29 737 \$	29 737 \$	89 201 \$
Envois hors Québec pour séquençage				
Analyses gène <i>F8</i>	6	6	6	18
Coûts	718 \$	718 \$	718 \$	12 924 \$
Analyses du gène <i>VWF</i>	3	3	3	9
Coûts	11 154 \$	11 154 \$	11 154 \$	33 462 \$
Envois potentiels chez Prevention Genetics				
Nombre d'analyses	65	65	65	195
Coûts	73 542 \$	73 542 \$	73 542 \$	220 626 \$
Nouveau scénario : Avec ajout de l'analyse par SNG des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i>				
Analyses SNG <i>F8</i> et <i>VWF</i>	150	150	155	455
Coûts	86 477 \$	86 477 \$	89 359 \$	262 313 \$
Impact net 1*	Situation dans laquelle le séquençage des régions codantes est fait dans le cadre du National Program for Hemophilia Mutation Testing			
	41 278 \$	41 278 \$	44 160 \$	126 716 \$
Analyses de sensibilité†	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			100 772 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			153 235 \$
Impact net 2*	Situation dans laquelle le séquençage des régions codantes est réalisé chez Prevention Genetics			
	-47 838 \$	-47 838 \$	-44 956 \$	-140 632 \$
Analyses de sensibilité†	Pour 3 ans, la réduction de coûts la plus élevée			-169 423 \$
	Pour 3 ans, la réduction de coûts la plus faible			-115 954 \$

* Impact net 1 : Coûts du SNG (coûts des analyses 25070 + coûts des envois hors Québec). Impact net 2 : Coûts du SNG (coûts des analyses 25070 + coûts des envois hors Québec + coûts des analyses des régions codantes chez Prevention Genetics).

† Les coûts présentés en analyses de sensibilité considèrent une variation du nombre d'analyses de 10 %.

Ainsi, l'ajout de l'analyse par SNG des gènes *F8* et *VWF* pour le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 127 000 \$ au cours des trois premières années, et ce, considérant que le séquençage des régions codantes du gène *VWF* serait réalisé dans le cadre du National Program for Hemophilia Mutation Testing. En revanche, si ces analyses étaient réalisées chez Prevention Genetics, l'ajout de l'analyse par SNG des gènes *F8* et *VWF* au Répertoire pourrait engendrer une réduction de coûts d'environ 141 000 \$ au cours des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

La disponibilité des analyses de séquençage des gènes *F8* et *VWF* sans frais réalisées à Kingston constitue un enjeu puisque celles-ci vont engendrer des coûts après l'interruption de leur financement.

Un volume d'analyses supplémentaires pourrait survenir par l'analyse rétrospective de patients qui ont été investigués pour l'hémophilie A ou la maladie de von Willebrand.

Le séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* tel que proposé dans sa forme actuelle ne permet pas de détecter des duplications ou de grandes délétions. D'autres gènes absents du panel pourraient aussi expliquer quelques cas. Par conséquent, certains patients pourraient demeurer sans diagnostic moléculaire.

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Hémophilie A

Le Nordic Hemophilia Council (NHC) [Armstrong *et al.*, 2015] est en faveur du diagnostic génétique pour prédire le risque de développer des inhibiteurs, pour le diagnostic des porteurs et le diagnostic prénatal. Il recommande que les 26 exons du gène *F8* soient séquencés chez les patients atteints d'hémophilie A grave qui ne présentent pas d'inversion des introns 1 et 22 et chez les patients atteints d'hémophilie A non grave.

Lorsque les analyses génétiques sont disponibles, la Fédération mondiale de l'hémophilie recommande qu'elles soient offertes aux femmes risquant d'être porteuses, afin de faciliter le conseil génétique et le diagnostic prénatal [Srivastava *et al.*, 2013].

Selon la United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation (UKHCDO), il est recommandé que tous les enfants hémophiles soient investigués pour établir la mutation causale du gène *F8* [Keeney *et al.*, 2010]. La stratégie diagnostique privilégiée est que :

- les patients atteints d'hémophilie A grave soient d'abord testés pour l'inversion de l'intron 22, puis de l'intron 1 (cette approche devrait détecter une mutation chez 45 % à 50 % de ces patients);
- les autres patients atteints d'hémophilie A grave ainsi que ceux dont l'hémophilie A est modérée ou légère requièrent l'analyse mutationnelle complète du gène *F8*.

Maladie de von Willebrand

En 2014, la UKHCDO a recommandé que les analyses génétiques soient utilisées lorsqu'elles sont bénéfiques pour la clarification du diagnostic ou de la prise en charge des patients [Laffan *et al.*, 2014]. L'analyse du gène *VWF* pourrait permettre la distinction entre la maladie de von Willebrand de type 2N de l'hémophilie A légère à modérée, et la distinction entre la maladie de von Willebrand de type 2B de la maladie de von Willebrand liée aux plaquettes. L'analyse génétique permet également de clarifier le risque de transmission héréditaire et, dans certains cas, le type de maladie de von Willebrand.

En 2012, la Société canadienne de l'hémophilie a produit un algorithme diagnostique de la maladie de von Willebrand, qui indique la possibilité de réaliser des analyses génétiques [SCH, 2012].

En 2012, l'American Society of Hematology a révisé un guide de pratique sur l'évaluation et la prise en charge des patients atteints de la maladie de von Willebrand, et le séquençage du gène *VWF* fait partie de l'algorithme diagnostique (Annexe J) [ASH, 2012].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF*

La recommandation de l'INESSS

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

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Le centre demandeur devrait fournir un algorithme d'utilisation de l'analyse plus clair précisant l'usage des analyses phénotypiques.
- ✓ Le laboratoire demandeur doit produire un plan de validation détaillé en s'appuyant sur la norme CSA Z 316.8-F18 et le faire approuver par l'INESSS.
- ✓ L'INESSS recommande que l'introduction soit conditionnelle à la production des données de validation analytique pré spécifiées par le plan de validation.

ANNEXE A

Classification des sous types de maladies de von Willebrand

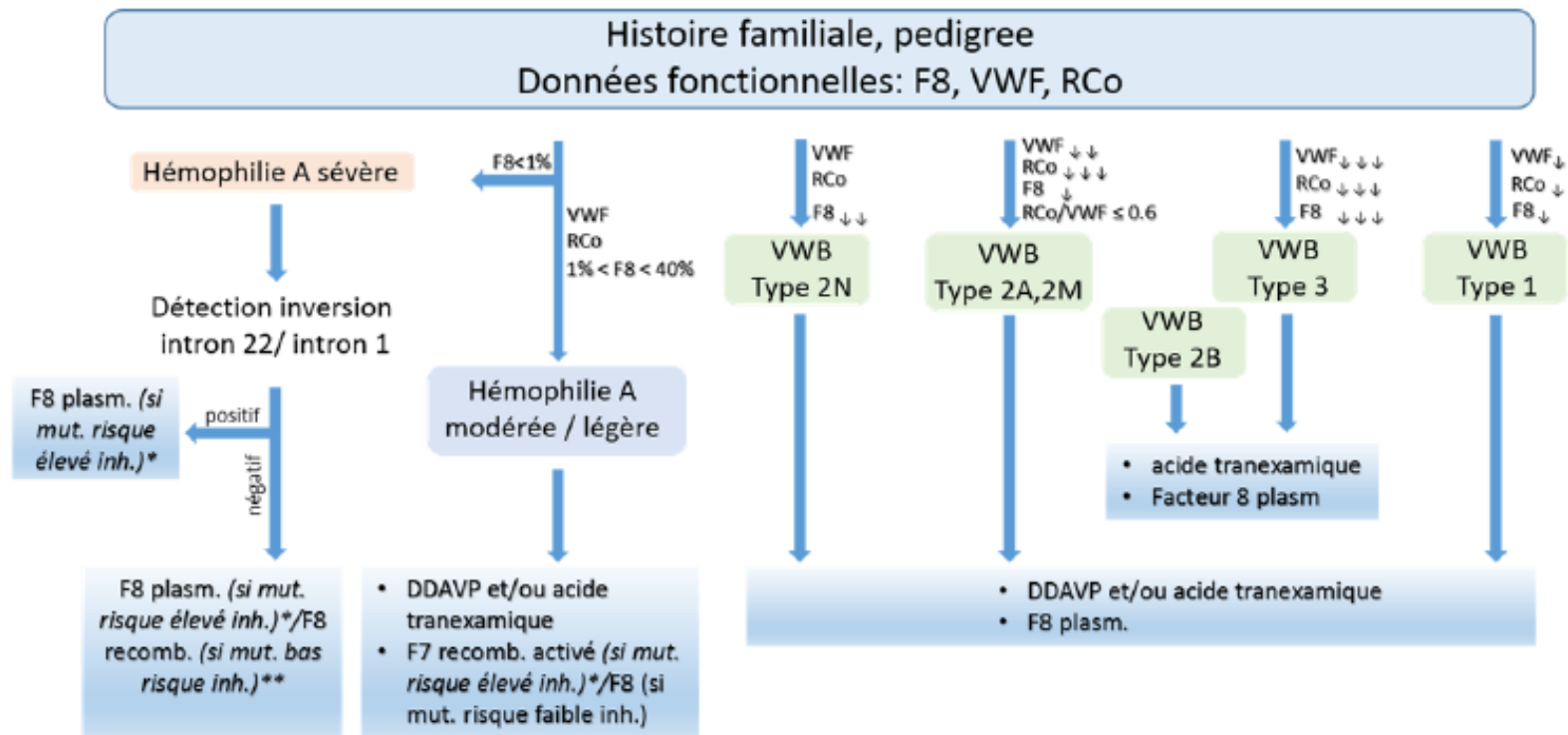
TYPE	DESCRIPTION	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES
1	Déficit quantitatif partiel en FvW	Niveau faible de FvW avec concordance fonctionnelle du FvW.	Présentation la plus commune de la MvW décelée par les laboratoires. La plupart des patients présentent un niveau moyennement réduit de FvW.
2A	Adhésion plaquettaire dépendante du FvW réduite et un déficit sélectif du multimère de FvW de haut poids moléculaire	Perte du multimère de FvW. Habituellement un niveau faible de FvW, avec discordance de l'activité du FvW. (ratios de liaison à GP1b /Ag et de liaison au collagène /Ag < 0,7).	Globalement considérée comme la présentation la plus fréquente de la MvW de type 2.
2B	Affinité accrue du FvW pour GP1b	Niveau de FvW normal à faible, typiquement avec activité FvW discordante (ratios de liaison à GP1b /Ag et de liaison au collagène /Ag généralement < 0,7), perte du FvW de haut poids moléculaire. Des cas atypiques peuvent présenter un profil différent.	Forme rare (généralement 10 % à 20 % du type 2 (~1 à 5 cas par million d'habitants). Définie par une réponse accrue avec un essai RIPA.
2M	Agglutination plaquettaire dépendante du FvW réduite sans déficit sélectif du multimère de FvW de haut poids moléculaire	Niveau de FvW normal à faible, habituellement avec discordance fonctionnelle du FvW détectée par la liaison à GPIb /Ag généralement < 0,7 et avec ratio de liaison au collagène /Ag relativement normal. Le FvW de haut poids moléculaire est présent, mais le multimère peut présenter d'autres anomalies.	Forme sous-estimée de la MvW de type 2. Probablement aussi commune que le type 2A. De rares cas présentent un ratio faible de liaison au collagène /Ag avec un ratio normal de liaison à GPIb /Ag. Certains cas présentent des ratios faibles de liaison au collagène /Ag et de liaison à GPIb /Ag.
2N	Affinité de liaison pour le facteur VIII fortement réduite	Définie par l'essai FvW : FVIIIIB, avec un ratio faible de FVIIIIB /FvW (~0,5 pour les mutations hétérozygotes et < 0,3 pour des anomalies génétiques plus graves.	Forme rare (généralement < 10 %) de la MvW de type (~1 à 5 cas par million d'habitants).
3	Déficit quasi-complet du FvW	Typiquement défini par un niveau de FvW < 2 U/dl et FVIII < 10 U/dl.	Forme rare de MvW dans les pays développés (~1 à 5 cas par million d'habitants), mais disproportionnellement plus commune dans les pays en développement.

Source : Favaloro, 2017.

Abréviations : Ag : Niveau d'antigène; FVIII : Facteur VIII; FvW : Facteur von Willebrand; GP1b : Glycoprotéine 1b; MvW : Maladie de von Willebrand; RIPA : Essai d'agglutination plaquettaire induit par la ristocétine, de l'anglais *Ristocetin-induced platelet agglutination assay*).

ANNEXE B

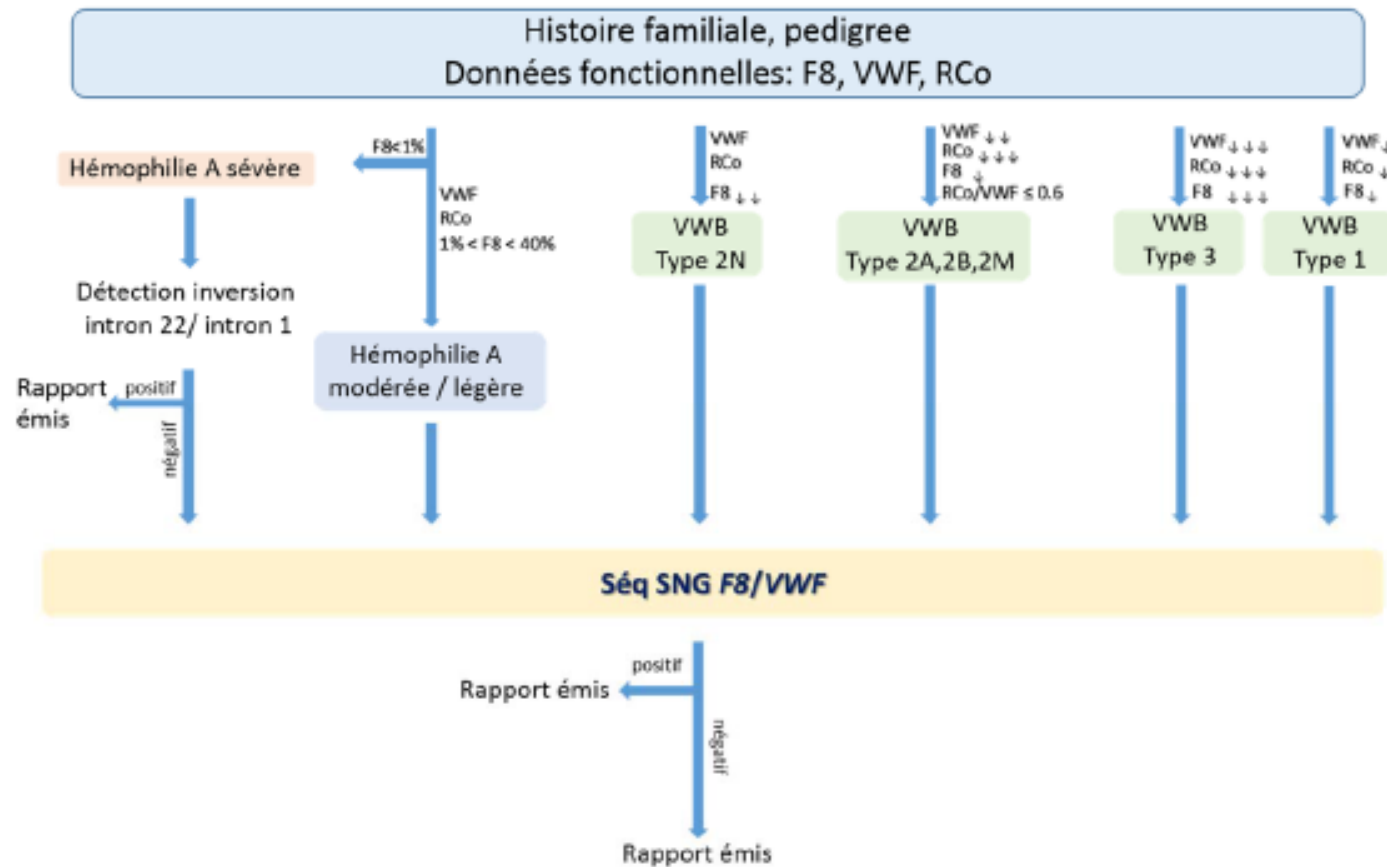
Algorithme de traitement de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand



Abréviations : DDAVP : Desmopressine; inh : Inhibiteur; mut. : Mutation; plasm. : Plasmatique;
VWB : von Willebrand; VWF : Facteur von Willebrand; RCo : Activité du FvW à se lier à GPIbR.

ANNEXE C

Algorithme diagnostique de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand proposé par le demandeur



ANNEXE D

Résumé des études sur la valeur diagnostique de séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* réalisé en parallèle

BASTIDA ET AL., 2017						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
TESTS	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL	MUTATIONS		
Facteur C, temps de coagulation, FvW : Ag, FvW : Ac,	102 patients 97 dx phénot. HA : 78 -20 graves, -58 mod/lég HB : 19 5 femmes : PO (HA) : 3 F FVIIIId : 2 F	Algorithme diagnostique proposé à la figure 1. HA sévères : 1) IVS-22, 2) IVS-1, 3) Autres HA sévères, HA modérés et légers et HB par SNG (<i>F8</i> , <i>F9</i> , <i>VWF</i>), 4) <i>F8</i> par MLPA. SNG MiSeq de toutes les régions des gènes : exons, séquences flanquantes, sites d'épissages, régions régulatrices et introns. Couverture minimale de 100x/base. Couverture de lecture moyenne des 3 gènes : 648x. 90,5 % des régions ciblées couvertes à 50x	HA graves : 20 HA mod/lég : 52 MvW : 6 HB : 19 Femmes porteuses obligatoires de HA : 3 Femmes symptomatiques : 2	IVS-22 : 11; SNG : 11; délétion par MLPA : 1 <i>F8</i> : 51; sans mutation : 1 <i>VWF</i> : 6 <i>F9</i> : 19 IVS-22 :1; <i>F8</i> : 2 <i>VWF</i> : 2	SNG : HA M/L => 6 MvW HA porteuses => 2 MvW 8 diagnostics HA corrigés par MvW : Type 2N : 2 diagnostics et 3 porteurs; Type 1 : 3 diagnostics	L'algorithme a permis de détecter des mutations <i>F8</i> et <i>F9</i> , d'assigner correctement des diagnostics de MvW et d'établir le statut des femmes porteuses dans 101/102 (99 %)

BASTIDA ET AL., 2016						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
MÉTHODES	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL	MUTATIONS		
5 déjà validées par Sanger Historique détaillé de tendance aux saignements Diagnostics de déficit pour divers facteurs de coagulation.	13H, 7F FVIII : 8 MvW : 2 FVII : 2 FIX : 1 FX : 1 FXI : 2 FXIII : 1 Fibrinogène : 3	SNG MiSeq : Panel de 23 gènes pour DHCS. Tous les exons, séquence 3' non traduite, régions flanquantes. <i>F2, F5, F7, F8, F9, F10, F11</i> et autres SNG validé par séquençage de Sanger.	HA : 7 MvW : 1 MvW : 2	<i>F8</i> : 7 <i>VWF</i> : 1 hmz <i>VWF</i> : 2 htz	HA => 1 MvW	Le diagnostic moléculaire a permis de modifier le diagnostic d'une patiente suspectée d'être porteuse symptomatique d'hémophilie A. Chez celle-ci, le SNG a permis de détecter une mutation homozygote du gène <i>VWF</i> .

Abréviations : DHCS : Désordre héréditaire de la coagulation sanguine; Dx : Diagnostic; F : Femme; FVIIIId : Déficience en FVIII; H : Homme; HA : Hémophilie A; HB : Hémophilie B; hmz : Homozygote; htz : Hétérozygote; IVS-1 : Inversion de l'intron 1 du gène *F8*; IVS-22 : Inversion de l'intron 22 du gène *F8*; MLPA : Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligature, de l'anglais *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; MvW : Maladie de von Willebrand; Phénot. : Phénotypique; PO : Porteur obligatoire; SNG : Séquençage de nouvelle génération; FvW : Ag : Concentration d'antigène du FvW; FvW : Ac : Activité du FvW.

ANNEXE E

Résumé des études sur la valeur diagnostique de séquençage de nouvelle génération des gènes *VWF*

BORRÀS ET AL., 2017 (N = 556)						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE DE MVW (N = 442)		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS (153/556)	CONCLUSION
MÉTHODES	TYPES DE MVW (N)	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL N = 480	MUTATIONS (704 VARIANTS)		
FWW : Ag, FWW : RCo, FWW : CB, FWW : FVIIIIB, Anomalies multimériques, Score de saignement, RIPA	Type 1 : 126	SNG MiSeq, 61 amplicons VWF : exons 1 à 52, sites d'épissage, ~1300 pb du promoteur.	129	Type 1 et 1H : 216 variants chez 146 pts (91,8 %), 85 variants différents. 60 mutations potentielles différentes, dont 1 par MLPA	13 reclassés 16 ajoutés (4 étaient exclus)	La caractérisation moléculaire des patients MvW permet une classification précise. Le diagnostic de 27,5 % des patients a été corrigé après le diagnostic phénotypique initial : 43 ont été réinclus, 5 patients ont été exclus et 105 patients ont été reclassés. 68 patients de classification incertaine ont été définitivement classés par SNG.
	Type 1H : 22		30		8 reclassés 16 ajoutés (9 étaient exclus)	
	Type 3 : 44		42		3 reclassés 1 ajouté	
	Porteurs type 3 : 5	Les mutations détectées ont été validées par Sanger.	26	158 variants détectés, dont 1 par MLPA	6 reclassés 27 ajoutés (19 étaient exclus)	
	Type 2A : 59		111		2 reclassés 54 ajoutés	
	Type 2A/2M : 38	Dél./dup. par MLPA sur 5 patients	34	4 variants détectés	7 reclassés 3 ajoutés	
	Type 2B : 23	Analyse des microsatellites par PCR multiplex fluorescente.	35	20 variants différents sur seulement 5 résidus	2 reclassés 14 ajoutés	
	Type 2M : 32		39	31 variants	1 reclassés 8 ajoutés (2 étaient exclus)	
	Type 2N : 9	Les régions faiblement couvertes ont été complétées par Sanger.	9	14 variants différents	Tous concordants	
	Porteurs type 2N : 10		11		1 ajouté (était exclus)	
	Type incertain : 74		14		68 reclassés 8 ajoutés (7 étaient exclus)	
	Exclus : 114		76		43 retirés, 5 ajoutés	

FIDALGO ET AL., 2016						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE (N = 92)		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
MÉTHODES	TYPE DE MVW (N)	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL (N)	MUTATIONS		
FVIII:C FvW:Ag FvW:RCo RIPA FvW:CB FvW : FVIIIIB Score de saignement	Type 1 : 7	Sanger : Types 1 et 3 : toute la séquence codante. Types 2B et 2M : exon 28 seulement. Type 2A : d'abord l'exon 28 puis les exons 11 à 16, 24 à 26, 51 et 52 au besoin. Type 2N : exons 18 à 25. Pour confirmer le diagnostic différentiel entre type 2B et MvW-LP : exon 2 de <i>GP1BA</i>. SNG : Exons 1 à 52 et au moins 20 paires de bases dans les régions flanquantes. MLPA si absence de mutation par séquençage.	7 (6 par SNG et 1 par MLPA)	1 htz pour 1 mutation associée à MvW type 3. 1 htz pour 1 mutation dominante générant un phénotype 2M chez la mère.	4 patients	Le SNG s'est avéré être une excellente technologie qui permet un diagnostic plus rapide et présente un avantage économique important. Ces résultats appuient l'ajustement à l'algorithme diagnostique proposé, qui introduit le séquençage complet du gène <i>VWF</i> par SNG lorsque FvW:RCo < 30 % ou que le ratio FVIII/FvW:Ag < 0.5. Cette approche a permis de faire la distinction entre des situations cliniques de symptômes similaires, mais de causes génétiques différentes telles que l'hémophilie A modérée et la MvW type 2N, le syndrome de Bernard-Soulier et la MvW type 2B ainsi que la MvW type 2B et la MvW liée aux plaquettes.
	Type 3 : 15		14	1 htz cmp dont le père a un phénotype MvW type 1 léger et la mère est asymptomatique. 13 hmz 1 variant homozygote dont la contribution demeure à clarifier.		
	2A : 9		9	9 avec des mutations concordantes.		
	2B : 6		5/6	1 était suspecté de syndrome de Bernard-Soulier =>2B 1 avec seulement 1 mut dans <i>GP1AB</i> =>MvW liée aux plaquettes.		
	2M : 11		11	1 patient htz composé dont la mère a un phénotype type 1.		
	2N : 12		12/12	1 htz cmp (type 2N/3) 2 patients avaient préalablement été classés HA léger.		

BOYLAN <i>ET AL.</i> , 2015						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
MÉTHODES	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE (N)	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL (N)	MUTATIONS		
FvW : Ag FvW : FVIIIIB		SNG MiSeq <i>VWF</i> Exons +20 pb Mutations validées par Sanger			4 diagnostics de <u>MvW de type 3</u> parmi 37 patients avec un diagnostic HA sans mutation F8.	Les auteurs ont conclu que l'ajout des analyses phénotypique et génotypique du FvW à l'analyse du gène F8 chez les patients qui ont reçu un diagnostic d'hémophilie A permettrait de révéler des cas d'erreur diagnostique, bien que la cause de la maladie puisse ne pas être déterminée chez certains patients.
37 HA sans mutation <i>F8</i> , dont 14 identifiés avec une concentration réduite de FvW	MvW type 3 suspectée : 4		MVW type 3 : 4	Mutation <i>VWF</i> homozygote ou hétérozygote composite.		
	MvW suspectée : 8		HA	3 porteurs d'une mutation <i>VWF</i> qui peut contribuer à un phénotype de saignement.	1 diagnostic de <u>MvW de type 1</u> parmi 65 patients avec un diagnostic HA avec mutation F8.	
	Cas non suspectés :		HA	3 porteurs d'une mutation <i>VWF</i> qui peut contribuer à un phénotype de saignement.		
65 non graves avec mutations <i>F8</i> (témoins)	MvW type 1 ou 2 suspectée : 1		MvW type 1 : 1	hétérozygote	11 autres patients présentent des mutations pouvant contribuer à des symptômes de saignements d'hémophilie A.	
	MvW suspectée : 6		HA	Aucun ne présente de mutation du gène <i>VWF</i> .		
	Cas non suspectés : 59		HA	5 porteurs d'une mutation <i>VWF</i> contribuant au phénotype de saignement.		

Abréviations : CI : Classification incertaine; Cmp : Composé; Dél./dup. : Délétion ou duplication; F : Familles; GD : Grande délétion; HA : Hémophilie A; hnz : Homozygote; hzt : Hétérozygote; MLC : Mutation de liaison au collagène; MLPA : Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligature, de l'anglais *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; MvW : Maladie de von Willebrand; MvW-LP : Maladie de von Willebrand liée aux plaquettes (gène *GP1BA*); pb : Paires de bases; PCR : Réaction en chaîne de polymérase; pts : Patients; RIPA : Test d'agrégation des plaquettes induit par la ristocétine (Ristocetin-Induced Platelet Aggregation); SNG : Séquençage de nouvelle génération; « FvW : Ag » : Concentration de FvW; « FvW : CB » : Test de liaison du FvW au collagène; « FvW : FVIIIIB » : Test de liaison du FvW au facteur VIII; « FvW : RCo » : Activité du FvW, de l'anglais *Ristocetin Cofactor*.

ANNEXE F

Résumé de l'étude sur la relation entre le génotypage *F8* et le développement d'inhibiteurs du facteur VIII chez les patients atteints d'hémophilie A non grave

ECKHARDT ET AL., 2013			
OBJECTIF	PATIENTS, MÉTHODE	RÉSULTATS	CONCLUSION
Analyser l'association entre le développement des inhibiteurs et les mutations <i>F8</i> chez les patients atteints d'hémophilie A non grave, en tenant compte de l'exposition cumulative à des concentrés de FVIII.	<u>Patients :</u> 2711 patients HA non grave (facteur VIII : 2 à 40 UI/dl) <u>Exclusion :</u> - Centres qui ont génotypé < 70 % des patients. - Patients référés à l'étude parce qu'ils présentaient déjà des inhibiteurs. Patients inclus : 1112 <u>Génotype <i>F8</i> connu :</u> 895/1112 patients (81 %) 51/59 patients avec inhibiteurs (86 %) <u>Méthodes d'analyse :</u> concentration de facteur VIII, concentration de facteurs von Willebrand, activité du facteur von Willebrand. Inhibiteurs quantifiés par la méthode Bethesda originale ou par l'essai modifié Nijmegen.	Patients avec inhibiteurs : 59/1112 (incidence cumulative 5,3 %; IC95 % : 4,0 à 6,6). Risque de développer des inhibiteurs selon le nombre de jours d'exposition : 20 : 3,5 % (IC95 % : 2,1 à 4,9); 50 : 6,7 % (IC95 % : 4,5 à 8,9); 100 : 13,3 % (IC95 % : 9,6 à 17,0). Association inhibiteurs et génotype : 19 mutations faux-sens ont été associées au développement d'inhibiteurs (333 patients). Risque de développement d'inhibiteurs selon la mutation : 0 % à 42 % après 50 jours d'exposition. Le tableau 7 détaille chaque mutation. Disparition des inhibiteurs : 42/59 patients : Inhibiteurs indétectables après une période médiane de 45 semaines (IQR : 13 à 108) -12 : Après thérapie d'éradication; -30 : Disparition spontanée; -14 : inhibiteurs sont demeurés présents; -3 : Statut des inhibiteurs inconnu à la fin du suivi.	L'étude démontre le potentiel du génotypage <i>F8</i> pour estimer les risques individuels de développer des inhibiteurs chez les patients atteints d'hémophilie A non grave.

Abréviations : FVIII : Facteur VIII; FvW : Facteur von Willebrand; HA : Hémophilie A; N : Nombre.

ANNEXE G

Pourcentage de la cible codante couverte par au moins 50 lectures pour le gène *F8* obtenue par exon par échantillon

Gène <i>F8</i>	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 26	X:154065872-154066027	100	100	100	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 25	X:154088707-154088883	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 24	X:154089993-154090141	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 23	X:154091358-154091502	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 22	X:154124352-154124507	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 21	X:154128141-154128226	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 20	X:154129646-154129717	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 19	X:154130326-154130442	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 18	X:154132181-154132363	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 17	X:154132571-154132799	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 16	X:154133086-154133298	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 15	X:154134695-154134848	100	100	100	73	100	100	100	100	100	94	100	100	100	100	100	90
exon 14	X:154156846-154159951	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 13	X:154175973-154176182	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 12	X:154182167-154182317	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 11	X:154185232-154185446	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 10	X:154189350-154189443	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 9	X:154194245-154194416	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 8	X:154194701-154194962	100	100	100	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 7	X:154197606-154197827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 6	X:154212962-154213078	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 5	X:154215512-154215580	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 4	X:154221211-154221423	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 3	X:154225248-154225370	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 2	X:154227754-154227875	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 1	X:154250685-154250827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ANNEXE H

Pourcentage de la cible codante couverte par au moins 30 lectures pour le gène *F8* par exon par échantillon

Gène <i>F8</i>	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 26	X:154065872-154066027	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 25	X:154088707-154088883	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 24	X:154089993-154090141	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 23	X:154091358-154091502	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 22	X:154124352-154124507	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 21	X:154128141-154128226	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 20	X:154129646-154129717	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 19	X:154130326-154130442	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 18	X:154132181-154132363	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 17	X:154132571-154132799	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 16	X:154133086-154133298	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 15	X:154134695-154134848	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 14	X:154156846-154159951	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 13	X:154175973-154176182	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 12	X:154182167-154182317	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 11	X:154185232-154185446	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 10	X:154189350-154189443	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 9	X:154194245-154194416	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 8	X:154194701-154194962	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 7	X:154197606-154197827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 6	X:154212962-154213078	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 5	X:154215512-154215580	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 4	X:154221211-154221423	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 3	X:154225248-154225370	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 2	X:154227754-154227875	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 1	X:154250685-154250827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ANNEXE I

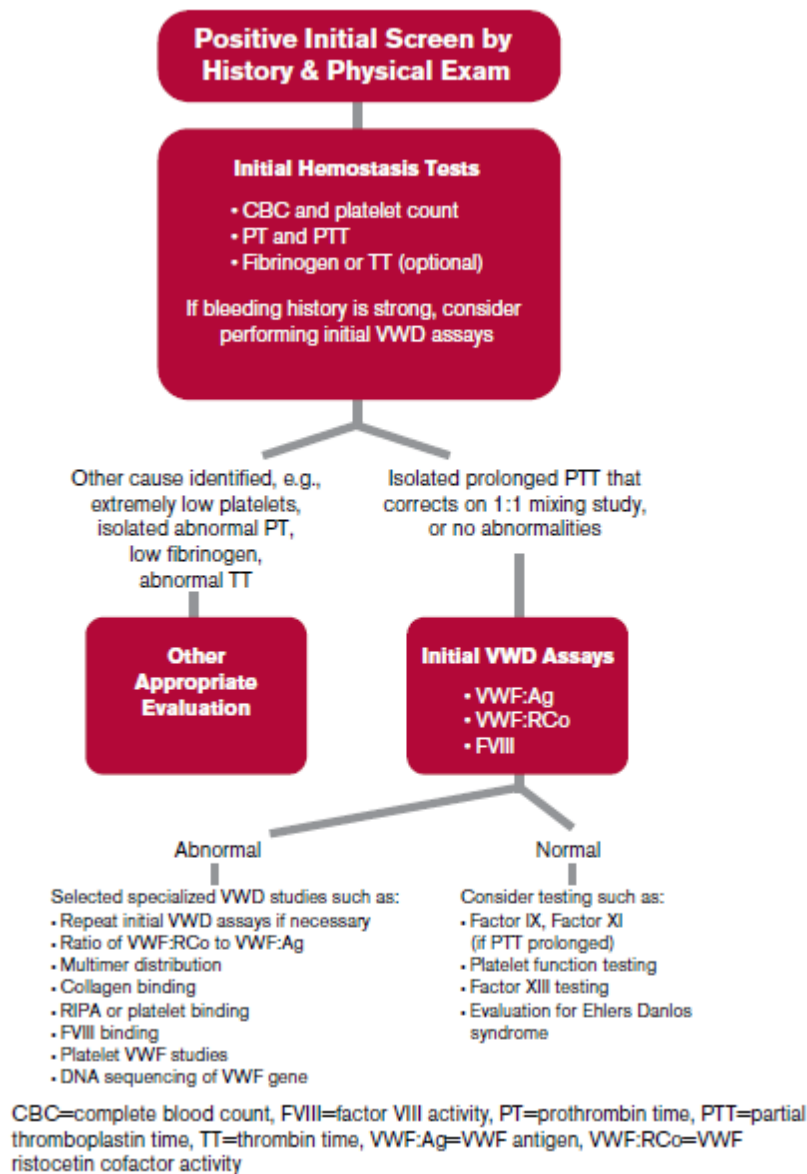
Pourcentage de la cible codante couverte par au moins 30 lectures pour le gène VWF obtenue par exon par échantillon

Gène VWF	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 52	12:6058181-6058369	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 51	12:6058952-6059049	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 50	12:6061010-6061049	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 49	12:6061557-6061685	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 48	12:6062662-6062760	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 47	12:6076652-6076768	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 46	12:6077293-6077333	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 45	12:6078377-6078557	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 44	12:6080765-6080875	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 43	12:6085277-6085426	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 42	12:6090952-6091157	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 41	12:6092316-6092420	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 40	12:6094211-6094285	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 39	12:6094729-6094831	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	100	30	100
exon 38	12:6100985-6101184	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 37	12:6103028-6103369	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 36	12:6103581-6103773	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 35	12:6105168-6105388	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 34	12:6120783-6120960	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 33	12:6121253-6121296	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 32	12:6122647-6122811	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 31	12:6125255-6125398	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 30	12:6125682-6125822	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 29	12:6125920-6126036	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 28	12:6127531-6128909	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 27	12:6131066-6131201	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 26	12:6131906-6132064	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
exon 25	12:6132797-6132953	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 24	12:6134746-6134859	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 23	12:6135072-6135212	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 22	12:6138508-6138654	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 21	12:6140610-6140744	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 20	12:6143854-6143992	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 19	12:6145554-6145657	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 18	12:6153457-6153617	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 17	12:6155889-6155983	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 16	12:6161709-6161949	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 15	12:6166023-6166238	8	9	7	8	10	34	22	25	1	13	15	6	2	25	0	17
exon 14	12:6167015-6167210	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 13	12:6172120-6172220	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 12	12:6173412-6173550	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 11	12:6174303-6174439	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 10	12:6180463-6180509	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 9	12:6181497-6181608	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 8	12:6182785-6182907	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 7	12:6184501-6184717	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 6	12:6204626-6204750	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 5	12:6219540-6219748	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 4	12:6220032-6220134	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 3	12:6230340-6230504	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 2	12:6232308-6232362	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Note : Les exons 15 et 26 ne sont pas couverts par le SNG, ils sont analysés par séquençage de Sanger.

ANNEXE J

Algorithme diagnostique de la maladie de von Willebrand et d'autres désordres de la coagulation



RÉFÉRENCES

- American Society for Hematology (ASH). 2012 clinical practice guideline on the evaluation and management of von Willebrand disease (VWD). Washington, DC : ASH; 2012. Disponible à : <http://www.hematology.org/Clinicians/Guidelines-Quality/Quick-Ref/528.aspx>.
- Armstrong E, Astermark J, Baghaei F, Berntorp E, Brodin E, Clausen N, et al. Nordic hemophilia guidelines. Nordic Hemophilia Council (NHC); 2015. Disponible à : http://www.nordhemophilia.org/library/Files/PDF-skjol/NordicGuidelinesCongenitalHaemophilia_2017.pdf.
- Bastida JM, Gonzalez-Porras JR, Jimenez C, Benito R, Ordonez GR, Alvarez-Roman MT, et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. *Thromb Haemost* 2017;117(1):66-74.
- Bastida JM, Del Rey M, Lozano ML, Sarasquete ME, Benito R, Fontecha ME, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia* 2016;22(4):590-7.
- Borràs N, Batlle J, Perez-Rodriguez A, Lopez-Fernandez MF, Rodriguez-Trillo A, Loures E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Comprehensive genetic analysis by next-generation sequencing of 480 patients. *Haematologica* 2017;102(12):2005-14.
- Boylan B, Rice AS, De Staercke C, Eyster ME, Yaish HM, Knoll CM, et al. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. *J Thromb Haemost* 2015;13(6):1036-42.
- Duan X, Tang M, Zhang J, Yu H, Xu R. Promising coagulation factor VIII bypassing strategies for patients with haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25(6):539-52.
- Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, Astermark J, Brons PP, Castaman G, et al. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood* 2013;122(11):1954-62.
- Favaloro EJ. Diagnosis or exclusion of von Willebrand disease using laboratory testing. *Methods Mol Biol* 2017;1646:391-402.
- Fidalgo T, Salvado R, Corrales I, Pinto SC, Borràs N, Oliveira A, et al. Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: Impact of NGS. *Thromb Haemost* 2016;116(1):17-31.

- Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. Practice guidelines for the molecular diagnosis of haemophilia A. Londres, Angleterre : Clinical Molecular Genetics Society (CMGS), United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO); 2010. Disponible à : http://www.acgs.uk.com/media/774613/haemophilia_a_bpg_revision_sept_2011_approved.pdf.
- Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014;167(4):453-65.
- Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: Clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14(2):337-47.
- Oldenburg J et Albert T. Novel products for haemostasis – current status. *Haemophilia* 2014;20(Suppl 4):23-8.
- Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: The FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood* 2016;128(16):2007-16.
- Société canadienne de l'hémophilie (SCH). Qu'est-ce que l'hémophilie ? [site Web]. Montréal, Qc : SCH; 2018. Disponible à : <https://www.hemophilia.ca/fr/quest-ce-que-lhemophilie/> (consulté le 2 novembre 2018).
- Société canadienne de l'hémophilie (SCH). Lignes directrices pour le diagnostic et la prise en charge de la maladie de von Willebrand. Montréal, Qc : SCH; 2012. Disponible à : https://www.hemophilia.ca/wp-content/uploads/2018/08/SCH_VWD_POCKET_GUIDE_FR-final.pdf.
- Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013;19(1):e1-47.
- World Federation of Hemophilia (WFH). Report on the Annual Global Survey 2015. Montréal, Qc : WFH; 2016. Disponible à : <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1669.pdf>.

**Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux**

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

