

Toilettage R.H.N. Bio V5.2

Propositions Association Nationale des Patriciens de Génétique Moléculaire (ANPGM)

- 1) Forfaitiser les activités de génétique moléculaire en distinguant le pré-analytique, l'analytique et le post-analytique
- 2) Privilégier l'utilisation du NGS et valoriser l'interprétation des résultats et les validations fonctionnelles
- 3) Proposer au remboursement NABM des examens « simples » ne répondant aux critères de l'innovation (exemple de quelques examens de pharmacogénétique)
- 4) Actualiser et harmoniser les cotations NABM et RIHN pour le diagnostic prénatal

Chapitre 16 Tests d'amplification génique et d'hybridation moléculaire (diagnostic prénatal exclu)

16.C Génome humain

FORFAITS PRE-ANALYTIQUES

Nous proposons de distinguer deux forfaits pré-analytiques (FG1 et FG2) : « Accueil cas index » et Accueil apparenté » et de supprimer tous les examens élémentaires de la V5.2. Le montant des forfaits a été calculé en prenant en compte les examens élémentaires de la V5.2.

FG1 : Forfait « Accueil cas index » (RIHN 370)

N200 (BHN 30) + **N206** (BHN 50) + **N207** (BHN 100) + **N193** (BHN 130) + **N014** (BHN 10) + **N015** (BHN 50)

- le contrôle préanalytique du dossier (N200),
- la discussion clinico-biologique pour vérifier la pertinence de la prescription et orienter la démarche diagnostique (N207),
- l'enregistrement des données cliniques du patient dans les bases informatiques (N206),
- et l'extraction d'acides nucléiques [extraction (N193), dosage (N014) et contrôle de qualité des acides nucléiques (N015)].

FG2 : Forfait « Accueil apparenté » (RIHN 220 ou RIHN80*)

N200 (BHN 30) + **N206** (BHN 50) + **N193** (BHN 130) + **N014** (BHN 10)

- le contrôle préanalytique du dossier (N200),
- et l'enregistrement des données cliniques du patient dans des bases informatiques (N206)
- et l'extraction d'acides nucléiques [extraction (N193), dosage (N014) et contrôle de qualité des acides nucléiques (N015)].

*La réception d'échantillons déjà extraits donnera lieu à une cotation RIHN 80

FORFAITS ANALYTIQUES et POST-ANALYTIQUES

FG3 à FG7 : Forfaits NGS

La DGOS dans le cadre du PNMR2 a soutenu le déploiement des nouvelles approches de séquençage (NGS pour *Next Generation Sequencing*) et permis l'acquisition des équipements *ad hoc* par les laboratoires (circulaire n°DGOS/R1/2011/154 du 22 avril 2011 relative à la répartition entre les régions des crédits du fonds pour la modernisation des établissements de santé publics et privés). Il s'agit d'une activité innovante non inscrite au référentiel BHN V5.2 qui présente la particularité d'inclure une partie technique (*Wet-Lab* - production des données NGS) et une partie interprétative fondées sur des approches bio-informatiques (*Dry-Lab*). Les laboratoires éligibles au RIHN devront avoir la maîtrise et réaliser ces deux parties (mise en œuvre et interprétation).

Cinq forfaits sont proposés : 4 en lien direct avec le NGS (**FG3 à FG6**) et 1 correspondant à la recherche chez un apparenté d'une mutation identifiée par NGS (**FG7**)

Les quatre forfaits NGS (FG3, FG4, FG5 et FG6) proposés dépendent de la taille des régions d'intérêt séquencées dont la couverture sera de 100% et la profondeur de lecture d'au moins 30X. Les régions considérées comme d'intérêt non couvertes par le NGS devront être analysées par Sanger.

| Forfaits | Séquençage | Mise en œuvre | Interprétation | Total |
|------------|-------------------|---------------|----------------|-------------|
| FG3 | < 20 kb | RIHN 2 000 | RIHN 400 | RIHN 2 400 |
| FG4 | > 20 et < 100 kb | RIHN 4 000 | RIHN 1 200 | RIHN 5 200 |
| FG5 | > 100 et < 500 kb | RIHN 6 000 | RIHN 1 800 | RIHN 7 800 |
| FG6 | > 500 kb | RIHN 8 000 | RIHN 4 000 | RIHN 12 000 |

Les forfaits incluent les différentes étapes suivantes :

- la préparation, l'amplification et le séquençage de la librairie
- l'interprétation des données NGS (analyses bio-informatiques, interrogation des bases de données et utilisation de logiciels de prédiction)
- la confirmation par une deuxième méthode de la ou des mutations identifiées quelle que soit la méthode et l'étude de la ségrégation familiale quand cela est possible
- l'interrogation des bases de données bibliographiques et la confrontation aux données clinico-biologiques
- la rédaction d'un compte-rendu diagnostique explicite.

Le forfait > 500 kb peut correspondre au WES (« *Whole Exome Sequencing* ») voire au WGS (« *Whole Genome Sequencing* »). Lorsque ces analyses sont réalisées pour des trios, un seul forfait d'interprétation est comptabilisé.

Le 5^{ème} forfait (FG7 ; RIHN 500) concerne la recherche chez un apparenté d'une mutation identifiée par NGS. Cette activité n'est pas nécessairement réalisée dans les laboratoires produisant des données de NGS et doit être valorisée.

Pour mémoire V5.2 Montpellier :

- **N317** (BHN 1400) : Mise au point d'une PCR quantitative à façon pour vérification d'une anomalie détectée en microarray (comprend le design des oligonucléotides, la commande et l'analyse PCRq des parents et du propositus)
- **N300** (BHN 120) : Recherche d'une mutation ou SNP connu

L'un des enjeux du déploiement du NGS concerne l'interprétation des variations de séquence qui, pour certaines, imposeront de réaliser des analyses fonctionnelles (cf. MacArthur DG *et al.* Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014, 508 :469–76).

Nous proposons deux forfaits pour les tests fonctionnels (FG8 et FG9) :

FG 8 : « Tests fonctionnels ex vivo à partir de matériel issu du patient (ARN ou Protéines) » : RIHN 500

Ce forfait concerne la confirmation du caractère délétère d'une mutation identifiée par analyse de l'ADN génomique en étudiant les ARN ou les protéines du patient.

FG9 « Tests fonctionnels ex vivo imposant de recourir à la mutagenèse dirigée ou à un clonage en minigène » : RIHN 5000

Ce forfait concerne la confirmation du caractère délétère d'une mutation identifiée par analyse de l'ADN génomique lorsque le gène s'exprime dans un tissu non accessible.

Pour mémoire V5.2 Montpellier

N314 (BHN 3000) : Tests fonctionnels *ex vivo* : test d'épissage en minigène (clonage, mutagenèse dirigée, culture cellulaire, extraction, ARN, RT, séquence)

N315 (BHN 3000) : Tests fonctionnels *ex vivo* : co- sédimentation, co-immunoprécipitation, co-immunolocalisation, Pulse-chase, FRET

Forfaits concernant des examens hors NGS indispensables au diagnostic d'un certain nombre de maladies héréditaires

FG 10 Diagnostic par « Southern Blot »

RIHN 460 [N194 x 2 (BHN 80 x 2) + N037 (BHN 300)]

Concerne un nombre limité de maladies héréditaires pour lesquelles le Southern blot reste nécessaire au diagnostic (Exemple : Dystrophie myotonique de type 1)

FG 11 Diagnostic par « Etude de la méthylation »

RIHN 300 [N019 x 2 (BHN 100° + N036 (BHN 200)]

Concerne un nombre limité de maladies héréditaires pour lesquelles l'étude de la méthylation reste nécessaire au diagnostic (Exemples : syndromes de Prader-Willi et Angelman)

FG 12 Diagnostic par « Recherche de réarrangements génomiques ciblés »

RIHN 500 [N318 (BHN 500)]

Concerne un nombre limité de maladies héréditaires pour lesquelles la recherche de réarrangements récurrents reste nécessaire au diagnostic (Exemple : Amyotrophies spinales proximales)

FG 13 Diagnostic par « Détection des mutations par expansion de microsatellites »

RIHN 140 [N903 (BHN 140)]

Concerne un nombre limité de maladies héréditaires pour lesquelles la détection des mutations par expansion de microsatellites reste nécessaire au diagnostic (Exemple : maladie de Huntington)

FG 14 Diagnostic par « Détection des mutations ponctuelles par Sanger »

RIHN 200 [N036 (BHN 200)]

Concerne un nombre limité de maladies héréditaires pour lesquelles la détection de mutations ponctuelles reste nécessaire au diagnostic (Exemple : hémoglobinopathies)

Propositions d'inscription à la NABM

Nous proposons l'inscription à la NABM de cinq examens simples concernant le domaine de la pharmacogénétique :

- Recherche de la mutation *c.-49_-48insTA* du gène *UGT1A1*
- Recherche de la mutation *c.219-237G>A* du gène *CYP3A5*
- Recherche des mutations *c.238G>C*, *c.719T>C*, *c.460C>T* du gène *TPMT*
- Recherche des mutations *c.1905+1G>A*, *c.2846A>T*, *c.1679T>G* du gène *DPYD*
Recherche du SNP rs12979860 (*C>T*) du gène *IL28B*

Il existe déjà un examen de pharmacogénétique inscrit au **chapitre 14 « Médicaments – Toxiques »** de la NABM [« Recherche de l'allèle *HLA-B*5701* » (cotation B200)].

Propositions d'actualisation sous-chapitre 17-02 de la NABM

« Actes de Biologie moléculaire en vue du diagnostic des maladies génétiques »

La construction du chapitre 17 « Diagnostic prénatal » de la NABM et du chapitre 17-02 est ancienne et avait vocation à prendre en charge non seulement le diagnostic prénatal lui-même mais également les examens réalisés sur :

- les cas index, parents, fratrie : **B500 par individu étudié** (maladies héréditaires du métabolisme et mucoviscidose)
- les cas index, les parents et/ou collatéraux à risque (retard mental lié à l'X fragile, les myopathies de Duchenne et Becker, les hémophilies et les autres affections notamment Syndrome de Charcot-Matthew-Tooth, la myotonie dystrophique ou Steinert ou l'amyotrophie spinale) : **B500 par individu étudié**

Il est nécessaire :

- de recentrer la prise en charge à la NABM sur le **seul diagnostic prénatal** et de supprimer les références à la fratrie, aux collatéraux à risque et aux parents dans le sous-chapitre 17-02
- de prendre en compte les recommandations professionnelles de l'ANPGM qui préconise de réaliser le diagnostic prénatal en double sur deux aliquotes et d'étudier la contamination materno-foetale et la bonne identité des ADN par l'étude des parents.
- d'harmoniser les cotations pour le diagnostic prénatal sur antécédents familiaux
- d'individualiser la cotation ou les cotations du diagnostic prénatal sur signes d'appel échographiques et qui concerne moins d'une dizaine de pathologies : achondroplasie, sclérose tubéreuse de Bourneville, dystrophie myotonique de Steinert, syndrome de Prader-Willi, syndrome d'Angelman, mucoviscidose et amyotrophie spinale.

On rappelle que l'activité de génétique moléculaire prénatale concerne plus de 250 pathologies parmi lesquelles moins d'une vingtaine représentent 75% des diagnostics prénatals.

En 2011, **2783 diagnostics prénatals** ont été réalisés (activité constante sur les trois dernières années) et plus de 2000 concernaient l'une des pathologies suivantes : amyotrophie spinale (153), β -thalassémies (65), mucoviscidose (495), polykystose rénale autosomique récessive (26), drépanocytose (226), hémophilies (35), myopathie de Duchenne et Becker (68), syndrome de l'X-fragile (113), achondroplasie (196), Maladie de Charcot-Marie-Tooth (12), Dystrophie myotonique de Steinert (174), Maladie de Huntington (40), Neurofibromatose de type 1 (22), Sclérose tubéreuse de Bourneville (60), Syndrome de Prader-Willi (89), Disomies uniparentales (280).

Parmi les 2783 diagnostics prénatals, environ 800 ont été réalisés sur signes d'appels échographiques, les autres sur antécédents familiaux.

Propositions d'actualisation sous-chapitre 17-07 de la NABM

"Actes de génétique moléculaire réalisés sur l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel".

L'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel est en constante augmentation. La HAS a rendu en janvier 2011 un avis concernant la « Détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel ».

Le diagnostic prénatal non invasif de plusieurs maladies héréditaires est en cours de développement et une réflexion conjointe avec le diagnostic prénatal non invasif des aneuploïdies doit être envisagé.