
ÉVALUER

LES TECHNOLOGIES DE SANTÉ

RAPPORT D'EVALUATION

Annexes

Séquençage haut débit ciblant un panel de gènes dans la prise en charge médicale des aminoacidopathies les plus fréquentes

17 juillet 2025

Sommaire

Annexe 1. Recherche documentaire	3
Annexe 2. Consultations des experts	8
Annexe 3. Consultation des parties prenantes	43
Annexe 4. Modalités pratiques de réalisation du test au BH4 (PNDS)	53

Annexe 1. Recherche documentaire

Stratégie de recherche

La stratégie de recherche dans les bases de données bibliographiques est construite en utilisant, pour chaque sujet, soit des termes issus de thésaurus (descripteurs), soit des termes libres (du titre ou du résumé). Ils sont combinés avec les termes décrivant les types d'études.

Les tableaux A, B et C présentent la stratégie de recherche dans les bases de données Medline, Embase et Lissa. Le nombre total de références obtenu par la recherche dans les bases de données est 235.

Tableau A : Stratégie de recherche documentaire dans les bases de données Medline et Embase via Proquest

Type d'étude / Sujet		Période de recherche
	Termes utilisés	
RECOMMANDATIONS, META-ANALYSES ET REVUES SYSTEMATIQUES		
Étape 1	MESH.EXACT.EXPLODE("Metabolism, Inborn Errors") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("inborn error of metabolism") OR TI,AB,IF(inborn PRE/0 error* PRE/2 metabolism*)	Janv. 2018 – janv. 2025
AND		
Étape 2	MESH.EXACT.EXPLODE("High-Throughput Nucleotide Sequencing") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("high throughput sequencing") OR TI,AB,IF(next-gen sequence* OR next-gen sequencing* OR next-generation sequence* OR next-generation sequencing* OR ngs) OR MESH.EXACT.EXPLODE("genomics") OR TI,IF(*genomic*) OR TI,AB,IF((high-throughput OR high-through-put) AND (nucleotide sequence* OR nucleotide sequencing* OR sequence analys* OR sequencing*)) OR MESH.EXACT.EXPLODE("Sequence Analysis, DNA") OR MJEMB.EXACT("DNA sequencing") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Genetic Testing") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("genetic screening")	
AND		
Étape 3	TI,IF(recommendation[*1]) OR TI,IF(recommandation[*1]) OR TI,IF(guideline[*1]) OR TI,IF(best PRE/0 practice[*1]) OR TI,IF(statement[*1]) OR TI,IF(consensus) OR TI,IF(position PRE/0 paper) OR MESH.EXACT(health planning guidelines) OR MJEMB.EXACT(consensus development) OR MJEMB.EXACT(Practice Guideline) OR DTYPE(practice guideline) OR DTYPE(guideline) OR DTYPE(consensus development conference) OR DTYPE(consensus development conference, NIH)	
OR		
Étape 4	TI,IF(metaanalys[*2]) OR TI,IF(meta PRE/0 analys[*2]) OR TI,IF(systematic[*4] PRE/1 review[*3]) OR TI,IF(systematic[*4] PRE/1 overview[*3]) OR TI,IF(systematic[*4] PRE/1 search[*3]) OR TI,IF(systematic[*4] PRE/1 research[*3]) OR TI,IF(pooled PRE/0 analysis) OR MESH.EXACT("Network Meta-Analysis") OR DTYPE(meta-analysis) OR DTYPE(systematic review) OR PUB(cochrane database syst rev OR "Cochrane database" OR "Cochrane review" OR "Cochrane Library") OR EMB.EXACT(meta-analysis) OR EMB.EXACT(systematic review) OR EMB.EXACT("network meta-analysis")	
AMINOACIDOPATHIES CONGENITALES		
Étape 5	MESH.EXACT.EXPLODE("High-Throughput Nucleotide Sequencing") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("high throughput sequencing") OR TI,AB,IF(next-gen sequence* OR next-gen sequencing* OR next-generation sequence* OR next-generation sequencing* OR ngs) OR TI,AB,IF((high-throughput OR high-through-put)	Janv. 2018 – janv. 2025

Type d'étude / Sujet		
	Termes utilisés	Période de recherche
	AND (nucleotide sequence* OR nucleotide sequencing* OR sequence analys* OR sequencing*)	
AND		
Étape 6	(MESH.EXACT("Amino Acid Metabolism, Inborn Errors") OR MJEMB.EXACT("disorders of amino acid and protein metabolism") OR MESH.EXACT("Prolidase Deficiency") OR MJEMB.EXACT("prolidase deficiency") OR MESH.EXACT("Hyperglycinemia, Nonketotic") OR MESH.EXACT("Multiple Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency") OR MJEMB.EXACT("multiple acyl CoA dehydrogenase deficiency") OR MESH.EXACT("Tyrosinemas") OR MJEMB.EXACT("tyrosinemia") OR MESH.EXACT("Maple Syrup Urine Disease") OR MJEMB.EXACT("maple syrup urine disease") OR MESH.EXACT("Hyperlysinemias") OR MJEMB.EXACT("hyperlysinemia") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Albinism") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("albinism") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Hyperhomocysteinemia") OR MJEMB.EXACT("hyperhomocysteinemia") OR MESH.EXACT("Alkaptonuria") OR MJEMB.EXACT("alkaptonuria") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Phenylketonurias") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("phenylketonuria") OR MESH.EXACT("Propionic Acidemia") OR MJEMB.EXACT("propionic acidemia") OR TI,IF(phenylketonuria* OR phenylalanine PRE/0 hydroxylase PRE/0 deficiency)) AND TI,IF(diagnos* OR detect* OR test*))	
OR		
Étape 7	MESH.EXACT("Amino Acid Metabolism, Inborn Errors -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Amino Acid Metabolism, Inborn Errors -- genetics") OR MJEMB.EXACT("disorders of amino acid and protein metabolism -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Prolidase Deficiency -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Prolidase Deficiency -- genetics") OR MJEMB.EXACT("prolidase deficiency -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Hyperglycinemia, Nonketotic -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Hyperglycinemia, Nonketotic -- genetics") OR MESH.EXACT("Multiple Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Multiple Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency -- genetics") OR MJEMB.EXACT("multiple acyl CoA dehydrogenase deficiency -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Tyrosinemas -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Tyrosinemas -- genetics") OR MJEMB.EXACT("tyrosinemia -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Maple Syrup Urine Disease -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Maple Syrup Urine Disease -- genetics") OR MJEMB.EXACT("maple syrup urine disease -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Hyperlysinemias -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Hyperlysinemias -- genetics") OR MJEMB.EXACT("hyperlysinemia -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Albinism -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Albinism -- genetics") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("albinism -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Hyperhomocysteinemia -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Hyperhomocysteinemia -- genetics") OR MJEMB.EXACT("hyperhomocysteinemia -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Alkaptonuria -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Alkaptonuria -- genetics") OR MJEMB.EXACT("alkaptonuria -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Phenylketonurias -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Phenylketonurias -- genetics") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("phenylketonuria -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Propionic Acidemia -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Propionic Acidemia -- genetics") OR MJEMB.EXACT("propionic acidemia -- diagnosis")	

Type d'étude / Sujet		
	Termes utilisés	Période de recherche
ANOMALIES CONGENITALES DU CYCLE DE L'UREE		
Étape 5		Janv. 2018 – janv. 2025
AND		
Étape 8	(MESH.EXACT.EXPLODE("Urea Cycle Disorders, Inborn") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("urea cycle disorder") OR TI,IF(urea)) AND TI,IF(diagnos* OR detect* OR test*)	
OR		
Étape 9	MESH.EXACT.EXPLODE("Urea Cycle Disorders, Inborn -- diagnosis") OR MESH.EXACT.EXPLODE("Urea Cycle Disorders, Inborn -- genetics") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("urea cycle disorder -- diagnosis")	

Tableau B : Stratégie de recherche documentaire dans la base de données Lissa

	Termes utilisés	Période de recherche
DONNEES FRANCOPHONES COMPLEMENTAIRES		
Étape 10	((Aminoacidopathies congénitales.tl) OU (Aminoacidopathies congénitales.mc) OU (phénylcétonuries.tl) OU (phénylcétonuries.mc) OU (tyrosinémies.tl) OU (tyrosinémies.mc) OU (leucinose.tl) OU (leucinose.mc)) ET (2018->2025.an) ET ((séquençage nucléotidique à haut débit.tl) OU (séquençage nucléotidique à haut débit.mc) OU (nouvelle generation.tl) OU (genom*.tl) OU (techniques génétiques.mc))	Janv. 2018 – janv. 2025
OR		
Étape 11	((Anomalies congénitales du cycle de l'urée.tl) OU (Anomalies congénitales du cycle de l'urée.mc)) ET (2018->2025.an) ET ((séquençage nucléotidique à haut débit.tl) OU (séquençage nucléotidique à haut débit.mc) OU (nouvelle generation.tl) OU (genom*.tl) OU (techniques génétiques.mc))	

Tableau C : Stratégie de recherche documentaire relative à la homocystinurie dans les bases de données Medline, Embase et Lissa

	Termes utilisés	Période de recherche
HOMOCYSTINURIE		
Étape 12	MESH.EXACT.EXPLODE("High-Throughput Nucleotide Sequencing") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("high throughput sequencing") OR TI,AB,IF(next-gen sequence* OR next-gen sequencing* OR next-generation sequence* OR next-generation sequencing* OR ngs) OR TI,AB,IF((high-throughput OR high-through-put) AND (nucleotide sequence* OR nucleotide sequencing* OR sequence analys* OR sequencing*))	Janv. 2018 – janv. 2025
AND	MESH.EXACT("Homocystinuria") OR MESH.EXACT("Homocystinuria -- diagnosis") OR MESH.EXACT("Homocystinuria -- genetics") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("homocystinuria -- diagnosis") OR MJEMB.EXACT.EXPLODE("homocystinuria") OR TI,AB,IF(Homocystinuria) OR TI,AB,IF(Cystathionine beta Synthase Deficiency)	

Sites internet consultés

Date de dernière consultation : 21/01/2025

1. Académie nationale de médecine - <http://www.academie-medecine.fr>
2. Association des cytogénéticiens de langue française (ACLF) - <http://www.eacrf.org>
3. Association nationale des praticiens de génétique moléculaire (ANPGM) - <https://anpgm.fr/>
4. Catalogue et index des sites médicaux francophones (CISMeF) - <http://www.cismef.org/>
5. Filière G2M. Maladies rares héréditaires du métabolisme - <https://filiere-g2m.fr/>
6. French national reference center for inherited metabolic diseases in children and adults (MAEMA) - <https://maladiesrares-necker.aphp.fr/mamea-eng/>
7. Haute Autorité de Santé (HAS) - <http://www.has-sante.fr>
8. Orphanet - <https://www.orpha.net/fr>
9. Société française de médecine prédictive et personnalisée (SFMPP) - <https://www.sfmpp.org/>
10. Société française de pédiatrie (SFP) - <http://www.sfpediatricie.com>
11. Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme (SFEIM) - <http://www.sfeim.org/>
12. Adelaide Health Technology Assessment (AHTA) - <http://www.adelaide.edu.au/ahta/>
13. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) - <http://www.ahrq.gov/>
14. Alberta Health Services - <https://www.albertahealthservices.ca/>
15. American Academy of Pediatrics (AAP) - <https://www.aap.org/>
16. American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) - www.acmg.net
17. Association for Clinical Genetic Science (ACGS) - www.acgs.uk.com
18. Association for Molecular Pathology (AMP) - <https://www.amp.org>
19. Association médicale canadienne - <https://www.cma.ca/>
20. Australasian Society for Inborn Errors of Metabolism (ASIEM) - <https://www.hgsa.org.au//asiem>
21. Austrian Institute for Health Technology Assessment (AIHTA) - <https://aihta.at/page/homepage/en>
22. BMJ Best Practice - <https://bestpractice.bmj.com>
23. British Inherited Metabolic Diseases Group (BIMDG) - <https://bimdg.org.uk>
24. British Society for Genetic Medicine (BSGM) - <https://www.bsgm.org.uk/>
25. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (CADTH) - <https://www.cadth.ca/fr>
26. Canadian Association of Centres for the Management of Hereditary Metabolic Diseases (GARROD) - <https://garrod.ca/>
27. Canadian College of Medical Geneticists (CCMG) - www.ccmg-ccgm.org
28. Centre fédéral d'expertise des soins de santé (KCE) - <https://kce.fgov.be/fr>
29. Cochrane Library - <https://www.cochranelibrary.com/>
30. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) - <https://www.emqn.org/>
31. European Reference Network for Hereditary Metabolic Disorders (METABERN) - <https://metab.ern-net.eu>
32. European registry and network for Intoxication type Metabolic Diseases (E-IMD) - <https://www.e-imd.org/recommendations>
33. European Society of Human Genetics (ESHG) - <https://www.eshg.org/home>

34. Galactosemia Foundation - <https://galactosemia.org/resources/clinical-guidelines/>
35. Guidelines International Network (GIN) <http://www.g-i-n.net/>
36. Human Genetics Society of Australasia (HGSA) - <https://www.hgsa.org.au/>
37. Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) - <https://www.inesss.qc.ca/>
38. International Network of Agencies for Health Technology Assessment (INAHTA) - <http://www.inahta.org/>
39. Medical Services Advisory Committee (MSAC) - <http://www.msac.gov.au>
40. National Institute for Health and Care Research (NIHR) - <https://www.journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/#/>
41. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) - <http://www.nice.org.uk>
42. National Institutes of Health (NIH) - <http://www.nih.gov/>
43. National Organization for Rare Disorders (NORD) - <https://rarediseases.org>
44. National Society for Phenylketonuria (NSPKU) - <https://nspku.org/guidelines/>
45. National Society of Genetic Counselors (NSGC) - <https://www.nsgc.org>
46. Paediatric Society of New Zealand - <http://www.paediatrics.org.nz/>
47. Royal College of Paediatrics and Child Health (RCPCH) - <http://www.rcpch.ac.uk/>
48. Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) - <http://www.sign.ac.uk>
49. Société canadienne de pédiatrie (SCP) - <http://www.cps.ca>
50. Society for Inherited Metabolic Disorders (SIMD) - <https://www.simd.org/>
51. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) - <https://www.ssiem.org/>
52. Swedish Agency for Health Technology Assessment and Assessment of Social Services (SBU) - <https://www.sbu.se/en>
53. Tripdatabase - <http://www.tripdatabase.com/index.html>

Annexe 2. Consultations des experts

Professionnels consultés comme experts (groupe de travail)

La HAS a constitué un groupe d'experts pluridisciplinaire dont la composition est détaillée ci-dessous :

- Pr. Jean-François BENOIST (généticien) ;
- Dr. Apolline IMBARD (généticienne) ;
- Dr. Jean-Baptiste ARNOUX (pédiatre) ;
- Dr. Anaïs BRASSIER (pédiatre) ;
- Dr. Cécilia MARELLI (neurologue).

Ces experts ont été consultés à distance par l'envoi d'un questionnaire standardisé et d'une version provisoire du rapport d'évaluation comprenant l'analyse élaborée par la HAS. Cette consultation, menée du 20 décembre 2024 au 10 janvier 2025, a permis aux experts d'exprimer leur opinion sur chaque champ évalué. Par ailleurs, les experts également répondu à des questions complémentaires entre le 14 février 2025 et le 3 mars 2025.

QUESTIONNAIRE ENVOYE AUX EXPERTS

« Séquençage haut débit ciblant un panel de gènes dans la prise en charge médicale des aminoacidopathies »

Décembre 2024

Dans le cadre de l'évaluation de la technique de séquençage haut débit ciblé des panels de gènes dans le diagnostic des aminoacidopathies, la HAS souhaite recueillir le point de vue des professionnels de santé à titre individuel (*intuitu personae*) en tant qu'experts de leur domaine afin qu'ils expriment leurs positions individuelles argumentées et fondées sur leurs connaissances, leurs expériences et leurs pratiques, au regard des données de la littérature.

À cet effet, nous vous adressons le rapport d'évaluation provisoire et le présent questionnaire, et vous remercions par avance pour le temps que vous consacrerez à cette consultation.

- Nous vous saurions gré de bien vouloir argumenter vos remarques et propositions éventuelles pour nous permettre d'envisager toute modification nécessaire.
- Si vous estimez qu'une question dépasse le cadre de votre expertise, vous pouvez l'indiquer en mentionnant « sans opinion » dans le cadre de réponse.
- Vos réponses seront intégralement reproduites dans la version finale du rapport que la HAS rendra publique à l'issue de sa validation. Jusqu'à cette échéance, les documents qui vous ont été transmis demeurent par conséquent strictement confidentiels.
- Enfin, nous vous rappelons que les synthèses présentées dans le rapport qui vous a été adressé sont provisoires. Elles vous ont été transmises pour vous permettre d'apporter tout commentaire qui pourrait éclairer les instances décisionnelles de la HAS. Les conclusions définitives seront publiées après la sollicitation des organismes professionnels et associations de patients en tant que parties prenantes au sens du décret n°2013-413 du 21 mai 2013 et après examen du rapport d'évaluation par les instances de validation de la HAS.

CONCERNANT LE RAPPORT DANS SON ENSEMBLE

Q1	Avez-vous des commentaires sur la clarté du rapport provisoire ?
	<i>Expert 1 : très clair une fois la notion de mutations pertinente éliminée</i>
	<i>Expert 2 : Le terme « variant » doit remplacer le terme « mutation » qui contient une notion de pathogénicité. Le terme « mutation » est à bannir car imprécis et induit des erreurs d'appréciation. L'utilisation du terme « variant » suivi de son appréciation si nécessaire (pathogène, probablement pathogène, de signification inconnue, bénin, probablement bénin) est plus juste.</i>
	<i>Expert 3 : Rapport assez clair. Parfois des approximations sur des points de détails de maladies (description ou prise en charge standard), mais rien de rédhibitoire.</i>
	<i>Expert 4 : le rapport est clair.</i> <i>Cependant je suis troublée par la sélection bibliographique (même si je comprends bien qu'il s'agit de critères PICOS) car finalement il suffit de savoir (pour d'autres maladies) qu'il existe bien une concordance entre NGS et Sanger. Ensuite il y a plein de série / publications dans les aminoacidopathies avec des panels génétiques. Du coup, les mutations sélectionnées ne sont probablement pas réalistes (on a soit pas de publications pour certaines maladies comme Tyr 1 et Homocystinurie) et parfois seulement deux études chinoises médiocres... difficile de s'en tenir à ça pour conclure</i>
	<i>Expert 5 : Globalement ce rapport provisoire est assez clair dans la description des pathologies en question. Toutefois certains points cliniques pourraient être mieux précisés.</i> <i>Remarques mineures :</i> - <i>Troubles du Cycle de l'urée : 1) dans la description clinique le déficit en ASL est différent des autres troubles du cycle de l'urée car les patients ont une atteinte cognitive et hépatique dont le pronostic n'est pas lié que aux décompensations et à leur prévention ; 2) La partie prise en charge aigue et à long terme pourrait mériter des précisions : par exemple la supplémentation en acides aminées est plutôt exceptionnelle ; 3) si jamais le panel doit être limité aux gènes du troubles du cycle de l'urée, il faudrait mieux préciser la caractérisation biologique de chaque trouble</i> - <i>Leucinose : 1) dans la partie clinico-biologique il serait important de mentionner le fait que la leucinose fait partie des maladies dépistées à la naissance en France actuellement ; 2) dans la partie prise en charge : le traitement par épuration extrarénale n'est pas mentionnée ; le fait que il y a des mélanges spécifiques d'acides aminées pour leucinose non plus ; la greffe hépatique est une option mais elle n'est pas proposée de façon systématique, au moins en France ; 3) la description de l'odeur typique des urines comme « odeur douce du cérumen » ne me semble pas classique ; on parle plutôt de odeur de sirop d'érable</i> <i>Déficit en CBS : 1) l'analyse des mutations permet seulement partiellement de prédire des formes responsables ou pas à la B6, car pour certaines mutations la sensibilité à la B6 n'est pas connue et car souvent les mutations sont présentes à l'état hétérozygote composite. C'est surtout le test de réponse biologique qui permet d'affirmer la responsivité à la B6 ; 2) il faudrait mentionner que le dépistage néonatal du déficit en CBS (par dosage de la méthionine) est actuellement réalisé en France ; il faudrait discuter les limites de ce dépistage pour les formes légères de déficit en CBS, notamment celles qui vont répondre à la B6. En pratique, l'éventuel panel proposé pour le déficit en CBS et les diagnostics différentiels a comme dénominateur commun biologique l'hyperhomocystéinémie et il pourrait être utilisé dans le contexte de dépistage positif (marqueur= augmentation de la méthionine) mais aussi pour les patients avec hyperhomocystéinémie (avec ou sans hyper méthioninémie).</i>
Q2	Avez-vous des remarques sur les éléments de contexte fournis dans le rapport ?

	Expert 1 : non
	Expert 2 : Manque dans le contexte la date depuis laquelle le NGS est coté par les RIHN car permet d'avoir une estimation du recul que l'on a sur cette technique et de son intégration dans les stratégies diagnostiques
	Expert 3 : Pour qu'un panel soit cliniquement utile, il faut qu'une série de dosage passe très régulièrement afin de réduire le délai de rendu de résultats. Pour être lancée, chaque série d'analyse doit compter un nombre minimum de patients. Les panels actuels regroupent donc des maladies parfois assez différentes pour atteindre le nombre minimum de patients, en particulier pour les maladies rares. Ce rapport étudie les maladies par sous-groupes (cycle de l'urée, hyperphénylalaninémie...) ce qui j'espère n'obligera pas les laboratoires à découper les panels actuels en plus petits panels, ce qui aurait pour effet d'augmenter considérablement le temps d'attente entre deux séries d'analyses.
	Expert 4 : J'ai noté quelques erreurs ; p12 il est noté que toutes les maladies présentées sont au DNN mais ce n'est pas le cas des UCD en France. P32 il est noté CK (pour cycle de Krebs) au lieu de cycle de l'urée. P35 il est noté que dans le cas de l'OTC les garçons hémizygotes sont systématiquement malades, cela n'est pas exact pour les formes tardives, certains garçons sont asymptomatiques ou pauci symptomatique (biais d'inactivation de l'X entre autres). Il est noté p33 Insuffisance hépatique dans OTC citrullinémie et HHH, cela peut se voir aussi pour arginase et pour CPS (en fait dans tous les UCD). P38 il est noté régime protéique à la place de régime hypo protéique. P36 : rajouter on peut différencier déficit NAGS/CPS 1 de l'OTC par le dosage de l'acide orotique urinaire en général élevé dans le déficit en OTC. P35 : en aigu dans la prise en charge il est noté réhydratation cependant ce sont des patients en aigu qui sont en général en œdème cérébral et dont il faut justement faire une restriction hydrique. Je pense qu'il manque une petite partie thérapeutique pour les déficits en BH4, pour comprendre l'importance de rechercher les diagnostics différentiels de l'Hyperphénylalaninémie. La prise en charge thérapeutique n'est pas la même P 49 rajouter pour la leucinose : régime hypoprotidique très strict avec un mélange d'acides aminés sans précurseur indispensable
	Expert 5 : Ce rapport vise à montrer l'intérêt des panels NGS vs le séquençage sanger dans le diagnostic de certaines aminoacidopathies, afin d'évaluer la pertinence de leur prise en charge financière pérenne de droit commun. Pour chaque pathologie il y a une partie initiale clinique, puis une partie qui cible les aspects moléculaires. Les éléments du contexte de la partie moléculaire ne sont pas complètement pertinents : - Il a été déjà précisé par un mail de l'HAS du 17 décembre 2024 (envoyé aux évaluateurs de ce rapport intermédiaire) qu'il n'est pas pertinent et au-delà des finalités de ce travail le fait de détailler les mutations qui doivent être recherchées pour chaque gène - La validité de l'analyse moléculaire par panel de gènes par rapport au séquençage sanger est désormais bien établie. Les panels des gènes sont déjà utilisés dans la pratique courante et remplacent souvent le séquençage sanger. La recherche bibliographique réalisée visant à étudier la concordance entre les deux techniques n'est donc pas vraiment pertinente. De plus, compte tenu du fait que cela est bien établi, il y a peu de papiers visant à comparer directement les deux techniques, en encore plus si on limite la recherche au domaine d'une seule aminoacidopathie rare. La recherche bibliographique des possibles gènes impliqués risque donc d'être forcément et faussement réductive. - Il est important de préciser les gènes qui doivent être présents dans chaque panel et de justifier cela. Toutefois le contexte devrait rappeler que désormais dans la pratique courante on prescrit et réalise des panels qui sont assez larges (incluant des gènes fortement et fréquemment associés à un phénotype clinique ou biologique, mais aussi des gènes rarement associés à un phénotype donné), afin d'avoir avec une seule analyse une couverture exhaustive, même des gènes rares qui ne seraient pas testés autrement.

	<i>Il aurait été important donc de mieux préciser le contexte de ce qui est déjà la pratique courante des analyses diagnostiques pour ce type de pathologies en France, et comment elle peut varier d'un centre à l'autre.</i>

CONCERNANT L'ANALYSE DE LA LITTÉRATURE

Q3	Selon vous, y a-t-il des publications pertinentes qui répondent aux critères de sélection mentionnés pour chaque aminoacidopathie dans le rapport (chapitre à préciser) mais qui n'ont pas été prises en compte ?
	<i>Expert 1 : oui mais elles sont tellement nombreuses qu'il est utopique d'imaginer avoir un recueil exhaustif qui ne changerait sans doute pas le résultat final car il y a plutôt un consensus sur le sujet</i>
	<i>Expert 2 : Pour la leucineose :</i> <i>Mol Genet Metab. 2024 Sep-Oct ;143(1-2):108569. doi : 10.1016/j.ymgme.2024.108569. Epub 2024 Aug 29.</i> <i>Maple syrup urine disease diagnosis in Brazilian patients by massive parallel sequencing. Rafael Hencke Tresbach 1, Fernanda Sperb-Ludwig 2, Rodrigo Ligabue-Braun 3, Fernanda Hendges de Bitencourt 4, Tássia Tonon 5, Carolina Fischinger Moura de Souza 6, Fabiano de Oliveira Poswar 7, Maria Efigênia de Queiroz Leite 8, Tatiana Amorim 8, Gilda Porta 9, João Seda Neto 10, Irene Kazumi Miura 10, Carlos Eduardo Steiner 11, Ana Maria Martins 12, André Luiz Santos Pessoa 13, Erlane Marques Ribeiro 14, Ida Vanessa Doederlein Schwartz 15</i>
	<i>Expert 3 : aucune réponse de l'expert</i>
	<i>Expert 4 : non pas à ma connaissance mais revoir les critères de sélection des études</i>
	<i>Expert 5 : cf. Q2 sur le contexte. La finalité de l'analyse de la littérature (concordance NGS et sanger) n'est pas très pertinente.</i>
Q4	Pensez-vous que le document (version intermédiaire du rapport d'évaluation) reflète justement l'état actuel des connaissances (données publiées dans la littérature) concernant :
Q4a)	La pertinence du ou des gènes sélectionnés dans le cadre du diagnostic des aminoacidopathies ?
	<i>Expert 1 : dans le point 2.1 périmètre de l'évaluation figure le troisième tiret (et celles pour lesquelles un test génétique « quel qu'il soit » présente une utilité clinique) qui n'est pas abordé dans ce document qui focalise sur les aminoacidopathies les plus fréquentes pour lesquels figure un PNDS quid de l'hyperglycinémie sans cétose, du déficit en sulfite oxydase, des défauts de synthèse de la sérine ou encore de la glutamine qui sont certes des pathologie plus rares mais pour lesquels des traitements peuvent exister qui nécessite un diagnostic précis auquel contribue l'analyse génétique et surtout d'un conseil génétique qui entrainera de toutes façon une analyse génétique.</i>
	<i>Expert 2 : Non, en ne sélectionnant que des études qui comparent le NGS versus le Sanger, ont été exclues toutes les références utilisant soit l'une, soit l'autre des méthodologies. Or, l'exploration de certains gènes impliqués dans les aminoacidopathies n'en reste pas moins pertinente même s'il n'existe pas d'étude ayant comparé les différentes méthodologies.</i>

	Le rapport n'a inclus que 5 aminoacidopathies (phénylcétonuries, homocystinurie, leucinose, anomalies du cycle de l'urée, tyrosinémie). Or il existe d'autres aminoacidopathies/ catégories d'aminoacidopathie dont le diagnostic est important pour la prise en charge du patient et de sa famille par notamment : les hyperglycinémies sans cétose, les déficits de synthèse en serine, les anomalies du métabolisme de la proline, les anomalies du métabolisme des acides aminés soufrés et du cycle de la méthionine. Ce rapport ne les évalue pas du tout, or leur diagnostic est important et pertinent avec un grand nombre de gènes dont l'association avec un phénotype est validée.
	Expert 3 : Oui globalement, ont été pris en compte les gènes les plus fréquents pour chaque porte d'entrée. Ci-dessous par maladie, je cite quelques gènes causals connus, mais beaucoup plus rare et de découverte récente.
	Expert 4 : Oui
	Expert 5 : Globalement oui
Q4b)	L'importance de l'analyse des panels de gènes par NGS dans la stratégie diagnostique de chaque aminoacidopathie ?
	Expert 1 : oui il ressort de façon assez clair
	Expert 2 : Non, en ne sélectionnant que les publications ciblées sur des gènes spécifiques, impliqués dans des maladies rares, les publications sur d'autres pathologies/portes d'entrée montrant la concordance entre les variants retrouvés en Sanger et en NGS ont donc été écartées, ne permettant l'analyse que sur un petit nombre de publication effectué sur des cohortes ne reflétant absolument pas la population Européenne ou Française. Or d'un point de vue technologique, l'évaluation des performances du NGS versus Sanger, ne dépend pas de la pathologie mais plutôt de la structure du gène/des caractéristiques de la séquence génomique. De nombreuses publications sur des gènes non en rapport avec les aminoacidopathies pourraient donc être pertinentes pour valider la supériorité diagnostique du NGS par rapport à la méthode de Sanger (qui n'est plus à démontrer à ce jour compte tenu de l'expérience > 10 ans de tous les laboratoires hospitaliers de génétique)
	Expert 3 : Ci-dessous dans les autres questions, quelques points d'intérêts supplémentaires des panels.
	Expert 4 : oui
	Expert 5 : oui

CONCERNANT LES GENES A INCLURE DANS LES PANELS NGS

Q5	Quel est, selon vous, le critère le plus pertinent pour inclure un gène dans un panel à visée diagnostique des aminoacidopathies ?
	Expert 1 : l'existence de diagnostic(s) différentiel(s) modifiant la prise en charge du patient pour lesquels les examens contribuant à l'établissement des phénotype biochimiques ne permettent pas de conclure et le besoin quasi absolu de connaître le génotype pour le conseil génétique.
	Expert 2 : Ce gène a été décrit comme impliqué dans une aminoacidopathie chez plusieurs patients (référéncé dans la base OMIM ou dans les bases PanelApp England ou PanelApp Australia)

	<i>Expert 3 : Les aminoacidopathies sont des maladies assez bien connues pour lesquelles il existe souvent un biomarqueur aisément dosable. Par ailleurs, à mon sens, un panel est désormais un examen de soins courants.</i> <i>Le critère principal d'inclusion d'un gène dans un panel aminoacidopathies est donc l'existence de données scientifiques validées associant ce gène avec le phénotype clinique et/ou biochimique de la maladie, que le gène soit celui de la maladie visée, ou des gènes de diagnostics différentiels du syndrome ou du symptôme principal.</i>
	<i>Expert 4 : le critère qui me semble le plus pertinent est la modification de la prise en charge thérapeutique pour une aminoacidopathie qui peut être déterminé en partie par le résultat de l'analyse moléculaire (par exemple par des mutations vitaminosensibles comme pour la phényl, l'homocystinurie, ou alors par des diagnostics différentiels ou des prises en charge thérapeutiques différentes comme pour NAGS versus CPS que seule la génétique peut différencier)</i>
	<i>Expert 5 : comme précisé dans le document, il s'agit d'inclure les gènes déjà décrits dans la littérature comme responsables d'un phénotype clinique ou biologique, mais aussi les gènes qui sont responsable des diagnostics différentiels (car chevauchement clinique ou biologique).</i> <i>Le critère de rareté de l'association entre un gène et un phénotype ne doit pas être un facteur d'exclusion ; au contraire, l'inclusion dans le panel va permettre d'identifier des cas très rares, pour lesquels l'analyse en sanger ne serait jamais demandé où n'est même pas disponible.</i> <i>Une mise à jour constante est demandée afin que les panels de gènes proposés soient en adéquation avec les avancés de la littérature et la découverte de nouveau gènes où des nouveaux phénotypes.</i>

Q6	Quelles sont, selon vous, les principales bases de référence utilisées en France pour déterminer le niveau d'association génotype-phénotype d'un gène ?
	<i>Expert 1 : il n'en existe pratiquement pas en accès libre à l'exception de la PCU pour laquelle la base BIOPKU est assez exhaustive. ClinVar est très incomplète car repose sur le volontariat pour la déclaration des variants, seuls les variants les plus fréquents s'y retrouve et présente un biais de représentativité car seuls les laboratoires qui ont les moyens (temps, personnels) rapportent leurs variants, de plus les données de caractérisation des variants n'y figurent que rarement. HGMD est la plus complète et la plus documentée mais elle est payante.</i>
	<i>Expert 2 : Bases généralistes :</i> <i>-HGMD : base (payante, Qiagen) exhaustive de toutes les mutations rapportées dans la littérature, interrogeable gène par gène. A l'avantage d'être revue par des experts de chaque gène qui proposent une conclusion sur l'implication du variant dans la pathologie sur la base de toutes les publications disponibles pour chacun des variants. Permet également de retrouver toutes les publications scientifiques ayant rapporté un variant précis.</i> <i>-ClinVar : base (non exhaustive, sur la base du volontariat) des mutations déclarées par les utilisateurs (non forcément publiées) interrogeable gène par gène. A l'avantage de contenir des variants non publiés. Inconvénient : la classification de l'implication des variants dans la pathologie n'est pas revue par des experts mais proposé par les utilisateurs qui déclarent les variants (grand nombre de variants avec des interprétations discordantes)</i> <i>-Decipher : base (non exhaustive, sur la base du volontariat) des mutations déclarées par les utilisateurs (non forcément publiées) interrogeable gène par gène. A l'avantage de contenir de nombreux variants de structure (délétions, duplications, grands remaniements)</i> <i>-Mobidetail : base regroupant pour chaque variant les résultats de plusieurs outils de biologie moléculaire : bases de données de polymorphisme ex. GnomAD, outils de prédiction in silico d'impact ex. PolyPhen2, Sift, GVG, outils de métanalyse de prédiction in silico d'impact ex. CADD, MetaSVM, outils</i>

	de prédiction <i>in silico</i> d'impact pour des variants d'épissage ex. SpliceAI, outils de prédiction de classification du variant selon les critères ACMG ex. varsome -GnomADv4.1.0 (ou versions antérieures ou à venir) : base de données de variants retrouvés chez des populations saines (non atteintes), permettant d'évaluer la fréquence de chaque variant au sein de population non malades. Permet d'obtenir la fréquence de chaque variant au sein de sous-populations (origine géographique ou ethnique) et la répartition des variants en fonction du statut homozygote ou hétérozygote dans chaque sous population. -PanelApp England et Australia : base de données regroupant les gènes impliqués en pathologie par thématique et en fonction du niveau de preuve -OMIM : base de données regroupant tous les gènes impliqués en pathologie humaine et renvoyant aux publications sources de la description de la pathologie associée Bases spécialisées en rapport avec la thématique : -BioPKU : base (non exhaustive, sur la base du volontariat) des mutations déclarées par les utilisateurs (non forcément publiées) sur le gène PAH et les autres gènes associés à des hyperphénylalaninémies. A l'avantage d'inclure une description du phénotype associé à chaque variant ou combinaison de variants (notamment association avec phénylcétonurie classique ou hyperphénylalaninémie, et réponse au test au BH4)
	Expert 3 : Non applicable (je suis clinicien et non généticien. ClinVar, ClinGen, OMIM, Orphanet, BioPKU sont les bases que je connais ou que j'utilise)
	Expert 4 : les principales bases de référence sont Genereviews, les PNDs, et les bases clinVar et Clin Gen
	Expert 5 : sans opinion
Q7	Quel niveau de validité de l'association du gène avec la maladie est nécessaire pour inclure un gène dans un panel à visée diagnostique dans les aminoacidopathies ? 1) définitives/robustes ; 2) fortes ; 3) modérées ; autres ? Précisez à quelle classification vous vous référez pour la validité de l'association. Expert 1 : fortes car le panel ne doit pas être uniquement constitué des gènes définitifs si l'on pouvoir progresser dans la connaissance et valider progressivement le classement de gènes dit « forts » vers robustes ou au contraire l'abandonner. Expert 2 : 1) Critères définitifs/robuste -Modèle murins (KO, KI...) ou animaux ayant montré l'impact de l'inactivation/l'activation du gène entraîne un phénotype comparable à celui observé chez l'homme -Cohortes de patients bien caractérisées (phénotype clinique, biologique, description des variants) 2) Critères forts -Absence de patients porteurs de variants pathogènes non malades -Analyses complémentaires (en particulier biochimiques) concordantes 3) Critères modérés -Modèle cellulaires ayant montré l'impact de l'inactivation/l'activation du gène entraîne un phénotype au sein de la cellule susceptible d'expliquer tout ou partie des symptômes cliniques observés chez les patients Expert 3 : Définitifs et fortes.

	Les aminoacidopathies sont des maladies pour lesquelles les gènes en cause sont globalement bien connus.
	Expert 4 : sans opinion, cela dépasse mon expertise
	Expert 5 : sans opinion
Q8	Avez-vous des commentaires sur les résultats de l'analyse de la littérature concernant les gènes candidats, que ce soient des panels de gènes ou un gène unique à séquencer, pour le diagnostic des aminoacidopathies ? Expert 1 : non à l'exception des maladies non représentées cf question sur le périmètre Expert 2 : Oui. Le rapport n'a inclus que 5 aminoacidopathies (phénylcétonurie, homocystinurie, leucine, anomalies du cycle de l'urée, tyrosinémie). Or il existe d'autres aminoacidopathies/ catégories d'aminoacidopathie dont le diagnostic est important pour la prise en charge du patient et de sa famille par notamment : les hyperglycinémies sans cétose, les déficits de synthèse en serine, les anomalies du métabolisme de la proline, les anomalies du métabolisme des acides aminés soufrés et du cycle de la méthionine. Ce rapport ne les évalue pas du tout, or leur diagnostic est important et pertinent avec un grand nombre de gènes dont l'association avec un phénotype est validée. Expert 3 : Aucune réponse de l'expert Expert 4 : oui cf. pour chaque maladie Expert 5 : Non
Q8a)	Concernant la phénylcétonurie
	Expert 1 : non
	Expert 2 : Oui. Il est impossible de préjuger à l'avance sur une hyperphénylalaninémie modérée s'il s'agit d'un déficit en PAH ou en DNAJC12. Il faudrait restructurer les gènes proposés comme suit : -Hyperphénylalaninémies isolées (sans anomalies du métabolisme des ptéridines) : PAH ; DNAJC12 -Panel pour les HPA par déficit en BH4 : gènes PTS, GCH1, PCBD1 et QDPR, DNAJC12 (des anomalies du métabolisme des ptéridines ont été rapportées chez certains patients) -Panel génétique des hyperphénylalaninémies : PAH, PTS, GCH1, PCBD1, QDPR et DNAJC12.
	Expert 3 : Chap. 3.1.1.1 « Un taux de Phé supérieur à 180 $\mu\text{mol/L}$ » => ! la valeur du seuil de dépistage peut changer en fonction de différents critères. Actuellement, il est à 150. Ici, indiquer juste « Un taux de Phé supérieur au seuil » D'accord avec la liste de gènes, qui regroupe bien tous les gènes d'hyperphénylalaninémie.
	Expert 4 : pourquoi le gène SPR impliqué dans déficit en BH4 et mentionné comme tel n'est pas mentionné ensuite dans les gènes d'intérêt de la question 2 p 23 ? pourquoi n'est-il pas non plus mentionné dans le panel multigénique du tableau final. Je ne comprends pas pourquoi il a été enlevé de l'évaluation ?
	Expert 5 : Non

Q8b)	Concernant les troubles du cycle de l'urée
	Expert 1 : non
	Expert 2 : non
	Expert 3 : Il manque le gène CA5A (anhydrase carbonique 5A) responsable d'hyperammoniémies néonatales. Pour presque tous les déficits du cycle de l'urée (sauf OTC, CPS et NAGS), il existe des biomarqueurs permettant d'aboutir au diagnostic avec une fiabilité remarquable, donc en soi la génétique n'est pas indispensable pour le diagnostic de ces maladies (sauf pour OTC, NAGS et CPS). Par contre pour des DPN de grossesses futures, avoir la génétique du malade et de ses parents sera indispensable. Chap. 4.1.2.1 : Carnitine, B12 et Biotine ne sont pas des épurateurs de l'ammoniaque (mais sont des traitements d'aciduries organiques, qui sont des diagnostics différentiels de coma hyperammonémiques). En épurateur, il manquerait alors le phénylbutyrate. Chap. 4.1.2.5 : pour le déficit en arginase, il existe depuis peu un traitement en accès précoce, la pegzilarginase, qui est une enzymothérapie.
	Expert 4 : je pense qu'il serait intéressant de rajouter dans les gènes d'intérêt le gène de l'anhydrase carbonique CA5A qui est un diagnostic différentiel important des UCD avec coma hyperammonémique néonatal P34 pourquoi ne pas inclure le gène SLC17A7 (LPI) dans le panel multigénique ?
	Expert 5 : il me semble qu'il reste une certaine ambiguïté entre la stratégie diagnostique générale face à une hyperammonémie (incluant les troubles du cycle de l'urée, les altérations des transporteurs, mais aussi les aciduries organiques, les troubles de la beta oxydation) et une hyperammonémie spécifiquement en lien avec un trouble du cycle de l'urée. L'orientation clinique et biologique spécifique vers un trouble du cycle de l'urée pourrait ne pas être évidente (d'ailleurs l'inclusion des gènes de transporteurs avec un retentissement secondaire sur le cycle de l'urée, comme SLC25A15, SLC25A13 et SLC7A7, est déjà proposée dans le document). Il faudrait discuter si un panel incluant tous les gènes d'hyperammonémie (et pas que les gènes du cycle de l'urée) ne serait pas plus approprié de celui qui a été proposé.
Q8c)	Concernant la leucinose
	Expert 1 : non
	Expert 2 : Oui ajouter PPM1K au panel leucinose comprenant BCKDHA, BCKDHB, DBT. En effet, ce gène est responsable d'une forme modérée de leucinose. Cf référence ci-dessous : Hum Mutat 2013 Feb ;34(2):355-62. doi : 10.1002/humu.22242. Epub 2012 Dec 12. A novel regulatory defect in the branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex due to a mutation in the PPM1K gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease Alfonso Oyarzabal 1, Mercedes Martínez-Pardo, Begoña Merinero, Rosa Navarrete, Lourdes R Desviat, Magdalena Ugarte, Pilar Rodríguez-Pombo
	Expert 3 : Il manque les gènes PPM1K (forme très rare de leucinose intermédiaire) et BCAT2 (diagnostic différentiel d'élévation dans le sang des acides aminés ramifiés, ne provoquant pas de coma mais des troubles neuropsychiatriques chroniques). Certes, ils sont rarissimes. Pour BCAT2, la prise en charge étant un peu différente, il est bien d'avoir l'analyse moléculaire pour s'assurer de ce diagnostic et adapter le traitement.

	<i>Il n'est pas exclu que d'autres gènes soient découverts par la suite. Il ne faudrait pas que la liste de gène donnée ici soit limitative. Par contre, elle pourrait constituer un set minimal de gènes pour qui déclarerait faire un panel leucinose.</i>
	<i>Expert 4 : il faut peut-être rajouter DLD dans les gènes d'intérêt du panel dans les diagnostics différentiels de taux de leucine élevé (diagnostic différentiel biochimique même si tableau clinique différent) ?</i>
	<i>Expert 5 : à discuter si rajouter dans le panel le gène DLD (dyhydrolipoamide deshydrogenase, même si tableau biologique et clinique différent ; en effet il s'agit d'une maladie rare, évoquée sur la base de données clinico-biologiques, parfois avec une augmentation de la leucine, et un diagnostic surtout moléculaire.</i>
Q8d)	Concernant la tyrosinémie de type 1
	<i>Expert 1 : théoriquement non au regard de la présentation clinique et biologique après il existe d'autres aminoacidopathies qui se présentent avec une hypertyrosinémie (sans les autres biomarqueurs de la tyrosinémie de type 1 comme la succinylacétone) mais une clinique différente qui pourraient dans de très rares cas faire l'objet d'un diagnostic différentiel (tyrosinémie de type II par exemple)</i>
	<i>Expert 2 : oui, discuter d'inclure GSTZ1, diagnostic différentiel de la tyrosinémie de type 1, en particulier dans le contexte du dépistage néonatal. En effet, bien que les patients avec ce déficit soient asymptomatiques, il faut faire la distinction avec la tyrosinémie de type 1 (contexte du dépistage : patients pré-symptomatiques, ne permettant pas de différencier entre les 2 gènes). En particulier, dans un cas, les patients pourront bénéficier d'un traitement et pas dans l'autre cas</i> <i>Cf publication ci-dessous:</i> <i>Int J Neonatal Screen. 2024 Feb 27;10(1):17. doi: 10.3390/ijns10010017. New Cases of Maleylacetoacetate Isomerase Deficiency with Detection by Newborn Screening and Natural History over 32 Years: Experience from a German Newborn Screening Center Gwendolyn Gramer 1 2, Saskia B Wortmann 3 4 5, Junmin Fang-Hoffmann 2, Dirk Kohlmüller 2, Jürgen G Okun 2, Holger Prokisch 3 4, Thomas Meitinger 3, Georg F Hoffmann 2</i>
	<i>Expert 3 : Il existe un diagnostic différentiel rarissime d'élévation de succinylacétone : le déficit en maleyl-acétoacétate isomérase (MAAID, gène GSTZ1), pseudo maladie qui est un diagnostic différentiel de dépistage néonatal positif pour la tyrosinémie (le test de dépistage consiste en un dosage de succinylacétone). Cette situation est très rare, mais il ne faudrait pas interdire à un panel de séquencer ce gène en même temps que FAH.</i>
	<i>Expert 4 : rien à signaler</i>
	<i>Expert 5 : sans opinion</i>
Q8e)	Concernant l'homocystinurie par déficit en CBS
	<i>Expert 1 : non</i>
	<i>Expert 2 : non</i>
	<i>Expert 3 : Chapitre 1.2.1 « L'homocystinurie est la maladie métabolique des acides aminés la plus fréquente après la phénylcétonurie » => faux (cf. prévalence. Au contraire c'est l'une des plus rare).</i> <i>A noter que d'autres gènes de déficit intracellulaires en B12 pourraient être découverts. Il ne faudrait pas que la liste de gènes ici présentée soit limitative</i>
	<i>Expert 4 : rien à signaler</i>

CONCERNANT LE TAUX DE CONCORDANCE DES TESTS NGS ET SANGER POUR LE DIAGNOSTIC DES AMINOACIDOPATHIES

Q9

Avez-vous des commentaires sur les taux de concordance observés entre la méthode NGS et le séquençage Sanger dans la littérature ?

Expert 1 : non cela confirme mon expérience personnelle : plusieurs dizaines de patients analysés pendant quelques années par les deux méthodes avant e switcher définitive sur panel, puis vérification systématique des variants du NGS en sanger pendant 5 ans sans jamais une seule discordance ayant mené à l'arrêt de la vérification sanger dans la très grande majorité des cas.

Expert 2 : Non, concordance avec supériorité du NGS

Expert 3 : Non. Par contre, je suis étonné que la littérature retenue ici soit uniquement de pays émergents (Chine, Russie, Inde ...) avec des qualités méthodologiques souvent médiocres et un petit nombre de patients (voir des cas uniques).

N'étant pas généticien, peut-être je m'avance un peu trop, cependant, ce taux de concordance observé entre NGS et Sanger n'est sans doute pas spécifique des aminoacidopathies, et serait probablement le même quel que soit le gène et la maladie étudiée ? L'analyse d'une littérature plus globale (non limitées aux APathies pourrait répondre à la question de la concordance avec de plus grandes séries de patients et des articles de meilleures qualités méthodologiques ?

Expert 4 : non pas de commentaires, tous les taux de concordance pour les différentes aminoacidopathies sont de 100 % entre le NGS et le Séquençage Sanger dans les rares études qui ont été sélectionnées

Expert 5 : cf. Q2 ; A mon sens, l'analyse du taux de concordance entre méthode NGS et séquençage sanger n'est pas très pertinente car la validité des techniques NGS (et des prérequis techniques en termes de couverture et profondeur) est déjà assez bien établie.

Q9a)

Concernant la phénylcétonurie

Expert 1 : non

Expert 2 : Non, concordance avec supériorité du NGS

Expert 3 : Chap. 3.4.2.3 : Les études de Li et Wang ne regroupant qu'un seul patient chacune, finalement, il n'y a qu'une seule étude d'ampleur et de bonne qualité.

Chap. 3.4.3.2 : Analyse des résultats : dans « sélection de panels et gènes » : devant une hyperphénylalaninémie, il n'y a pas de moyen peu invasif de déterminer si le patient a une PCU ou un déficit en DNAJC12 : dans ces deux maladies, la réalisation d'un séquençage de gène unique serait une perte de chance.

« Mutations pertinentes à rechercher » : je ne pense pas que ce soit la place du présent rapport de lister les variants pathogènes à rechercher, d'autant que la liste n'est pas complète, et que de nouveaux variants pathogènes sont découverts régulièrement.

Tableau 6 : D'accord avec la colonne de droite. Cependant, je dirai qu'il faut que le panel contiennent au moins ces gènes-là. En effet, nous ne sommes pas à l'abri de découvrir d'autres gènes rares d'HPA par le futur.

Expert 4 : aucune réponse de l'expert

Expert 5 : cf commentaire général

Q9b)	Concernant les troubles du cycle de l'urée
	<i>Expert 1 : non</i>
	<i>Expert 2 : Non, concordance avec supériorité du NGS</i>
	<i>Expert 3 : Non, idem, je ne m'attendais pas à une discordance entre Sanger et NGS.</i> <i>En ce qui concerne la liste des « mutations pertinente à rechercher » (chap. 4.4.3.2 et tableau 11), je ne pense pas qu'il soit légitime de garder un tel paragraphe qui se base uniquement sur les données des articles retenues pour cette analyse. Cela met de côté les 100aines d'autres variants pathogènes déjà décrits dans ces gènes et répertoriés dans les bases de données internationales. Enfin, certains variants, même non répertoriés sont clairement pathogènes.</i>
	<i>Expert 4 : aucune réponse de l'expert</i>
	<i>Expert 5 : Réponse : cf. commentaire générale</i> <i>Pour les troubles du cycle de l'urée il faut mentionner la complexité des mutations introniques, notamment dans le gène OTC, qui ne peuvent être détectées ni par sanger, ni par panel.</i>
Q9c)	Concernant la leucinose
	<i>Expert 1 : non</i>
	<i>Expert 2 : Non, concordance avec supériorité du NGS</i>
	<i>Expert 3 : Réponse superposable à celle précédente pour UCD.</i>
	<i>Expert 4 : aucune réponse de l'expert</i>
	<i>Expert 5 : cf. commentaire général</i>
Q9d)	Concernant la tyrosinémie de type 1
	<i>Expert 1 : non</i>
	<i>Expert 2 : Non, concordance avec supériorité du NGS</i>
	<i>Expert 3 : Réponse superposable à celle précédente pour UCD.</i>
	<i>Expert 4 : aucune réponse de l'expert</i>
	<i>Expert 5 : sans opinion</i>
Q9e)	Concernant l'homocystinurie par déficit en CBS
	<i>Expert 1 : non</i>
	<i>Expert 2 : Non, pas d'étude permettant la concordance du NGS mais expérience personnelle et française montrant la concordance et la supériorité du NGS</i>

	Expert 3 : Réponse superposable à celle précédente pour UCD.
	Expert 4 : aucune réponse de l'expert
	Expert 5 : cf. commentaire général

Q10	Selon votre expérience, quel est le taux de concordance des tests NGS et Sanger pour le diagnostic des aminoacidopathies ? Est-ce que la concordance des tests varie selon les différentes aminoacidopathies ?
	Expert 1 : 100 % dans mon expérience quel que soit la pathologie sans oublier tous le grands réarrangement intragénique (duplication d'exons par exemple) que l'on peut voir en NGS et que l'on ne voit pas en sanger.
	Expert 2 : Selon mon expérience, le NGS retrouve 100% des variants qui étaient trouvées par séquençage classique par méthode de Sanger, quelle que soit le gène/l'acidoacidopathie concernée. Le NGS à l'avantage de retrouver des variants qui n'étaient pas trouvés par méthode de Sanger (variants de structure). Après une période transitoire ou les variants retrouvés en NGS étaient systématiquement confirmés par méthode de Sanger au sein de mon laboratoire, la confirmation des variants retrouvés en NGS par méthode de Sanger a été abandonnée.
	Expert 3 : Je ne sais pas (demander aux généticiens en charge de l'analyse)
	Expert 4 : sans opinion
	Expert 5 : le taux de concordance est très élevé ; cela est bien validé et les panels NGS sont souvent déjà utilisés dans la pratique pour le diagnostic clinique des aminoacidopathies.
Q11	Quelle couverture et quelle profondeur de séquençage minimales permettent de détecter les SNV et Indels impliqués dans les aminoacidopathies ?
	Expert 1 : couverture de 100% de la séquence codante et des jonctions intron-exon et profondeur de 30 X (peut être que 20X suffirait)
	Expert 2 : Couverture minimale : 30X mais peut varier selon les technologies utilisées
	Expert 3 : Je ne sais pas (demander aux généticiens en charge de l'analyse)
	Expert 4: sans opinion
	Expert 5: sans opinion

CONCERNANT LA PLACE ET L'UTILITE CLINIQUE DES PANELS DE GENES DANS LES AMINOACIDOPATHIES

Q12	Quelle est la valeur ajoutée de l'utilisation de la technologie NGS pour le séquençage d'un ou plusieurs gènes d'intérêt par rapport au séquençage Sanger dans le diagnostic des aminoacidopathies ?
	Expert 1 : Gain de temps pour mise en place thérapeutique la plus adaptée quand plusieurs gènes peuvent expliquer un même tableau clinico-biologique. Réduction de l'errance diagnostique si inclusion

	des gènes du diagnostic différentiel. Identification des CNV non réalisable en sanger. Au final le plus souvent une réduction des coûts parfois importante selon le nombre de gènes pour donner un même tableau clinico-biologique.
	Expert 2 : -Le NGS à l'avantage de retrouver des variants qui n'étaient pas trouvés par méthode de Sanger (variants de structure, variant introniques profonds) et qui nécessitaient des méthodes complémentaires pour leur détection, coûteuses et de mise au point difficile (MLPA, QPCR) -Le NGS permet l'analyse simultanée de plusieurs exons/gènes ce qui est particulièrement utile quand plusieurs gènes sont associés au même phénotype (Méthode de Sanger : analyse exon par exon nécessaire) ☐ Amélioration du délai avant diagnostic moléculaire ☐ Diminution du nombre de patients en impasse diagnostique -Le NGS permet une adaptation aux connaissances et à l'état de l'art plus facile : modification des gènes analysés/zones analysées plus rapide et facile qu'avec la méthode de Sanger (ou l'on devait mettre au point les PCR pour chacun des exons nouveaux à analyser)
	Expert 3 : Certains traits biochimiques orientant le diagnostic vers une aminoacidopathie ne permettent pas d'écarter certaines causes rares et/ou au traitement spécifique (ex. DNAJC12 et phénylcétonurie ; déficits en NAGS et en CPS ...). L'intérêt est donc à la fois de diagnostiquer la maladie suspectée, mais aussi d'éliminer les diagnostics différentiels (ou de les diagnostiquer dans de rares cas), avec un impact réel dans la prise en charge du patient. Plus le résultat sera obtenu précocement plus l'impact sera important. Dans ces cas-là, l'étude simultanée de tous les gènes responsables du tableau clinique/biochimique montre plusieurs intérêts : diagnostic, thérapeutique, pronostic, psychologique etc.
	Expert 4 : la rapidité de rendu théorique du NGS et le fait de pouvoir avoir des panels multigéniques
	Expert 5 : L'importante valeur ajoutée de l'analyse des panels de gènes a été bien précisée pour ce qui concerne le diagnostic et le diagnostic différentiels. Cela permet en effet de réaliser en une seule fois l'analyse moléculaire pour les maladies plus fréquentes, mais aussi pour les maladies plus rares qui font partie des diagnostic différentiels. Cela comporte un bénéfice clair pour les patients et permet d'arriver plus rapidement et plus fréquemment à établir un diagnostic moléculaire définitif. Le possible nécessité de test moléculaire pour une diagnostic prénatale a été mentionnée seulement pour le déficit en CBS, alors que cela pourrait être une demande aussi dans le cadre d'une leucinoïse ou d'un trouble du cycle de l'urée. La nécessité d'analyse moléculaire pour un dépistage familiale de porteurs sains dans le cadre d'un projet de greffe hépatique a été discutée pour la leucinoïse, mais cela pourrait être le cas pour d'autres maladies aussi. Le déficit en OTC a la particularité d'être une maladie liée à l'X (et pas récessive comme la plupart des autres) ; cela implique que pour chaque individu diagnostiqué il y a plusieurs individus de la même famille pour lesquels le dépistage génétique est indiqué (pour la prise en charge et le conseil génétique). Il s'agit de préciser et discuter si ce dépistage (ciblant donc une mutation précise et déjà connue) doit être fait avec une technique sanger ou NGS et les éventuelles conditions de prise en charge financière. Dans les situations autres que le diagnostic il n'est pas clair si la proposition est de réaliser une analyse ciblée sanger (par exemple pour le diagnostic prénatale) ou l'analyse par panel en ciblant le gène d'intérêt.

Q13	Quelles sont les limites des panels NGS et comment celles-ci influencent-elles les résultats cliniques ?
	<i>Expert 1 : nécessite un certain niveau d'expertise mais qui fait maintenant parti de la formation des biologistes qui se spécialisent en biologie moléculaire. Des outils bio-informatiques adaptés et maîtrisés et parfois l'accès à des bases de données payantes</i>
	<i>Expert 2 : Les limites du NGS sont inhérentes à la manière dont est construit le design du panel et peut dépendre d'un laboratoire à l'autre en fonction de l'exhaustivité des gènes couverts, de l'inclusion –ou non- des régions promotrices, régulatrices, exons non codants, de la taille des régions introniques flanquant les exons, inclusion des régions introniques profondes ou ont été décrits des variants pathogènes –ou non-.</i> <i>Par ailleurs, les panels NGS ne couvrent pas les zones introniques profondes (sauf éventuellement à l'exception de zones introniques où des variants pathogènes ont été décrits, si le laboratoire en a fait le choix) et ne peuvent donc pas permettre la détection de variants dans ces zones du génome.</i>
	<i>Expert 3 : -Inégalité territoriale d'accès aux panels</i> <i>-Lenteur de certains laboratoires au rendu des résultats. Certains patients peuvent ainsi être traités à tort le temps d'obtenir le résultat (ex. dépistage néonatal d'acidurie glutarique de type I, de nombreuses situations borderlines ne sont résolues qu'avec le résultat de génétique. Idem pour des suspicions de déficit du métabolisme du BH4).</i> <i>-Certains patients aux symptômes non spécifiques nécessitent la réalisation de plusieurs panels (ex. une insuffisance hépatique aiguë peut être un déficit du cycle de l'urée, ou une maladie de la filière hépatique FilFoié). Dans ce cas, la réalisation d'un exome ou d'un génome serait le plus approprié.</i> <i>-Lors de la découverte de nouveaux gènes causals de maladies : délais entre la découverte du nouveau gène et son ajout dans le panel. Certains patients passent ainsi plusieurs fois sur le « même » panel, afin de bénéficier de l'analyse des gènes rajoutés sur la version la plus récente.</i>
	<i>Expert 4 : en fonction des centres, rendu de panel parfois long par rapport à un exome ou un génome, en cas d'impasse diagnostique, plusieurs panels nécessaires. Il faut bien cibler les panels en fonction des maladies.</i>
	<i>Expert 5 : L'utilisation de panels avec un nombre limité de gènes nécessite au préalable que la demande soit faite dans un contexte clinico-biologique approprié et adapté. Pour les aminoacidopathies cela demande une expertise de la part du clinicien demandeur et une connaissance des pathologies.</i> <i>L'utilisation de panels de gènes présuppose la capacité d'une mise à jour constante et des gènes inclus dans le panel</i> <i>La réalisation de panel de gènes nécessite d'une expertise génétique et une collaboration étroite avec des cliniciens experts car : 1) plus facilement on retrouve des variants dont la pathogénicité est difficile à établir ; 2) en cas de panels « négatifs » et face à un patient symptomatique et avec des anomalies biologiques il est indispensable de ne pas se contenter d'un panel négatif et d'aller plus loin dans les analyses génétiques avec des analyses plus large, comprenant aussi la recherche de variants introniques</i>
Q14	Les panels NGS sont décrits comme un outil pour exclure d'autres pathologies aux symptômes similaires. Est-ce que cela influence les orientations de prise en charge ? <i>Expert 1 : OUI BIEN SUR !!!</i>

	<i>Expert 2 : Les panels NGS permettent effectivement de diagnostic différentiel de pathologies proches sur le plan phénotypique mais avec des prises en charge différentes ce qui a un impact pour le traitement.</i> <i>Un exemple (parmi de nombreux autres) au sein es aminoacidopathies : les déficits en NAGS et CPS se présentent de manière identique sur le plan clinique et biologique mais il existe un traitement spécifique pour le déficit en NAGS (Carbaglu®, acide carglumique)</i>
	<i>Expert 3 : Cela peut entraîner des prises en charge sub-optimales pendant le temps de l'attente du résultat. Il existe par exemple des cas de patients cycle de l'urée traités inutilement par acide carglumique pendant plusieurs mois avant de recevoir un résultat génétique de déficit en OTC, avec NAGS normal : coût d'un médicament inutile, discours médical difficile dans l'attente (le pronostic n'est pas du tout le même entre ces deux déficits). D'autres exemples existent pour les hyperphénylalaninémies etc.</i>
	<i>Expert 4 : cela peut parfois orienter ou exclure un diagnostic.</i>
	<i>Expert 5 : Oui. La prise en charge ou le pronostic du patient ne sont pas forcément les mêmes dans les différentes pathologies. Seulement le diagnostic moléculaire permet de réaliser le conseil génétique et le diagnostic prénatal.</i>

Q15	Existe-t-il des recommandations pour adapter le traitement en fonction des mutations génétiques identifiées pour chaque aminoacidopathie ?
	<i>Expert 1 : non pas pour chacune, cela est particulièrement intéressant dans les maladies potentiellement vitamino-sensibles (CBS, PCU) mais cela ne se substitue pas aux tests thérapeutiques fonctionnels mais cela peut permettre d'améliorer la prise en charge de certains patients en suggérant des pistes thérapeutiques.</i>
	<i>Expert 2 : Non, il n'existe pas de recommandations pour adapter le traitement en fonction des variants pour chaque aminoacidopathie mais il en existe pour certaines, en particulier pour la phénylcétonurie</i>
	<i>Expert 3 : Oui, en ce qui concerne la phénylcétonurie : certains variants pathogènes du gène PAH prédisent une bonne réponse au traitement par saproptérine, ou au contraire une inefficacité de ce traitement.</i> <i>De plus, certaines hyperphénylalaninémie ne sont pas en lien avec un variant dans PAH. Par exemple, DNAJC12 a un traitement spécifique, et la biochimie sur sang et urines ne permet pas de le distinguer de la PCU. Ou encore les déficits du métabolisme du BH4 pour lesquels, parfois, la biochimie n'est pas assez discriminante pour les distinguer d'une PCU.</i> <i>Oui également pour le déficit en NAGS, indiscernable du déficit en CPS cliniquement et biochimiquement (et parfois aussi du déficit en OTC). L'étude génétique permet alors de déterminer si le traitement par acide carglumique est indiqué en première ligne.</i>
	<i>Expert 4 : oui en particulier pour les mutations décrites comme sensibles par exemple au BH4 dans la PKU ou la vitamine B6 dans l'homocystinurie. Certaines mutations sont décrites dans des formes tardives ou d'autres dans des formes néonatales (comme pour l'OTC) etc.</i>
	<i>Expert 5 : oui. Cela a été déjà précisé dans le document.</i> <i>Pour les hyperphénylaninémies: dans la phénylcétonurie l'analyse des mutations permet d'avoir une idée de la possible réponse au BH4 ; pour les maladies avec hyperphénylaninémie autres que la PCU, l'identification des mutations et des gènes impliqués permet la mise en place de traitements spécifiques.</i> <i>Pour les troubles du cycle de l'urée : dans le déficit en OTC certaines mutations sont connues pour être associées à des phénotypes plus sévères et des propositions de greffe hépatique pourraient être faite</i>

	plus volontiers. Des mutations dans d'autres gènes du trouble du cycle de l'urée (déficit en NAGS, déficit en arginase, citrullinémie de type2) nécessitent de prises en charge partiellement différentes. Leucinose : pour les gènes de leucinose inclus dans le panel proposé, à ma connaissance pas de relation entre prise en charge et mutation, donc le chapitre 5.2.3 pas vraiment pertinent. Les seules précisions pourraient être la réponse à un traitement par thiamine si mutation dans le gène DBT (sous-unité E2). Si inclusion du gène DLD (sous unité E3) cela pourrait changer aussi la prise en charge. Tyrosinémie : pas d'opinion Déficit en CBS : certaines mutations (si présentes à l'état homozygote) pourraient prédire la sensibilité à la B6. Toutefois la sensibilité à la B6 est déterminée surtout sur la base de la réponse biologique après son administration. Les autres maladies avec hyperhomocystéinémie ont une prise en charge partiellement différente.

CONCERNANT LES ENJEUX ORGANISATIONNELS LIES A L'UTILISATION DU NGS DANS LES SOINS COURANTS

Q16	Est-ce que les professionnels de santé doivent bénéficier de formations spécifiques pour garantir une interprétation précise des données issues de l'analyse des panels NGS ? Expert 1 : oui mais je la crois incluse dans la formation de DES de Biologie médicale option MMPG, tous les jeunes biologistes ayant pris cette option depuis maintenant 5 à 10 ans bénéficient de formations adaptées (au niveau des CHU). Il me semble que la grande majorité des laboratoires et des biologistes concernés ont fait la transition vers le NGS. Pour celui qui l'amorcerait oui il faut une formation adaptée. Expert 2 : Oui il faut une formation spécifique pour analyser les résultats de NGS. Cette formation est normalement obligatoire/inclue pour obtenir « l'agrément pour la pratique des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales » qui est le prérequis pour pouvoir signer des résultats de biologie moléculaire (NGS ou autres techniques) et nécessite au moins 2 ans d'expérience dans un laboratoire de biologie moléculaire, au cours duquel le professionnel sera (en l'état actuel des technologies) confronté au NGS. Expert 3 : (étant clinicien, je ne peux pas répondre) Expert 4 : : oui les biologistes/ biochimistes impliqués dans les maladies métaboliques doivent être formés Expert 5 : certainement oui et cela concerne à la fois les biologiste /généticiens interprétateurs et les cliniciens prescripteurs.
Q17	Quels sont les changements organisationnels les plus critiques pour répondre aux exigences de la technologie NGS et optimiser son intégration dans les soins courants ? Expert 1 : c'est surtout en termes de matériel qu'il faut s'adapter (outils de séquençage, préparation des librairies et d'analyse bio-informatique) du point de vue fonctionnel c'est tellement plus simple analyses multiplexées un technicien peut analyser 20 à 50 patients simultanément...

	<i>Expert 2 : Le NGS est déjà utilisé en pratique courante (au moins dans les laboratoires hospitaliers de génétiques/biologie moléculaire) depuis environ 10 ans.</i> <i>Les laboratoires doivent avoir un nombre de personnel technique et biologique adapté et que la rémunération de l'analyse soit pertinente au regard du cout (personnel, réactifs...)</i> <i>Les laboratoires doivent avoir les séquenceurs adaptés et le pipeline bio-informatique adapté pour l'analyse des résultats</i>
	<i>Expert 3 : (Du point de vue du clinicien, il n'y a pas d'adaptation particulière. Ou seulement de connaître la liste des gènes inclus dans le panel pour savoir ce qu'on peut en attendre. En ce sens, et parce que ces listes de gènes ne sont pas en libre accès, la feuille de demande pour le laboratoire doit être assez précise pour que le généticien puisse confirmer que le panel demandé est bien approprié aux symptômes cliniques du patient).</i>
	<i>Expert 4 : dès qu'il y aura un nouveau gène identifié, cela ne pourra pas être inclus dans le panel génétique. D'autre part, s'il y a une indication thérapeutique, il faut un rendu rapide des résultats du panel...</i>
	<i>Expert 5 : Le document présenté souligne déjà la nécessité d'une réorganisation des laboratoires de biologie moléculaire (équipement technique et expertise bio-informatique). De plus l'application des panels restreint nécessite une veille de la littérature et une mise à jour avec la nécessité de pouvoir intégrer rapidement (avec une couverture suffisante) des nouveaux gènes éventuellement décrit comme associés au phénotype clinique où biologique.</i> <i>Toutefois il est important aussi de définir précisément le circuit de prescription afin que les cliniciens qui demandent le panel soient formés et experts dans le domaine des maladies rares du métabolisme afin de réaliser la demande dans un contexte clinique/biologique approprié et de savoir interpréter correctement les résultats moléculaires. Cela notamment afin d'éviter le risque de rendre des mutations qui en réalité ne sont pas pathogéniques et aussi le risque de rendre un résultat de panel comme négatif, alors qu'il ne l'est pas (par exemple avec une seule variant dans un gène récessif d'intérêt et la nécessité donc d'aller plus loin et chercher une deuxième mutation intronique).</i>

Q18 Est-ce que la technologie NGS a significativement réduit le temps de diagnostic des aminoacidopathies ?

*Expert 1 : oui sans aucun doute à conditions d'avoir une demande suffisante qui permette de lancer très régulièrement une puce, d'où l'intérêt majeur de coupler es panels au sein d'une même librairies afin de faire tourner la puce très régulièrement (exemple coupler le panel aminoacidopathies avec celui des aciduries organiques et anomalies de l'oxydation des acides gras, voire un panel pan-métabolique mais une analyse in silico de chaque sous panel spécifique en fonction de la porte d'entrée). C'est la capacité d'un laboratoire à passer régulièrement le panel qui est la donnée critique car si on ne lance un panel qu'une ou deux fois par an cela n'a aucun intérêt versus le sanger. **Il faut donc définir un délai de passage régulier afin de garantir un véritable gain de temps. Il est donc utopique de penser que demain tous les laboratoires de France feront un panel aminoacidopathies sinon ils auraient chacun trop peu de demandes pour pouvoir passer ce panel dans un délai raisonnable sans surcoût notable. Il faut privilégier les sites qui ont l'expérience et un recrutement régulier sinon le panel pourrait s'avérer moins rentable in fine que le sanger pour le patient et économiquement pour le laboratoire.***

Expert 2 : Oui, pour la plupart des patients, le NGS a réduit le temps d'analyse (résultats de plusieurs gène disponibles d'emblée là où ils étaient disponibles de manière séquentielle auparavant)

Cependant, le temps d'analyse sera impacté par la disponibilité des séquenceurs, le recrutement des patients (afin de ne pas lancer de run de NGS à perte)

Expert 3 : Le diagnostic précis d'une aminoacidopathie est souvent apporté par la biochimie, sauf quelques cas précis vus plus haut (hyperphénylalaninémie, OTC/NAGS/CPS et les hyperhomocystéinémie). C'est l'organisation du laboratoire qui réduit le temps de réalisation du test génétique pour un patient donné (sanger vs. NGS). Et la NGS permet de faire gagner du temps au laboratoire. Du temps du SANGER exclusif, l'analyse de chaque gène du cycle de l'urée était réalisée dans des CHU différents, voire dans des laboratoires à l'étranger. Pour OTC/CPS/NAGS par exemple, un bébé hyperammoniémique et ses parents étaient prélevés de plusieurs tubes pour envoyer les échantillons à la fois à Paris pour OTC, et à Zurich pour CPS et NAGS.

Expert 4 : je ne pense pas ; la majorité des aminoacidopathies ont un diagnostic biochimique avant tout, la génétique permet de clarifier pour certains cas douteux et rarement de modifier le diagnostic ou de changer le traitement (cas vitaminosensibles)

Expert 5 : Oui, cela est aussi une des raisons qui fait que la technique NGS est largement utilisée.

COMMENTAIRES LIBRES

Q19	Avez-vous d'autres commentaires à formuler sur cette version intermédiaire du rapport d'évaluation ?
	Expert 1 : <i>quid des autres aminoacidopathies discutées plus haut.</i>
	Expert 2 : -Paragraphe 1.2.2 p12 <i>Les anomalies du cycle de l'urée ne sont pas incluses dans le dépistage néonatal en France à l'heure actuelle (seules la phénylcétonurie, l'homocystinurie et la leucínose le sont parmi les aminoacidopathies)</i> -Paragraphe 1.2.2.1 b) p12 <i>Le séquençage de Sanger consiste à séquencer « exon par exon » et non gène par gène. Par ailleurs, la vérification des variants obtenus par NGS par méthode de Sanger n'est plus réalisée (sauf cas exceptionnel), les performances du NGS ayant été largement validées au sein de chaque laboratoire (la publication citée pour justifier la validation du NGS par méthode de Sanger date de 2013, en 11 ans, le NGS a été évalué et validé, permettant l'arrêt d'une vérification dans la plupart des cas)</i> -Paragraphe 1.2.2.1 b) p14 <i>Il existe également une base de données australienne de type PanelApp https://panelapp.gha.umccr.org/ qui est une base fiable et revue régulièrement</i>
	Expert 3 : <i>Quid des panels in silico ?</i>
	Expert 4 : <i>le choix des publications ne me semble pas bon même si je comprends bien les critères PICOS. Je pense qu'il faut enlever la comparabilité entre NGS et Sanger</i>
	Expert 5 : <i>Ce rapport d'évaluation précise qu'il n'a pas pour objectif de définir les conditions de réalisation du NGS ciblé sur un panel de gène. Toutefois il me semble important d'insister sur le fait que la validité d'un résultat d'un panel de gènes est strictement liée au contexte dans lequel le panel est réalisé et donc à la validité de l'indication (posée par un clinicien expert), à la validité de l'interprétation du résultat (réalisée par un biologiste expert en lien avec le clinicien) et aux compétences au moment du rendu du résultat (pour la mise en place un traitement adapté et pour le conseil génétique). Il est important donc de discuter et de définir les périmètres de la prescription et réalisation de ces panels.</i> <i>En tant que neurologue suivant les maladies métaboliques à expression neurologique des adultes je n'ai pas d'expérience concernant la tyrosinémie de type 1 ; j'ai donc répondu « sans opinion » aux questions concernant cette maladie.</i>

Questions complémentaires : concernant le diagnostic des trois maladies suivantes :

- Hyperphénylalaninémies isolées : gènes PAH et DNAJC12
- Tyrosinémie de type 1 : gènes FAH et GSTZ1
- Homocystinurie par déficit en CBS : gène CBS

Question 1 : Quelle méthode de séquençage recommanderiez-vous pour l'analyse ciblée d'un ou deux gènes : NGS ou Sanger ?

Expert 1 :

NGS compte tenu de

- Deux gènes pour les hyperphénylalaninémies isolées (18 exons) et tyrosinémie de type 1 (23 exons) ce qui rend le SANGER lourd à gérer. Un seul gène mais 17 exons pour CBS.
- De plus, d'autres diagnostics différentiels qui pourraient être inclus sur la même puce, même panel ou dans le cas présent autre panel associé mais sur une même puce. La lecture se faisant de façon ciblée par sous panel in silico.
- De plus le NGS permet de détecter les variants de type nombre de copie (CNV) ce que ne fait pas le sanger.

Expert 2 :

NGS en raison de :

- Rapidité d'analyse avec analyse simultanée de tous les exons : particulièrement important pour très gros gènes avec nombreux exons
- → « Coût » technicien (temps pour réaliser l'analyse) plus faible
- → Rapidité diagnostique
- Possibilité de trouver les variants de copie (duplication/délétion d'exons)
- Possibilité de détecter les variants en mosaïque
- Possibilité de multiplexer les analyses avec d'autres
- Adaptabilité : ajout de gènes (diagnostic différentiel) possible

Expert 3 :

NGS : gain de temps pour le laboratoire et donc pour le rendu du résultat. D'un coup un résultat complet (gène suspecté + les diagnostics différentiels)

Expert 4 : n'a pas répondu

Expert 5 :

L'analyse de ces gènes peut être réalisée par NGS, d'autant plus que l'analyse d'un panel de gènes peut être « filtrée » et commencer par exemple par le gène le plus fréquemment impliqué (par exemple PAH en cas de hyperphénylalaninémie)

Question 2 : Pourriez-vous également indiquer, pour chaque maladie, les avantages et les limites de chaque méthode ?

Expert 1 :

Cf ci-dessus des critères favorables au NGS : de gains de temps d'analyses, des capacités d'identification plus large des variants (type CNV), de la possibilité d'avoir d'autres diagnostics différentiels sur une même puce si la présentation clinico-biologique est atypique. L'ensemble de ces critères peut réduire l'errance diagnostic et favoriser un traitement précoce adapté et donc la morbi-mortalité.

Le sanger est globalement plus lourd à gérer sauf la recherche d'un variant familiale ciblé et souvent plus coûteux in fine.

Comme déjà discuter le fait d'avoir sur une même puce plusieurs panels permet de lancer plus régulièrement un run afin de ne pas perdre de temps sur le diagnostic et avoir suffisamment de patients pour la rentabilité financière. Par ailleurs, en regroupant intelligemment les panels sur une même puce, on peut avoir tous les diagnostics différentiels pour les situations clinico-biologiques les moins caractéristiques.

Expert 2 :

- **Hyperphénylalaninémies isolées : gènes PAH et DNAJC12**

- **Sanger**

- **Avantages**

Possibilité de lancer « en urgence » parfois plus facilement, au cas par cas, utile si on suspecte un déficit en *DNAJC12*

- **Limites**

Temps de préparation technique (total des 2 gènes 13+5 exons) → coût technicien

Pas de regroupement possible de plusieurs patients. Manip= 1 exons pour quelques patients

- **NGS**

- **Avantages**

Rapidité d'analyse avec analyse simultanée de tous les exons → « Coût » technicien (temps pour réaliser l'analyse) plus faible

→ Rapidité diagnostique

Possibilité de trouver les variants de copie (duplication/délétion d'exons). A noter > 60 grandes délétions et 16 insertions rapportées dans la base HGMD pour le gène PAH et 1 grande délétion rapportée pour le gène DNAJC12 (Anikster et al. 2017)

Possibilité de détecter les variants en mosaïque

Possibilité de multiplexer les analyses avec d'autres

Adaptabilité : ajout de gènes (diagnostique différentiel) possible

- **Limites**

Pas de détection des variants introniques profonds, des remaniements complexes

Nécessité d'attendre pour « regrouper » des patients avant de lancer → délai avant analyse

Nécessité d'avoir des séquenceurs adaptés avec du temps machine sur les séquenceurs

- **Tyrosinémie de type 1 : gènes FAH et GSTZ1**

- **Avantages**

- **Limites**

Temps de préparation technique (total des 2 gènes 14+9 exons) → coût technicien

Pas de regroupement possible de plusieurs patients. Manip= 1 exons pour quelques patients

- **NGS**

- **Avantages**

Rapidité d'analyse avec analyse simultanée de tous les exons → « Coût » technicien (temps pour réaliser l'analyse) plus faible

→ Rapidité diagnostique

Possibilité de trouver les variants de copie (duplication/délétion d'exons) : à noter 2 grandes délétions rapportées dans la base HGMD pour le gène FAH (Park 2009, Arranz 2002)

Possibilité de détecter les variants en mosaïque

Possibilité de multiplexer les analyses avec d'autres

Adaptabilité : ajout de gènes (diagnostique différentiel) possible

- **Limites**

Pas de détection des variants introniques profonds, des remaniements complexes

Nécessité d'attendre pour « regrouper » des patients avant de lancer → délai avant analyse

Nécessité d'avoir des séquenceurs adaptés avec du temps machine sur les séquenceurs

- **Homocystinurie par déficit en CBS : gène CBS**

- **Avantages**

Limites

Temps de préparation technique (15 exons) → coût technicien

Pas de regroupement possible de plusieurs patients. Manip= 1 exons pour quelques patients

- **NGS**

- **Avantages**

Rapidité d'analyse avec analyse simultanée de tous les exons → « Coût » technicien (temps pour réaliser l'analyse) plus faible

→ Rapidité diagnostique

Possibilité de trouver les variants de copie (duplication/délétion d'exons). A noter 15 grandes délétions rapportées dans le gène CBS dans la base HGMD (Kraus 1999, Gaustadnes 1998, Koch 2005,)

Possibilité de détecter les variants en mosaïque

Possibilité de multiplexer les analyses avec d'autres

Adaptabilité : ajout de gènes (diagnostique différentiel) possible

- **Limites**

Pas de détection des variants introniques profonds, des remaniements complexes

Nécessité d'attendre pour « regrouper » des patients avant de lancer → délai avant analyse

Nécessité d'avoir des séquenceurs adaptés avec du temps machine sur les séquenceurs

Expert 3 :

Réponses d'un clinicien

NGS

Avantages : rapidité, exhaustivité (le gène suspecté + les diagnostics différentiels)

Inconvénients : risque de trouver accidentellement des anomalies dans des gènes qui n'avaient pas d'intérêt apparent pour le patient. L'impact est plus ou moins important selon la manière dont le panel est construit (dans le cadre des aminoacidopathies, quasiment toutes ont une prise en charge qui bénéficiera au patient et l'examen biochimique de base, la chromatographie des acides aminés, aura déjà écarté la plupart).

Inconvénients : un seul, pour être rentable il faut passer suffisamment de patients en une fois. Il faut donc parfois attendre d'avoir atteint un nombre minimum de patients pour lancer l'analyse.

SANGER

Avantages : pas nécessaire d'attendre d'avoir rempli un panel (c'est-à-dire d'avoir atteint le nombre suffisant de patients) pour lancer l'analyse.

Inconvénient : cependant pour le laboratoire cela demande par patient beaucoup plus de temps de techniciens que NGS, de sorte que la plupart des laboratoires rechignent à faire des analyses par Sanger au coup par coup.

Expert 4 : n'a pas répondu

Expert 5 :

Pour les trois maladies la technique par NGS permettrait de réaliser l'analyse de ces gènes en même temps que les autres gènes, sans délais supplémentaires et risque d'errance diagnostique. Le seul avantage de l'analyse par Sanger est que le délai de réponse pourrait être plus court, par exemple dans le cas de l'analyse du gène PAH par méthode SANGER en cas d'hyperphénylalaninémie. Le sanger pourrait aussi être utilisé pour le dépistage des apparentés à risque, ou la recherche d'hétérozygotie (analyse de ségrégation) quand les variants pathogènes sont déjà connues

Compte rendu de consultation des experts

L'ensemble des cinq experts sollicités (deux généticiens, deux pédiatres et un neurologue) ont répondu en retournant le questionnaire rempli ; leurs points de vue seront reproduits in extenso dans les annexes du rapport d'évaluation. La synthèse ci-dessous a été rédigée par la HAS et est soumise pour avis à l'ensemble des experts.

Spécialités des experts sollicités :

Expert 1 : généticien

Expert 2 : généticien

Expert 3 : pédiatre

Expert 4 : pédiatre

Expert 5 : neurologue

I. Concernant la clarté du rapport et la présentation des éléments du contexte (questions 1 et 2)

La clarté générale du rapport est reconnue par la majorité des experts (experts 1, 3, 4 et 5). Toutefois, des ajustements sémantiques et des précisions ont été proposés par les experts (experts 2, 3 et 5). En effet, l'expert 2 insiste sur l'utilisation du terme « variant » suivi de son appréciation, si nécessaire (pathogène, probablement pathogène, de signification inconnue, bénin, probablement bénin), celui-ci est considéré comme plus précis que le terme « mutation », qui induit des erreurs d'appréciation.

Les informations complémentaires ainsi que des précisions sémantiques apportées par les experts à la partie du rapport consacrée au contexte seront intégrées dans la version finale du rapport d'évaluation.

L'expert 1 rappelle la complexité des aminoacidopathies et la diversité des mutations génétiques qui leur sont associées. Il a été rappelé par l'expert qu'une tentative de lister de manière exhaustive les mutations dites pertinentes représenterait un travail colossal, dépassant largement le cadre et les objectifs de ce rapport.

Ainsi, la HAS décide de retirer cette section afin d'éviter tout risque de simplification excessive ou de restriction interprétative des variants à l'origine des aminoacidopathies. Le rapport conservera son orientation principale, à savoir l'évaluation des outils disponibles pour l'analyse génétique (notamment les technologies NGS et Sanger) et leur pertinence dans la pratique clinique, en s'appuyant sur les données issues de la littérature récente et des recommandations PNDs.

L'expert 4 exprime des réserves sur la sélection bibliographique, notamment le choix de ne retenir que les documents comparant NGS vs Sanger dans les aminoacidopathies¹. Selon lui, il existe des publications qui ont démontré la concordance entre NGS et Sanger dans d'autres situations cliniques, de même qu'il existe des études non comparatives (séries...) qui ont répertorié les panels génétiques pour les aminoacidopathies. Il juge ainsi que du fait de la rareté de publications comparatives pertinentes, les mutations sélectionnées ne sont pas représentatives, notamment pour certaines pathologies comme la tyrosinémie de type 1 et l'homocystinurie.

L'expert 5 remet également en question la démarche comparative NGS vs séquençage Sanger. Il considère que « la validité de l'analyse moléculaire par panel de gènes par rapport au séquençage sanger est désormais bien établie. Les panels des gènes sont déjà utilisés dans la pratique courante et remplacent souvent le séquençage sanger ».

La HAS souligne que sa méthode d'évaluation s'appuie sur une démarche comparative utilisant les critères PICO. L'objectif n'est pas de valider une technique par rapport à une autre dans toutes les indications et populations, mais de le faire dans un cadre spécifique défini pour l'évaluation (population, comparateur, etc.). Cette approche comparative permet d'évaluer la valeur ajoutée d'une technique par rapport à une autre et de formuler un avis sur le service attendu (SA) ainsi que sur son amélioration (ASA) dans une indication donnée.

L'expert 3 remet en question, pour des considérations pratiques, le principe d'utilisation d'un panel de gènes spécifique à chaque aminoacidopathie, il indique que « pour être lancée, chaque série d'analyses doit compter un nombre minimum de patients ». De ce fait, les panels actuels regroupent des maladies parfois assez différentes pour atteindre le nombre minimum de patients, en particulier pour les maladies rares... ». Selon lui, « découper les panels actuels en plus petits panels [...] aurait pour effet d'augmenter considérablement le temps d'attente entre deux séries... ».

L'expert 5 exprime la même position que l'expert 3, en soulignant que le contexte de la pratique courante consiste désormais à prescrire des panels larges de gènes, englobant à la fois ceux fréquemment associés à des phénotypes cliniques et des gènes rares, afin d'assurer une couverture exhaustive avec une seule analyse.

II. CONCERNANT L'ANALYSE DE LA LITTÉRATURE

Q3. Selon vous, y a-t-il des publications pertinentes qui répondent aux critères de sélection mentionnés pour chaque aminoacidopathie dans le rapport mais qui n'ont pas été prises en compte ?

Certains experts considèrent que certaines publications n'ont pas été prises en compte dans l'analyse réalisée par la HAS mais que cela ne remet pas en question les conclusions du rapport.

L'expert 1 estime qu'ajouter d'autres publications ne modifierait pas les conclusions du rapport.

L'expert 4 considère qu'il n'y a pas de publications manquantes mais recommande de revoir les critères de sélection (cf. supra réponse plus détaillée chapitre I). Seul l'expert 2 mentionne une étude précise portant sur la leucine, qui pourrait être incluse dans l'analyse.

Q4a. Le rapport reflète-t-il la pertinence du ou des gènes sélectionnés dans le cadre du diagnostic des aminoacidopathies ?

La majorité des experts s'accorde à dire que le document reflète globalement l'état actuel des connaissances sur la pertinence des gènes proposés dans le rapport pour le diagnostic des cinq aminoacidopathies. Les experts 3, 4, et 5 estiment que tous les gènes pertinents ont été inclus.

Les experts 1 et 2 considèrent, cependant, que d'autres aminoacidopathies moins fréquentes, comme l'hyperglycinémie sans cétose, le déficit en sulfite oxydase, les défauts de synthèse de la sérine ou encore de la glutamine, n'ont pas été évaluées dans ce rapport. Selon ces deux experts, il est vrai qu'il n'existe pas de PNDS pour ces maladies, qui sont des pathologies plus rares. Cependant, des traitements peuvent être disponibles, nécessitant un diagnostic précis, auquel l'analyse génétique contribue.

La HAS prend bien note et indique que ce rapport concerne les cinq maladies métaboliques les plus fréquentes et que l'évaluation des aminoacidopathies plus rares pourraient faire l'objet d'une évaluation ultérieure.

Q4b. Le rapport reflète-t-il l'importance de l'analyse des panels de gènes par NGS dans la stratégie diagnostique de chaque aminoacidopathie ?

La position majoritaire des experts est que le document reflète correctement l'état actuel des connaissances concernant l'importance de l'analyse des panels de gènes par NGS dans la stratégie diagnostique des aminoacidopathies.

L'expert 2 exprime néanmoins une réserve quant à la méthode de sélection des articles qui, pour la comparaison de la performance des deux techniques, n'a pas été élargie à d'autres pathologies et qui cible uniquement des gènes spécifiques des maladies rares.

La HAS précise que le périmètre d'évaluation du NGS dans ce rapport est restreint aux cinq aminoacidopathies les plus fréquentes.

III. CONCERNANT LES GÈNES À INCLURE DANS LES PANELS NGS

Q5. Quel est, selon vous, le critère le plus pertinent pour inclure un gène dans un panel à visée diagnostique des aminoacidopathies ?

La majorité des experts s'accorde à dire que le critère le plus pertinent pour inclure un gène dans un panel NGS à visée diagnostique est :

L'existence de données scientifiques validées associant ce gène à un phénotype clinique et/ou biochimique ;

Son rôle potentiel dans les diagnostics différentiels et l'orientation de la prise en charge thérapeutique ;

Son impact sur la modification de la prise en charge thérapeutique.

L'expert 5 précise que la rareté d'un gène ne doit pas être un facteur d'exclusion.

Q6. Quelles sont, selon vous, les principales bases de référence utilisées en France pour déterminer le niveau d'association génotype-phénotype d'un gène ?

La majorité des experts indique que ClinVar, OMIM et BioPKU sont les bases fréquemment utilisées pour déterminer le niveau d'association génotype-phénotype. L'expert 1 mentionne également HGMD (payante) comme une ressource complète mais non accessible librement. L'expert 2 ajoute plusieurs bases spécifiques (Decipher, GnomAD, Mobidetail, PanelApp) et détaille leurs avantages et limites. L'expert 4 complète avec GeneReviews et les PNDs.

Q7. Quel niveau de validité de l'association du gène avec la maladie est nécessaire pour inclure un gène dans un panel à visée diagnostique dans les aminoacidopathies ?
1) définitives/robustes ; 2) fortes ; 3) modérées ; autres ? Précisez à quelle classification vous vous référez pour la validité de l'association.

La position majoritaire des experts est de considérer que les gènes à inclure dans les panels diagnostiques doivent avoir une association avec la maladie validée à des niveaux au moins forts. L'expert 1 considère que les gènes à inclure doivent avoir une validité forte car un panel ne doit pas se limiter aux gènes définitifs. Cela permet de progresser dans la validation ou l'abandon des gènes en cours d'évaluation.

Q8. Avez-vous des commentaires sur les résultats de l'analyse de la littérature concernant les gènes candidats, que ce soient des panels de gènes ou un gène unique à séquencer, pour le diagnostic des aminoacidopathies ?

Les experts ont souligné à nouveau l'absence dans cette évaluation des autres aminoacidopathies beaucoup plus rares.

Pour le diagnostic de la phénylcétonurie,

L'expert 2 rapporte qu'il est difficile de distinguer à l'avance si une hyperphénylalaninémie modérée résulte d'un déficit en PAH ou en DNAJC12, il propose ainsi de restructurer les panels de gènes comme suit :

Hyperphénylalaninémies isolées (sans anomalies du métabolisme des ptérines) : PAH et DNAJC12.

HPA liées à un déficit en BH4 : PTS, GCH1, PCBD1, QDPR, et DNAJC12.

Panel génétique global pour les hyperphénylalaninémies : PAH, PTS, GCH1, PCBD1, QDPR, et DNAJC12.

L'expert 4 soulève une question sur la non-inclusion du gène SPR.

Bien que GeneReviews n'ait pas rapporté le gène SPR parmi la liste de gènes impliqués dans les HPA par déficit en BH4, la HAS précise que l'association du gène SPR avec ces HPA est considérée comme établie par ClinGen. Conformément aux recommandations de l'ACMG2, la HAS décide d'inclure le gène SPR dans le panel NGS pour le diagnostic des HPA par déficit en BH4.

Pour le diagnostic des troubles du cycle de l'urée, la majorité des experts (3, 4, 5) propose des modifications ou des ajouts au panel pour mieux couvrir les gènes pertinents. En effet, l'expert 3 et l'expert 4 suggèrent d'ajouter le gène CA5A (anhydrase carbonique 5A) pour le diagnostic différentiel des hyperammoniémies néonatales. L'expert 4 pose la question de l'inclusion du gène SLC17A7 dans le panel multigénique mais n'argumente pas cette proposition. L'expert 5 souligne une « ambiguïté entre la stratégie diagnostique générale face à une hyperammoniémie (incluant les troubles du cycle de l'urée, les altérations des transporteurs, mais aussi les aciduries organiques, les troubles de la beta oxydation) et une hyperammoniémie spécifiquement en lien avec un trouble du cycle de l'urée ». Il recommande de discuter d'un panel élargi couvrant tous les gènes liés aux hyperammoniémies (pas seulement ceux directement liés au cycle de l'urée).

Ainsi, la HAS prend en compte la demande d'inclure le gène CA5A dans le panel NGS à visée diagnostique des troubles du cycle de l'urée.

Pour le diagnostic de la leucinose, les experts (2, 3, 4, 5) suggèrent d'élargir les panels de gènes. Les gènes proposés diffèrent selon les cas : gène PPM1K responsable d'une forme modérée de leucinose (experts 2 et 3) et gène BCAT2 « (diagnostic différentiel d'élévation dans le sang des acides aminés ramifiés, ne provoquant pas de coma mais des troubles neuropsychiatriques chroniques) » (expert 3), et gène DLD « responsable d'une maladie rare, évoquée sur la base de données clinico-biologiques, parfois avec une augmentation de la leucine, et un diagnostic surtout moléculaire » (experts 4 et 5).

Ainsi, la HAS prend en compte les suggestions proposées par les experts mentionnés :

- en conservant BCKDHA, BCKDHB et DBT pour la leucinose classique ;
- en ajoutant le gène PPM1K pour détecter les formes modérées de la leucinose et en incluant les gènes BCAT2 et DLD pour le diagnostic différentiel.

Pour le diagnostic de la tyrosinémie de type 1, les experts 2 et 3 soutiennent explicitement la nécessité de discuter l'ajout du gène GSTZ1 pour le diagnostic différentiel « rarissime d'élévation de succinylacétone : le déficit en maleyl-acétoacétate isomérase (MAAID, gène GSTZ1), pseudo maladie qui est un diagnostic différentiel de dépistage néonatal positif pour la tyrosinémie (le test de dépistage consiste en un dosage de succinylacétone) ».

La HAS considère ainsi que le gène FAH et le gène GSTZ1 sont les gènes à séquencer par NGS pour le diagnostic de la tyrosinémie de type 1.

Pour le diagnostic de l'homocystinurie par déficit en CBS, les experts n'ont pas de commentaires sur les résultats de l'analyse de la littérature concernant les gènes candidats.

IV. TAUX DE CONCORDANCE NGS/SANGER

Q9 Avez-vous des commentaires sur les taux de concordance observés entre la méthode NGS et le séquençage Sanger dans la littérature ?

La position majoritaire des experts est que les taux de concordance entre le NGS et le séquençage Sanger sont de 100 % et qu'ils sont largement confirmés. Les réserves exprimées par les experts, en particulier l'expert 3, pour apprécier ce paramètre, concernent principalement la qualité méthodologique des études et leur faible effectif. L'expert 5 juge que l'analyse de la concordance est peu pertinente, la validité du NGS étant déjà bien établie.

Q9a) Concernant la phénylcétonurie :

L'expert 2 affirme explicitement la supériorité du NGS. L'expert 3 mentionne des limites dans les études incluses et exprime des réserves sur la pertinence de lister les mutations pertinentes à rechercher.

Q9b) Concernant les troubles du cycle de l'urée :

La majorité des experts considère qu'il n'existe pas de discordance entre les deux techniques. L'expert 5 mentionne par ailleurs la difficulté de détecter certaines mutations introniques notamment dans le gène OTC par NGS et par Sanger.

Q9c) Concernant la leucinose, la tyrosinémie de type 1 et l'homocystinurie par déficit en CBS

La majorité des experts s'accorde sur une concordance de 100 % entre NGS et Sanger, l'expert 2 affirmant à nouveau la supériorité du NGS.

Q10. Selon votre expérience, quel est le taux de concordance des tests NGS et Sanger pour le diagnostic des aminoacidopathies ? Est-ce que la concordance des tests varie selon les différentes aminoacidopathies ?

Les experts (1, 2, 5) rapportent que le NGS retrouve 100 % des variants qui étaient trouvés par séquençage classique par méthode de Sanger, quelle que soit le gène/l'acidoacidopathie concerné(e). Ils précisent en outre que le NGS permet d'identifier tous les grands réarrangements intragéniques (duplication d'exons par exemple) non visibles par la technique Sanger.

Les experts 3 et 4 ne se prononcent pas sur cette question.

Q11. Quelle couverture et quelle profondeur de séquençage minimales permettent de détecter les SNV et Indels impliqués dans les aminoacidopathies ?

Les experts 1 et 2 considèrent qu'une profondeur de 30X est le standard minimal dans les technologies NGS actuelles.

L'expert 1 souligne l'importance d'une couverture complète (100 %) des régions codantes et des jonctions intron-exon pour garantir la détection des SNV et Indels impliqués dans les aminoacidopathies.

Les autres experts n'ont pas exprimé d'avis sur cette question.

V. UTILITÉ CLINIQUE DES PANELS

Q12. Quelle est la valeur ajoutée de l'utilisation de la technologie NGS pour le séquençage d'un ou plusieurs gènes d'intérêt par rapport au séquençage Sanger dans le diagnostic des aminoacidopathies ?

La majorité des experts s'accordent sur les nombreux avantages du NGS par rapport à la méthode Sanger notamment en matière de rapidité et d'exhaustivité.

L'expert 1 met en exergue un gain de temps et une réduction de l'errance diagnostique. Le NGS permet une mise en place plus rapide des traitements adaptés en analysant simultanément plusieurs gènes pouvant être impliqués dans un même tableau clinique/biologique. L'inclusion des gènes liés au diagnostic différentiel évite les erreurs d'orientation diagnostique. La méthode NGS permet également d'identifier des variations structurales (CNV) qui ne sont pas détectables avec la méthode Sanger et permet parfois une réduction importante des coûts selon le nombre de gènes responsables d'un même tableau clinico-biologique.

L'expert 2 rapporte que contrairement au séquençage Sanger qui nécessite une analyse exon par exon, le NGS permet une évaluation simultanée de plusieurs exons/gènes ce qui accélère le diagnostic et réduit le nombre de patients en impasse diagnostique. Le NGS facilite également l'adaptation aux avancées scientifiques en permettant une mise à jour rapide des gènes et zones analysées sans nécessité de modifications complexes comme celles exigées par la méthode Sanger.

L'expert 3 rapporte que certains « traits biochimiques » orientent vers une aminoacidopathie mais ne permettent pas d'exclure certaines causes rares ou des maladies nécessitant des traitements spécifiques (« ex. DNAJC12 et phénylcétonurie ; déficits en NAGS et en CPS... »). L'analyse simultanée de tous les gènes « responsables du tableau clinique/biochimique est donc intéressante pour : le diagnostic, exclure d'autres pathologies, la prise en charge thérapeutique et psychologique, le pronostic. Le diagnostic précoce maximise ainsi l'impact clinique pour le patient.

L'expert 4 fait aussi état de la « rapidité de rendu théorique du NGS et le fait de pouvoir avoir des panels multigéniques ».

L'expert 5 rapporte, au même titre que les experts 1 et 3, l'intérêt du NGS pour le diagnostic différentiel ; il souligne que l'analyse des panels NGS ne se limite pas aux maladies les plus fréquentes mais concerne aussi des maladies plus rares ce qui améliore la probabilité d'obtenir rapidement un diagnostic moléculaire définitif. Cette technologie est également pertinente dans un cadre plus large comme le diagnostic prénatal (« mentionnée seulement pour le déficit en CBS, alors que cela pourrait être une demande aussi dans le cadre d'une leucine ou d'un trouble du cycle de l'urée »).

Q13. Quelles sont les limites des panels NGS et comment celles-ci influencent-elles les résultats cliniques ?

Les experts 1 et 5 indiquent que l'interprétation des résultats issus des panels NGS requiert une expertise en biologie moléculaire. Selon l'expert 1, cette compétence fait désormais partie de la formation des biologistes spécialisés en biologie moléculaire. L'utilisation d'outils bio-informatiques adaptés et l'accès à certaines bases de données payantes sont aussi considérés comme des limites inhérentes aux panels NGS.

Selon l'expert 2, les limites des panels NGS dépendent de la manière dont ils sont conçus. Leur conception dépend des laboratoires selon l'exhaustivité des gènes couverts, l'inclusion ou non des régions régulatrices, promotrices et exons non codants, la taille des régions introniques flanquant les exons et l'inclusion de régions introniques profondes. Certains laboratoires analysent des zones introniques profondes déjà connues pour contenir des variants pathogènes. Toutefois, les panels NGS « ne couvrent pas les zones introniques profondes et ne permettent pas la détection des variants dans ces zones du génome ».

L'expert 3 a souligné comme limite l'inégalité territoriale dans l'accès aux panels NGS et le délai de rendu des résultats qui peut être long dans certains laboratoires, ce qui peut retarder la prise en charge des patients. Il a indiqué que dans certains cas, l'absence de résultats rapides peut conduire à des

traitements initiaux inadaptés en attendant la confirmation génétique. Il a par ailleurs précisé que pour des patients aux symptômes non spécifiques, la réalisation de plusieurs panels est parfois nécessaire. Une insuffisance hépatique aiguë peut être liée à un déficit du cycle de l'urée ou à une maladie de la filière hépatique Filfoie, nécessitant la réalisation d'un exome ou d'un génome.

Lorsqu'un nouveau gène est identifié comme impliqué dans une pathologie, un délai peut être nécessaire avant qu'il ne soit ajouté aux panels. Cela implique que certains patients doivent repasser « plusieurs fois sur le même panel, afin de bénéficier de l'analyse des gènes rajoutés sur la version la plus récente ».

L'expert 4 a également souligné que le délai de rendu des résultats peut être long dans certains laboratoires ce qui peut retarder la prise en charge des patients.

L'expert 5 a indiqué qu'en cas de panel négatif, il est suggéré de faire une analyse plus large et de rechercher des variants introniques.

Q14. Les panels NGS sont décrits comme un outil pour exclure d'autres pathologies aux symptômes similaires. Est-ce que cela influence les orientations de prise en charge ?

L'expert 1 affirme sans équivoque que les panels NGS en tant qu'outils pour exclure d'autres pathologies aux symptômes similaires influencent les orientations de prise en charge.

L'expert 2 explique que le diagnostic différentiel permis par les panels NGS a un impact sur le traitement car certaines pathologies présentent des phénotypes proches mais nécessitent des prises en charge différentes. Il cite l'exemple des déficits en NAGS et en CPS qui ont une présentation clinique et biologique identique « mais il existe un traitement spécifique pour le déficit en NAGS (Carbaglu®) ».

L'expert 3 indique qu'il y a un risque de prises en charge suboptimales en attendant les résultats du NGS. Il cite le cas de patients atteints d'un trouble du cycle de l'urée traités par acide carglumique à tort avant que le diagnostic génétique ne révèle un déficit en OTC, soulignant ainsi l'impact clinique et économique d'un traitement inadapté.

L'expert 4 souligne que le NGS peut aider à orienter ou exclure un diagnostic.

L'expert 5 rappelle l'importance du diagnostic moléculaire dans le conseil génétique et le diagnostic prénatal. Il rappelle que la prise en charge ou le pronostic peut varier selon les pathologies identifiées.

Q15. Existe-t-il des recommandations pour adapter le traitement en fonction des mutations génétiques identifiées pour chaque aminoacidopathie ?

Les experts s'accordent sur le fait qu'il n'existe pas de recommandations généralisées pour adapter les traitements en fonction des mutations identifiées pour chaque aminoacidopathie. Toutefois certaines situations cliniques bénéficient d'une approche adaptée.

L'expert 1 précise que l'adaptation thérapeutique en fonction des mutations est surtout pertinente pour les maladies vitaminosensibles comme la phénylcétonurie et l'homocystinurie par déficit en CBS. Toutefois, ces recommandations ne remplacent pas les tests fonctionnels permettant d'évaluer la réponse au traitement.

L'expert 2 confirme qu'il n'existe pas de recommandations pour « adapter le traitement en fonction des variants pour chaque aminoacidopathie mais il en existe pour certaines, en particulier pour la phénylcétonurie ».

L'expert 3 met en avant l'intérêt de l'analyse génétique pour prédire la réponse au traitement dans plusieurs maladies :

Dans la phénylcétonurie, certains variants du gène PAH permettent d'anticiper l'efficacité du traitement par saproptérine ou « une inefficacité de ce traitement ».

Pour certaines hyperphénylalaninémies, l'identification de mutations dans DNAJC12 permet d'adapter la prise en charge car cette pathologie ne peut pas être distinguée de la phénylcétonurie via la biochimie.

Concernant les troubles du cycle de l'urée, le déficit en NAGS peut être confondu avec un déficit en CPS ou en OTC. « L'étude génétique permet alors de déterminer si le traitement par acide carglumique est indiqué en première ligne ».

L'expert 4 confirme que certaines mutations sont associées à une sensibilité aux traitements spécifiques, comme le BH4 dans la phénylcétonurie et la vitamine B6 dans l'homocystinurie. Il souligne également que certaines mutations sont décrites dans des formes néonatales ou tardives de maladies comme l'OTC.

L'expert 5 détaille plusieurs cas où la génétique influence la prise en charge :

Dans la phénylcétonurie, l'analyse des mutations permet d'évaluer la réponse potentielle au BH4 et pour les maladies avec hyperphénylalaninémie autres que la phénylcétonurie, « l'identification des mutations et des gènes impliqués permet la mise en place de traitements spécifiques ».

Pour les troubles du cycle de l'urée, certaines mutations dans OTC sont associées à des formes plus sévères et peuvent orienter vers une greffe hépatique. Des mutations dans les déficits en NAGS, en arginase ou ASS1 (citrullinémie de type 2) impliquent des prises en charge différentes.

Pour la leucinose, il n'existe pas de relation bien établie entre mutations et prise en charge, sauf pour certaines mutations du gène DBT qui peuvent répondre à un traitement par thiamine. En outre, « si inclusion du gène DLD (sous unité E3) cela pourrait changer aussi la prise en charge ».

Pour le déficit en CBS, certaines mutations homozygotes peuvent être prédictives d'une réponse à la vitamine B6 bien que « la sensibilité à la B6 soit déterminée surtout sur la base de la réponse biologique après son administration ».

L'expert ne se prononce pas sur la tyrosinémie de type 1.

VI. ENJEUX ORGANISATIONNELS

Q16. Est-ce que les professionnels de santé doivent bénéficier de formations spécifiques pour garantir une interprétation précise des données issues de l'analyse des panels NGS ?

La majorité des experts estime qu'une formation spécifique est nécessaire pour garantir une interprétation précise des données issues de l'analyse des panels NGS.

L'expert 1 considère que cette formation est déjà incluse dans le cursus de DES de biologie médicale (option MMPG), notamment dans les CHU et que la transition vers le NGS est largement réalisée.

Toutefois, il souligne que pour les professionnels découvrant cette technologie, une formation adaptée reste nécessaire.

L'expert 2 insiste sur le caractère obligatoire de cette formation pour l'obtention de « l'agrément pour la pratique des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales » (pré-requis pour signer des résultats de NGS ou Sanger). Ce processus implique au moins deux ans d'expérience dans un laboratoire de biologie moléculaire, période durant laquelle les professionnels sont directement confrontés à l'interprétation des résultats NGS.

L'expert 3, étant clinicien, ne se prononce pas sur cette question.

L'expert 4 affirme que les biologistes et biochimistes spécialisés en maladies métaboliques doivent être formés.

L'expert 5 souligne que cette formation ne concerne pas uniquement les biologistes et généticiens interpréteurs mais aussi les cliniciens prescripteurs.

Q17. Quels sont les changements organisationnels les plus critiques pour répondre aux exigences de la technologie NGS et optimiser son intégration dans les soins courants ?

Selon l'expert 1, il y a une nécessité de disposer des équipements appropriés pour le séquençage, la préparation des librairies et l'analyse bio-informatique. L'avantage du NGS est qu'il permet d'analyser simultanément un grand nombre d'échantillons (20 à 50 patients par technicien).

Selon l'expert 2, bien que le NGS soit déjà utilisé en pratique courante, notamment dans les laboratoires hospitaliers (depuis 10 ans), il est important d'avoir un personnel technique et biologique adapté et « la rémunération de l'analyse doit être pertinente au regard du coût (personnel, réactifs...) »

Les laboratoires doivent disposer de séquenceurs et de pipelines bio-informatiques performants pour garantir une analyse précise des résultats.

Selon l'expert 3, du point de vue du clinicien, aucune adaptation organisationnelle majeure n'est requise, si ce n'est la nécessité de connaître la composition des panels de gènes utilisés. Pour garantir la pertinence des analyses, les demandes doivent être formulées de manière précise, permettant ainsi au généticien de vérifier l'adéquation du panel aux symptômes du patient.

Selon l'expert 4, l'inclusion rapide des nouveaux gènes identifiés dans les panels de séquençage représente un défi. De plus, dans le cadre d'une application thérapeutique, il est impératif de fournir un rendu rapide des résultats du panel.

Selon l'expert 5, les laboratoires doivent assurer une veille scientifique pour mettre à jour leurs panels en fonction des nouvelles découvertes. Il est également important de structurer le circuit de prescription en formant les cliniciens spécialisés dans les maladies rares du métabolisme. Une interprétation rigoureuse des résultats est nécessaire pour éviter les erreurs diagnostiques, notamment la communication de mutations non pathogéniques ou de résultats faussement négatifs qui nécessiteraient des analyses complémentaires.

Q18. Est-ce que la technologie NGS a significativement réduit le temps de diagnostic des aminoacidopathies ?

La majorité des experts s'accorde à dire que la technologie NGS a permis une réduction significative du temps de diagnostic sous certaines conditions organisationnelles et techniques.

L'expert 1 souligne que l'efficacité du NGS dépend fortement de la fréquence de passage des panels qui doit être suffisamment régulière pour optimiser son utilité. Il préconise le regroupement de plusieurs panels (« aminoacidopathies, aciduries organiques, anomalies de l'oxydation des acides gras, voire un panel pan-métabolique mais une analyse in silico de chaque sous panel spécifique en fonction de la porte d'entrée ») afin de garantir des analyses fréquentes. Sans une demande suffisante, l'utilisation du NGS pourrait ne pas être plus avantageuse que le séquençage Sanger en matière de délais et de coûts.

L'expert 2 rapporte que le NGS a permis d'accélérer le diagnostic pour la plupart des patients, notamment en rendant simultanément disponibles les résultats de plusieurs gènes alors qu'auparavant ceux-ci étaient analysés de manière séquentielle. Cependant, il indique que la rapidité du diagnostic dépend aussi de la disponibilité des séquenceurs et du volume de patients analysés afin d'éviter de lancer des séquençages à perte.

L'expert 3 met en avant que, bien que le diagnostic initial repose souvent sur la biochimie (« sauf pour l'hyperphénylalaninémie, OTC/NAGS/CPS et les hyperhomocystéinémie »), le NGS a permis un gain de temps significatif dans l'organisation des analyses génétiques. Auparavant, certaines analyses de gènes spécifiques nécessitaient l'envoi d'échantillons dans différents laboratoires, y compris en dehors de la France, ce qui rallongeait considérablement le délai d'obtention des résultats.

L'expert 4 est plus réservé quant à l'impact du NGS sur le diagnostic des aminoacidopathies. Il estime que la biochimie reste l'outil principal de diagnostic et que la génétique n'intervient qu'en complément, principalement pour des cas douteux. Selon lui, le NGS apporte rarement le diagnostic ou la prise en charge thérapeutique (« cas vitaminosensibles »).

L'expert 5 rejoint l'avis des premiers experts et considère que la rapidité apportée par le NGS est l'une des raisons pour lesquelles cette technologie est aujourd'hui largement adoptée.

Q19. Avez-vous d'autres commentaires à formuler sur cette version intermédiaire du rapport d'évaluation ?

L'expert 1 s'interroge sur l'inclusion des autres aminoacidopathies précédemment discutées et leur prise en compte dans l'évaluation.

L'expert 2 souligne que les anomalies du cycle de l'urée ne sont pas incluses dans le dépistage néonatal en France, contrairement à la phénylcétonurie, l'homocystinurie et la leucinose. Il corrige par ailleurs dans la partie contexte, une imprécision sur la description du séquençage de Sanger, qui se fait exon par exon et non gène par gène³. Il précise également que la validation des variants obtenus par NGS via cette méthode n'est plus systématique, les performances du NGS étant désormais bien établies. Enfin, l'expert signale l'existence d'une base de données australienne fiable, PanelApp, régulièrement mise à jour.

L'expert 3 questionne l'inclusion des panels in silico dans l'évaluation.

L'expert 4 rappelle que le choix des publications utilisées peut être différent et suggère de retirer le critère de comparaison entre le NGS et Sanger.

Selon l'expert 5, bien que le rapport précise qu'il ne définit pas les conditions de réalisation du NGS ciblé, il est important de considérer la validité des résultats d'un panel de gènes en fonction du contexte clinique, de l'interprétation biologique et des compétences des professionnels impliqués. Il souligne ainsi la nécessité de clarifier les périmètres de prescription et d'utilisation des panels. Enfin, en raison

de son champ d'expertise (« maladie métabolique à expression neurologique chez l'adulte »), il indique ne pas se prononcer sur la tyrosinémie de type 1.

Annexe 3. Consultation des parties prenantes

Les organismes professionnels et associations de patients et d'usagers suivants ont été consultés en tant que parties prenantes pour recueillir leur point de vue sur une version provisoire du rapport d'évaluation. Seuls le CNP de pédiatrie, le CNP d'endocrinologie, diabétologie et nutrition, le CNP de neurologie, le CNP d'hépto-gastroentérologie, l'Association nationale des praticiens de génétique moléculaire (ANPGM) et la filière de santé G2M ont répondu. Leurs réponses *in extenso* sont présentées ci-après.

Organismes
CNP de biologie médicale
CNP de génétique clinique, chromosomique et moléculaire
CNP de pédiatrie
CNP de néphrologie
CNP d'endocrinologie, diabétologie et nutrition
CNP de neurologie
CNP d'hépto-gastroentérologie
Collège de médecine générale
Association nationale des praticiens de génétique moléculaire (ANPGM)
Association des cytogénéticiens de langue française
Société française de neurologie pédiatrique
Filière de santé maladies rares G2M
Les feux follets (association de patients et d'usagers)
Les enfants du jardin (association de patients et d'usagers)

Consultation de l'Agence de la biomédecine

L'institution publique suivante a également été consultée en tant que partie prenante pour recueillir son point de vue sur une version provisoire du rapport d'évaluation en répondant à un questionnaire rédigé par la HAS. Son commentaire *in extenso* est présenté ci-après.

Organismes
Agence de la Biomédecine (ABM)



Développer la qualité dans le champ
sanitaire, social et médico-social

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES PARTIES PRENANTES

Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025

par voie électronique à l'adresse suivante : has_seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

☒ Oui

☐ Non

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document si besoin) :

Les commentaires ont été bien retranscrits. Pas de remarque particulière.

Une coquille à la page 75 paragraphe Tyrosinémie 1, dernière ligne en italique, il s'agit du panel tyrosinémie et pas du panel leucine.

Nom de l'organisme : CNP DE NEUROLOGIE

Date et Signature : Pr Alain Créange, Président du CNP de Neurologie

A Créteil le 2 mai 2025.....

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has_seap.secretariat@has-sante.fr

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES PARTIES PRENANTES

**Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies**

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025

par voie électronique à l'adresse suivante : has.seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

Oui

~~Non~~

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document si besoin) :

Réponse concertée de la filière G2m :

Nous tenons à vous remercier pour la qualité du travail réalisé dans le cadre du rapport relatif à la structuration des panels de séquençage pour les pathologies métaboliques héréditaires, ainsi que pour les recommandations formulées, qui vont dans le sens d'une amélioration du parcours diagnostique et de la prise en charge des patients.

Cependant, nous souhaiterions soumettre à votre attention quelques remarques concernant la structuration de certains panels, dans un souci de cohérence, de lisibilité et d'efficacité diagnostique :

1. Structuration des panels pour les hyperphénylalaninémies

Le rapport propose trois panels distincts pour les hyperphénylalaninémies :

- (1) Hyperphénylalaninémies à métabolisme du BH4 normal,
- (2) Hyperphénylalaninémies avec déficit du métabolisme du BH4,
- (3) Hyperphénylalaninémies (général).

Dans une logique d'optimisation et de simplification de l'outil diagnostique, nous proposons de regrouper l'ensemble de ces gènes au sein d'un **seul et unique panel dédié aux hyperphénylalaninémies**, ce qui renforcerait la lisibilité pour les cliniciens prescripteurs, tout en restant en cohérence avec les pratiques diagnostiques actuelles.

2. Structuration du panel pour les déficits du cycle de l'urée (CDU)

Le rapport propose un panel unique comprenant les 10 gènes impliqués dans les déficits du cycle de l'urée. Nous sommes bien évidemment d'accord avec la notion de **panel unique regroupant les gènes d'une même "porte d'entrée" diagnostique**.

3. Adhésion aux préconisations de la HAS concernant la réalisation des tests

Nous souscrivons pleinement aux recommandations suivantes :

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr

- **Réalisation des analyses** dans des laboratoires experts en lien avec les CRMR.

Cependant, cela soulève la question du devenir des panels actuellement proposés par des laboratoires privés tels que Cerba. Seront-ils encore autorisés à proposer ces analyses dans le cadre du parcours de soins national ?

- **Interprétation des résultats** par un biologiste généticien expert des pathologies ciblées, indépendamment du laboratoire ayant réalisé techniquement l'examen.

Ce point nous paraît fondamental pour garantir la qualité et la pertinence de l'interprétation clinique.

- **Prescription des examens** par des médecins compétents en génétique et /ou maladies héréditaires du métabolisme, en lien avec des centres experts tels que ceux de la filière G2M.

Cette disposition permettra d'assurer une meilleure coordination entre les cliniciens et les biologistes et d'optimiser les indications des examens génétiques.

- **Evolutivité des panels** selon l'avancée des connaissances scientifiques.

Il nous semble indispensable que les modalités d'actualisation de ces panels soient définies de manière claire et opérationnelle dans les meilleurs délais. Par ailleurs, il serait pertinent de préciser si ce rôle reviendra aux filières de santé ou à une instance nationale. À titre d'exemple, nous notons déjà l'absence du gène PPM1K dans le panel proposé pour la leucine, ce qui illustre la nécessité d'un processus réactif et concerté d'actualisation.

- **Nos panels ont un rendement très bon, dès lors que l'indication est une présentation clinique associée à des marqueurs biochimiques spécifiques.** Ces panels sont une force de « frappe » diagnostique et l'association de plusieurs gènes permet aussi de ne pas « rater » un diagnostic différentiel. Le Sanger gardera des indications (dépistage de la fratrie ou séquençage d'un gène, selon les équipes par exemple).

- **Ces panels doivent être réalisés par les cliniciens et biologistes experts de la filière G2m. Les commentaires des généticiens étaient très pertinents. Enfin, pourquoi pas un panel unique avec l'ensemble des gènes métabolique ?**

Nous vous remercions par avance pour l'attention portée à ces remarques, et restons à votre disposition pour toute discussion complémentaire ou participation à d'éventuels groupes de travail sur ces thématiques.

Veuillez agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos salutations distinguées.

Nom de l'organisme : Filière de santé maladies rares : Maladies Héréditaires Métaboliques G2m



Date et Signature :

A Paris, le 18/04/2025

Pr Pascale de LONLAY : Coordinatrice de la filière G2M

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr



Développer la qualité dans le champ
sanitaire, social et médico-social

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES INSTITUTIONS PUBLIQUES

**Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies**

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025

Par voie électronique à l'adresse suivante : has_seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

☒ Oui

☐ Non

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document si besoin) :

L'abréviation DPN est classiquement utilisée pour le diagnostic prénatal, comme d'ailleurs cela est repris p89 du rapport. Afin d'éviter une source de confusion au sein des parties - titre et paragraphe- 3.1.1.1 et 3.1.1.3, il est nécessaire de remplacer DPN par DNN, abréviation classiquement utilisée pour le dépistage néonatal.

Concernant l'accès au DPN/DPI moléculaire, outre la nécessité d'un diagnostic génétique informatif préalable, leur accès et modalités sont strictement encadrés (L2131-1 et Arrêté du 18 juin 2024 modifiant l'arrêté du 1er juin 2015 déterminant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités d'accès, de prise en charge des femmes enceintes et des couples, d'organisation et de fonctionnement des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal en matière de diagnostic prénatal et de diagnostic préimplantatoire). Ainsi, il ne faut pas confondre faisabilité (informativité du test génétique) /proposition et indication à un DPN/DPI. En effet, statuer sur de telle indication est l'une des missions des CPDPN, dans le cadre de réunion pluridisciplinaire, pour un dossier donné. Il apparaît important de porter cette précision au sein des pages p31, p43, p54, p64.

De plus, p 54 : la phrase « Le diagnostic prénatal est toutefois discutable en raison de l'amélioration du pronostic sous nitisinone » semble peu appropriée ; l'indication ou non d'accéder à un DPN fait suite la discussion du dossier au sein d'un CPDPN.

P63 : la phrase « L'analyse moléculaire sert à préciser la sensibilité des mutations identifiées à la vitamine B6 en tenant compte des informations disponibles dans la littérature » est à remplacer par la phrase « L'analyse moléculaire sert à préciser la sensibilité à la vitamine B6 à la suite des mutations identifiées en tenant compte des informations disponibles dans la littérature » : -c'est le phénotype qui est ou non sensible à la vitamine B6, pas la mutation.

P64 : il est inexact d'utiliser le terme « personnalisé » pour une étude d'un panel ou d'un exome dans le cadre de ce rapport ; ces analyses sont « ciblées » dans un champ diagnostique précis. Proposition : « analyse de panels ou d'exome ciblées »

p84, concernant la phrase sur le rendu des résultats des ECG «Il est également préconisé que le patient et son entourage soient clairement informés des résultats obtenus à l'issue d'une analyse par panel de gènes afin qu'ils soient en mesure de prendre une décision éclairée quant à la suite de la prise en charge », il est important de préciser que les modalités de prescription, de

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has_seap.secretariat@has-sante.fr

rendu et d'information, y compris de la parentèle, de ces examens sont réglementés – R1131-3 et R1131-4, R1131-4-1, R1131-4-2-.

P84 : les praticiens sont « agréés » (l'agrément est délivré par l'ABM)

Nom de l'organisme :

Agence de la biomédecine
Direction procréation, embryologie, génétique humaines
Dr Bénédicte Demeer, généticienne

Date et Signature :

A Saint-Denis , le 24/04/2025

Mathilde Marmier, directrice

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr



Développer la qualité dans le champ
sanitaire, social et médico-social

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES PARTIES PRENANTES

Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025

par voie électronique à l'adresse suivante : has.seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

☒ Oui

☐ Non

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document
si besoin) :

.....
.....
.....
.....
.....

Nom de l'organisme :

CNP EDN (endocrinologie-diabétologie-nutrition)

Date et Signature :

A Boulogne-Billancourt , le 24/04/2025.....

Pr Pascal Crønn

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES PARTIES PRENANTES

**Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies**

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025

par voie électronique à l'adresse suivante : has.seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

☒ Oui

☐ Non

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document si besoin) :

Le rapport de l'HAS sur le séquençage NGS a été lu et le CNP est en accord avec les conclusions du rapport : « La HAS considère que l'analyse des panels de gènes par NGS est recommandée pour les cinq ami-noacidopathies suivantes : (i) les hyperphénylalaninémies, (ii) la leucine, (iii) les troubles du cycle de l'urée, (iv) la tyrosinémie de type 1 et (v) l'homocystinurie par déficit en CBS.

Nom de l'organisme : CNP d'Hépatogastroentérologie

Date et Signature : A Paris, le 29/04/2025

Pr Romain Coriat
Secrétaire général du CNP HGE

Au nom du CNP

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES PARTIES PRENANTES

**Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies**

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025
par voie électronique à l'adresse suivante : has.seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

☒ Oui ☐ Non

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document si besoin) :

Excellent travail clair et didactique.....
.....
.....
.....
.....

Nom de l'organisme :

Conseil National Professionnel de Pédiatrie

Date et Signature :

A Lille....., le 28/04/2025

A renvoyer par courriel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr

FICHE DE RECUEIL DU POINT DE VUE DES PARTIES PRENANTES

**Séquençage NGS d'un panel de gènes dans le diagnostic des
aminoacidopathies**

Fiche à nous retourner par courriel avant le 25 avril 2025

par voie électronique à l'adresse suivante : has.seap.secretariat@has-sante.fr

Êtes-vous d'accord avec la conclusion provisoire du rapport d'évaluation ?

☒ Oui ☐ Non

Si nécessaire, commentaires / précisions à apporter (joindre références bibliographiques / document si besoin) :

L'ANPGM valide ce document sans réserve.

L'argumentaire est solide pour les 5 groupes d'aminoacidopathies traitables considérées comme les plus fréquentes dont 4 font partie du programme national de dépistage néonatal.

La démarche diagnostique est claire avec une place fondamentale occupée par les explorations biochimiques, maillon indispensable du diagnostic guidant la prise en charge (stratégies thérapeutiques décrites dans les PNDs de la filière) et les analyses moléculaires, indispensables à la confirmation diagnostique et au conseil génétique.

Les panels de gènes proposés trouvent toute leur place dans ces indications avec l'analyse simultanée de plusieurs gènes par indication permettant ainsi d'inclure les gènes de diagnostics différentiels et d'améliorer les délais de résultats par rapport au Sanger. Il semble toutefois important de considérer les avis d'experts concernant les gènes à inclure (exemple : PPM1K dans le panel leucinoïse) de manière à garantir l'exhaustivité. De même, pour la phénylcétonurie, le rationnel des 3 sous-panels n'est pas évident avec certains gènes inclus dans 2 sous-panels : un regroupement pourrait clarifier cette indication.

Dans les aminoacidopathies, les rendements des panels sont excellents et il n'existe aucune de plus-value du WGS : l'inclusion des patients dans la pré-indication maladies héréditaires du métabolisme, dont le rendement est très faible, requiert la prise en compte de données biochimiques et un panel ciblé préalable.

Il est important de préciser que le maintien de la structuration nationale en réseau d'experts pour l'interprétation des données issues de ces panels est indispensable et garant de la qualité des résultats.

Nom de l'organisme :

Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire (ANPGM)

Date et Signature :

1/1
Date
signature

23/04/2025

P. HADJAYAN, Président ANPGM

riel à la HAS - Service Évaluation des Actes Professionnels
has.seap.secretariat@has-sante.fr

Laboratoire
Faculté de Médecine
22 Bd Gen
76183 Rouen ced

Annexe 4. Modalités pratiques de réalisation du test au BH4 (PNDS)

1. Test néonatal :

- Administration d'une dose unique de 20 mg/kg de BH4 chez un enfant dont le taux de Phé est > 360 µmol/L ou 6,0 mg/dL avant la mise en place d'un régime.
- Préparation du BH4 : Dissoudre un comprimé de Kuvan (100 mg) dans 10 ml de lait et donner 2 ml/kg.
- Dosage de la Phé à 0, 4, 8, 12, 24 heures.

2. Test tardif :

- À réaliser uniquement chez les patients nécessitant un traitement (taux sans traitement supérieur à 360 µmol/L (6 mg/dL) jusqu'à l'âge de 12 ans ou supérieur à 600 µmol/L (10 mg/dL) après 12 ans).
- À réaliser chez les patients dont le génotypage ne permet pas de déterminer à lui seul la sensibilité au BH4 (saproptérine, Kuvan®).
- Administrer 20 mg/kg/jour de BH4 pendant 15 jours si les taux de Phé sont au-dessus des valeurs cibles pour l'âge. Si les taux de Phé sont dans les valeurs désirées pour l'âge, un essai thérapeutique sera réalisé avec une dose de 20 mg/kg/j en augmentant progressivement les apports en Phé jusqu'à dépasser les taux désirés pour l'âge afin de déterminer la tolérance maximale sous traitement.
- Dosage de la Phé à 0, 4, 8, 12, 24 heures le premier jour puis tous les jours le matin à jeun pendant une semaine et à J14.

Interprétation :

- En période néonatale, une normalisation avant t = 8 heures fait suspecter une anomalie du métabolisme du BH4.
- Une baisse du taux de Phé à des valeurs < 360 µmol/L ou < 600 µmol/L après 12 ans doit faire envisager un traitement par BH4.
- Une baisse du taux de Phé de plus de 30 % du taux initial sans normalisation indique une sensibilité partielle au BH4. L'intérêt du traitement par BH4 devra être évalué au cas par cas en fonction de l'âge de l'enfant, de l'intensité de la réponse et de l'objectif thérapeutique qui dépend de l'âge du patient.
- Une absence de baisse de taux de Phé ou une diminution de moins de 30 % du taux initial définit la non-sensibilité au BH4.

Retrouvez tous nos travaux sur
www.has-sante.fr

