

MYOPATHIES D'ÉTIOLOGIE INDÉTERMINÉE (WESTERN BLOT)

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1 Société, établissement ou organisme demandeur :

Centre universitaire de santé McGill.

1.2 Date de demande d'examen : 29 juin 2012

1.3 Date de l'avis : 2 avril 2013

Mise en garde :

Le présent avis est fondé sur les informations scientifiques et commerciales [déposées par le(s) demandeur(s) ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire] selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE(S)

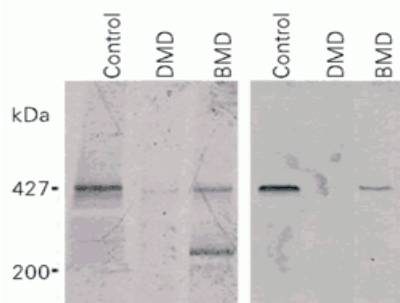
2.1 Nom de la technologie :

Analyse du déficit en calpaïne-3, dysferline ou dystrophine par *Western blot* concernant le diagnostic différentiel d'une myopathie d'étiologie inconnue.

2.2 Description brève de la technologie :

Le *Western blot* (WB) permet de visualiser la présence ou non d'une protéine spécifique à l'intérieur d'un mélange complexe (biopsie musculaire dans ce cas-ci). Les protéines sont d'abord purifiées et séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Ensuite, elles sont transférées et fixées à une membrane par buvardage. La détection de la protéine d'intérêt se fait en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre elle. L'abondance de la protéine et de ses sous-fragments, le cas échéant, peut être évaluée semi-quantitativement (voir figure 1).

Figure 1. Analyse de la dystrophine par *Western blot* (adaptée de Vainzof et Zatz, 2003).



2.3 Société ou développeur : D^r John Richardson, pathologiste au CUSM.

2.4 Licence(s) :

2.5 Brevet, le cas échéant :

2.6 Statut d'homologation (*Santé Canada, FDA*) : ne s'applique pas.

2.7 Valeur pondérée : 209,05.

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

3.1 Patients ciblés :

Personnes atteintes d'une myopathie d'origine indéterminée.

3.2 Description de la ou des maladies visée(s) :

La myopathie est une affection des fibres musculaires d'origine inflammatoire, endocrinienne, toxique, infectieuse ou génétique. En effet, plus de 600 défauts héréditaires sont liés à l'atrophie progressive des muscles squelettiques (dystrophie musculaire - DM) (<http://www.musclegenetable.fr>). La DM de Duchenne est la forme la plus commune touchant 1 garçon sur 3500, caractérisée par un déficit en dystrophine, codée par le gène *DMD* situé sur le chromosome X [Pichavant *et al.*, 2011; Arahata *et al.*, 1989]. La calpaïne-3 est une protéase du cytosol dont l'activité auto-lytique aberrante est responsable de la forme récessive de la « *Limb Girdle Muscular Dystrophy* » ou LGMD2A [Richard *et al.*, 1995]. La déficience en dysferline est responsable de la LGMD2B et de la myopathie Myoshi [Illa *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1998]. Le tableau 1 résume les principales anomalies protéiques liées aux DM.

3.3 Nombre de patients visés : 18 analyses/an.

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

Génétique et neuropathologie.

3.5 Modalités d'administration du test : biopsie musculaire.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique :

Complémentaire au diagnostic terminal d'un trouble dystrophique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle :

L'immunohistochimie (IHC) et le WB sont des techniques complémentaires utilisées pour évaluer l'expression des protéines impliquées dans la DM. Il est recommandé de tester l'immunoréactivité d'un tissu musculaire avec plusieurs anticorps simultanément et d'interpréter les résultats dans un contexte multi-protéique [Anderson et Davison, 1999]. L'étalon or demeure l'analyse génétique, mais tester plusieurs gènes simultanément est long et coûteux. De plus, l'association entre une mutation et une pathologie n'est pas toujours directe [Barresi, 2011]. Un algorithme diagnostique de la LGMD2A est présenté à titre d'exemple et illustre l'importance des différentes analyses requises à l'identification d'une maladie précise (annexe).

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie :

L'analyse pathologique et histochimique d'une biopsie musculaire fournit des informations sur la gravité et le stade de la maladie, la présence d'inflammation ou d'anomalies mitochondriales et aide à caractériser certaines myopathies congénitales [Navarro *et al.*, 2009]. Dans la majorité des cas, l'IHC doit être réalisée avec plusieurs anticorps monoclonaux dans le but de poser le bon diagnostic. Dans ces situations, le WB peut servir d'analyse complémentaire [Laval et Bushby, 2004]. Parfois les changements d'expression sont plus subtils et l'IHC seule peut conduire vers un diagnostic incertain; dans ces cas-là le WB est essentiel [Teijeira *et al.*, 1998]. Le WB possède une valeur diagnostique majeure pour la plupart des maladies récessives où la mise en évidence d'un déficit de marquage d'une protéine spécifique ne peut indiquer directement le gène en cause [Barresi, 2011].

4.4 Le coût de la technologie et des options :

Pas d'informations transmises par le demandeur.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 La pertinence clinique (validité et utilité cliniques) et la validité analytique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Ne s'applique pas.

5.1.2 Valeur diagnostique

Tableau 1. Principales anomalies protéiques reliées aux dystrophies musculaires

Maladie	Gène, transmission	Analyse protéique par <i>Western blot</i>
Dystrophie musculaire Duchenne (DMD)	<i>DMD</i> , liée au chromosome X	Dystrophine absente complètement ou très réduite.
Dystrophie musculaire Becker (DMB)	<i>DMD</i> , liée au chromosome X	Dystrophine réduite en poids moléculaire, réduite en quantité ou complètement absente.
Porteurs DMD/DMB	<i>DMD</i> , liée au chromosome X. Mosaïsme germlinal	Dystrophine réduite de façon non homogène (<i>patchy</i>).
LGMD 2A	<i>CAPN3</i> , autosomale récessive chromosome 15q	Les bandes correspondantes à la Calpaïne 3 peuvent être réduites de façon variable.
LGMD 2B / myopathie Miyoshi	<i>DYSF</i> , autosomale récessive chromosome 2p	Dysferline absente ou très réduite.

Pathak et ses collaborateurs [2010] ont publié une étude dont l'objectif était d'étudier la fréquence de la LGMD2A dans la population indienne. Les données histopathologiques et protéiques (WB et IHC) de 171 cas cliniquement suspectés de LGMD, de dystrophie musculaire ou de myopathies non classées ont été analysées. Le WB a permis d'identifier respectivement 36 et 39 patients avec un déficit complet et partiel en calpaïne-3.

Fanin et ses collaborateurs [2009] ont publié les résultats d'une analyse quantitative de la calpaïne-3 sur 519 biopsies musculaires provenant de patients avec une LGMD ou une myopathie non classée. De plus, une analyse fonctionnelle de l'activité auto-lytique de la

calpaïne-3 a été réalisée sur 108 cas LGMD avec une quantité normale de protéines. L'analyse génotypique a permis de mettre en évidence 94 cas de LGMD2A portant 66 mutations différentes du gène *CAPN3*. Les auteurs ont montré qu'un déficit en quantité de protéine de même qu'en activité auto-lytique prédit la LGMD2A dans 80 % et 88 % des cas, respectivement.

En 2006, Moore et ses collaborateurs ont publié une étude dont l'objectif était de déterminer la distribution des patients orientés vers un centre national de diagnostic de la LGMD parmi les sous-types connus de la maladie. Une biopsie musculaire a été pratiquée dans le but de réaliser des analyses histopathologiques et immunodiagnostiques dont les résultats, jumelés aux caractéristiques cliniques individuelles, ont servi à orienter un test génétique. Parmi tous les patients testés, 23 ont été exclus en raison d'un diagnostic autre que LGMD. Parmi les 289 autres patients, 266 avaient suffisamment de matériel biopsique pour réaliser une analyse microscopique complète et 121 pour une analyse en WB anti-calpaïne 3 et anti-dysferline. Les analyses combinées ont permis de déterminer une calpaïnopathie dans 12 % des cas (n = 31), une dysferlinopathie dans 18 % des cas (n = 47), une sarcoglycanopathie dans 15 % des cas (n = 40), une dystroglycanopathie dans 15 % des cas (n = 40) et une caveolinopathie dans 1,5 % des cas (n = 4). Quelques cas (9 %, n = 24) avaient une réduction de l'expression de plus d'une protéine. Un génotype précis a été établi pour 83 patients.

En 2003, Tagawa et ses collaborateurs ont publié une étude où l'IHC et le WB ont été utilisés pour évaluer un diagnostic clinicopathologique préalable de LGMD non classée (N=53) ou de myopathie Myoshi (N=28), deux formes de dysferlinopathie. Un déficit en dysferline par IHC et par WB a été observé pour 31 patients, soit 19 % des cas supposés de LGMD et 75 % des cas de MM (voir le tableau 2). Une analyse génétique a été faite seulement chez ces 31 patients. Une mutation du gène *DYSF* a été mise en évidence chez 15 d'entre eux.

Tableau 2. Valeur diagnostique de l'analyse protéique par Western blot (Tagawa et al., 2003)

Diagnostic clinique (N)	Quantité protéines WB*	Marquage IHC†
LGMD (53)	Déficit : 10 (19 %)	Négatif : 9; Faible : 1
	Normal : 43 (81 %)	Normal : 16
		Négatif : 2; Anormal : 27
MM (28)	Déficit : 21 (75 %)	Négatif : 14; Faible : 5; Anormal : 2
	Normal : 7 (25 %)	Négatif : 1; Variable : 6
Contrôles (26)‡	Normal : 26 (100 %)	Normal : 13; Anormal : 13

Abréviations : IHC : immunohistochimie; LGMD : *Limb Girdle Muscular Dystrophy*; MM : Myopathie Myoshi; N : nombre de patients; WB : *Western blot*.

*À partir d'analyses densitométriques, le déficit est défini à partir d'une quantité de dysferline <30%.

† Normal : marquage membranaire clair, comme le muscle normal; Négatif : absence de marquage; Faible : Marquage normal de faible intensité et Anormal : marquage accumulé au cytoplasme sans les membranes ou marquage normal en mosaïque positif/négatif.

‡Les patients contrôles sont des patients atteints de maladies neuromusculaires autres que la dysferlinopathie (DMD, DMB, myopathies inflammatoires, myopathies mitochondriales, myopathies congénitales et neuropathies toutes diagnostiquées cliniquement et par IHC).

5.2 Validité clinique

Termes	Présence	Absence	Sans objet
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)	X		
Valeur prédictive négative (VPN)	X		
Rapport de vraisemblance (LR)		X	
Courbe ROC		X	
Exactitude		X	

Saenz et ses collaborateurs [2005] ont présenté une étude clinique multicentrique dont l'objectif était d'analyser les données cliniques, moléculaires et biochimiques d'une cohorte de 314 patients, dont 282 présentaient un phénotype LGMD. Parmi ceux-ci, les données cliniques ont été jugées suffisantes pour suspecter ou infirmer une calpaïnopathie (181 et 32 patients, respectivement). Une incertitude est demeurée pour 19 autres patients.

Comme outil de diagnostic, les auteurs ont calculé que la sensibilité et la spécificité du WB seul étaient de 52,5 % et 87,8 %, respectivement. Considérant les informations issues du phénotype clinique et des informations biochimiques combinées, la VPP d'une calpaïnopathie était de 91 %. Toutefois, lorsqu'une des analyses est manquante, cette valeur varie entre 78,3 % et 73,7 %, dépendamment des informations disponibles. Lorsque les deux tests sont négatifs, la probabilité que le patient soit confirmé LGMD2A (*CAPN3* muté) est de 12,2 %.

Doriguzzi et ses collaborateurs ont étudié l'expression de la dystrophine sur 201 biopsies musculaires par IHC et WB. L'utilisation combinée des deux techniques a permis de détecter 100 % des cas de dysferlinopathies [Doriguzzi *et al.*, 1997].

5.3 Validité analytique (ou technique)

Termes	Présence	Absence	Sans objet
Répétabilité			X
Reproductibilité			X
Sensibilité analytique			X
Spécificité analytique			X
Effet de matrice			X
Concordance			X
Corrélation	X		

Gallardo et ses collaborateurs [2011] ont présenté une étude clinique dont l'objectif était de vérifier la corrélation entre le niveau d'expression de la dysferline à partir d'une biopsie musculaire ou d'un échantillon de monocytes du sang périphérique par WB et IHC. La série de cas comprenait 21 patients contrôles atteints de myopathies sans mutations du gène *DYSF* et 17 patients avec une dysferlinopathie confirmée par la présence de deux mutations dans *DYSF*. Au moyen du WB, une bonne corrélation des niveaux d'expression de la dysferline entre les monocytes et le muscle a été observée parmi les 21 cas contrôles ($114,3 \pm 17,8$ % vs $105 \pm 16,3$ %, respectivement) de même que pour les 17 cas de dysferlinopathie ($0,1 \pm 0,2$ % vs $1,1 \pm 4,3$ %, respectivement). Concernant l'utilisation de l'IHC seule sur les biopsies musculaires, 6 des 17 cas de dysferlinopathie et 13 des 21 cas contrôles ont montré un marquage correspondant à de la dysferline souvent anormalement localisée.

5.4 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

European Federation of Neurological Societies (2007) : l'analyse quantitative des protéines par *Western blot* peut être une technique supplémentaire utile pour élucider des anomalies protéiques primaires et secondaires [Norwood *et al.*, 2007].

DMD Care Considerations Working Group (2010) : les critères décisifs pour le diagnostic de la DMD doivent être basés sur des analyses en immunohistochimie et en immunobuvardage à partir d'une biopsie musculaire et doivent être interprétés par un pathologiste neuromusculaire expérimenté [Bushby *et al.*, 2010].

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

6.1 Impact sur les ressources matérielles et humaines :

Aucune étude n'a été repérée.

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

Aucune étude coût-efficacité n'a été repérée.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique) : L'utilisation d'une approche en multiplex permet de tester plusieurs anticorps à la fois et donc de maximiser le tissu biopsique [Anderson et Davison, 1999]. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine musculaire contrôle (myosine, par exemple) permet de s'assurer qu'il n'y a pas d'erreur d'interprétation causée par une charge protéique variable entre les échantillons [Barresi, 2011].

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Myopathies d'étiologie indéterminée (Western blot)

Le statut de la technologie diagnostique :

☐ *Établie*

☒ *Innovatrice*

☐ *Expérimentale (pour la recherche uniquement)*

☐ *Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète*

La recommandation de l'INESSS :

☐ *Avis de recommandation d'introduction*

☐ *Avis de refus d'introduction*

☒ *Avis de réévaluation**

- Pas assez d'information pour se prononcer : formulaire d'addition incomplet, aucun article fourni, peu de données probantes sur la validité.
- Pas de participation à des contrôles externes.

La décision de l'INESSS quant aux travaux indiqués, le cas échéant :

☐ *Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon*

☐ *Décision de production d'un guide d'usage optimal*

☐ *Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance*

☐ *Aucun*

* Des informations complémentaires sont nécessaires pour que le comité puisse prendre position et émettre une recommandation. Des contacts avec des experts ont été établis et de nouvelles informations pourraient être disponibles pour le mois de mars.

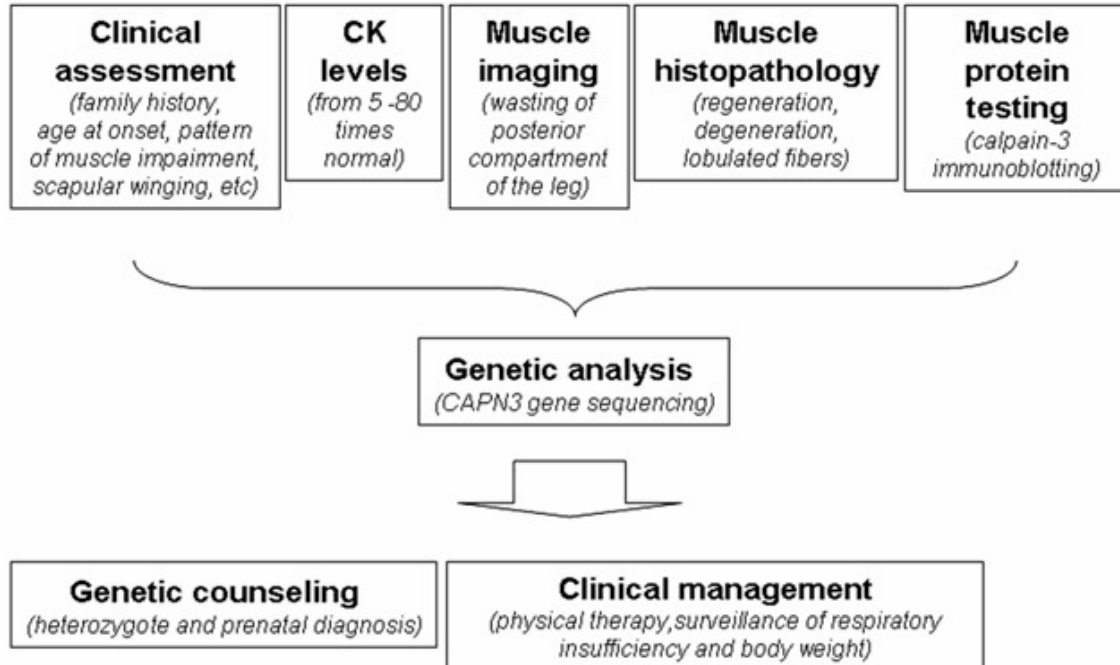
RÉFÉRENCES

- Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 1999;154(4):1017-22.
- Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, et al. Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(18):7154-8.
- Barresi R. From proteins to genes: immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. *Skelet Muscle* 2011;1(1):24.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010;9(1):77-93.
- Doriguzzi C, Palmucci L, Mongini T, Chiado-Piat L, Maniscalco M, Restagno G. Systematic use of dystrophin testing in muscle biopsies: results in 201 cases. *Eur J Clin Invest* 1997;27(4):352-8.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Tasca E, Angelini C. How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Eur J Hum Genet* 2009;17(5):598-603.
- Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gonzalez-Quereda L, Flix B, et al. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. *PloS one* 2011;6(12):e29061.
- Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49(1):130-4.
- Kros JM, Gorlia T, Kouwenhoven MC, Zheng PP, Collins VP, Figarella-Branger D, et al. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66(6):545-51.
- Laval SH et Bushby KM. Limb-girdle muscular dystrophies--from genetics to molecular pathology. *Neuropathol Applied Neurobiol* 2004;30(2):91-105.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20(1):31-6.
- Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(10):995-1003.
- Navarro C, Teijeira S, San Millan B. Pathology and diagnosis of muscular dystrophies. *Adv Exp Med Biol* 2009;652:1-11.
- Norwood F, de Visser M, Eymard B, Lochmuller H, Bushby K. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur J Neurol* 2007;14(12):1305-12.

- Pathak P, Sharma MC, Sarkar C, Jha P, Suri V, Mohd H, et al. Limb girdle muscular dystrophy type 2A in India: a study based on semi-quantitative protein analysis, with clinical and histopathological correlation. *Neurol India* 2010;58(4):549-54.
- Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* 2011;19(5):830-40.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995;81(1):27-40.
- Saenz A, Leturcq F, Cobo AM, Poza JJ, Ferrer X, Otaegui D, et al. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain* 2005;128(Pt 4):732-42.
- Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 2003;211(1-2):23-8.
- Teijeira S, Teijeiro A, Fernandez R, Navarro C. Subsarcolemmal expression of utrophin in neuromuscular disorders: an immunohistochemical study of 80 cases. *Acta Neuropathol* 1998;96(5):481-6.
- Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(5):543-55.

ANNEXE

Suspected LGMD2A



Tiré de : Pagon RA, Bird TD, Dolan CR *et al.*. GeneReviews™ [Internet], Seattle (WA), University of Washington, Seattle, 1993, Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>.