

RECHERCHE DES MUTATIONS K27M ET G34V/R DANS LES HISTONES DES TUMEURS CÉRÉBRALES PÉDIATRIQUES COMME MARQUEURS DIAGNOSTIQUES DES ASTROCYTOMES DIFFUS DE HAUT GRADE (RÉFÉRENCES – 2014.02.004 ET 2015.02.002)

Avis de réévaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 23 décembre 2015
- 1.3 **Date de publication de l'avis** : 22 février 2016

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

2.1 Nom de l'analyse

Recherche des mutations K27M et G34R/V dans les histones des tumeurs cérébrales pédiatriques comme marqueurs diagnostiques des astrocytomes diffus de haut grade (ADHG).

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

L'analyse consiste en une amplification des régions ciblées au moyen de la réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction* ou PCR) suivie d'une analyse moléculaire par séquençage bidirectionnel des amplicons. Plus précisément, l'analyse est réalisée sur l'ADN tumoral extrait de tissus congelés ou préservés dans la

paraffine. Deux amplifications sont réalisées afin de couvrir les régions spécifiques contenant les mutations d'intérêt, soit K27M et G34V/R du gène *H3F3A* (histone H3.3) ainsi que K27M du gène *HIST1H3B* (histone H3.1). Les amplicons sont ensuite séquencés par la méthode de Sanger. Les résultats sont qualitatifs.

Le test pourra être demandé par un anatomopathologiste-neuropathologiste dans le cadre de son analyse histopathologique d'une tumeur cérébrale pédiatrique à morphologie équivoque, lorsque le diagnostic différentiel inclut celui d'un astrocytome de haut grade (ADHG). Puisque les jeunes adultes ont des tumeurs cérébrales dont la signature moléculaire se rapproche plutôt du type pédiatrique, ce test pourrait aussi être demandé pour ces patients. Cette analyse moléculaire est un outil diagnostique d'appoint et son résultat doit être interprété par un anatomopathologiste en complément de l'analyse morphologique et immunohistochimique et non de façon isolée.

2.3 Modalités d'administration du test

Le tissu tumoral est obtenu par l'intermédiaire du département de pathologie du centre demandeur pour ses patients internes ou par la réception des spécimens pour ceux venant d'autres CHU. L'extraction de l'ADN à partir de tissu paraffiné sera faite au laboratoire de diagnostic moléculaire, de même que l'application de la technique de séquençage. L'analyse sera effectuée au laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine³¹. Le temps de réponse sera de deux semaines.

2.4 Société ou développeur

Analyse maison

2.5 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Ne s'applique pas.

2.6 Valeur pondérée : 165,90

3 CONTEXTE

3.1 Patients ciblés

Patients pédiatriques et jeunes adultes (< 25 ans) atteints d'un astrocytome diffus de haut grade (ADHG) ou d'une tumeur cérébrale d'histologie similaire.

3.2 Description de la maladie visée

Au Canada, les statistiques sur l'incidence du cancer montrent que le système nerveux central (SNC) représente le deuxième site le plus touché chez les enfants et les jeunes de 0 à 19 ans, derrière les leucémies. En effet, parmi les 4 550 nouveaux cas de cancer pédiatrique prévus pour les 5 prochaines années, 860 impliqueront la présence du SNC (19 %)³².

31. Lettre justificative datée du 1^{er} mai 2014 envoyée à Mme Johanne Nicole et à M. François Sanschagrin, Ph. D, de la Direction générale des services de santé et médecine universitaire (DGSSMU) du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) par le D^r Benjamin Ellezam, M.D., la D^{re} Sonia Cellot, M.D., Ph. D et la D^{re} Virginie Dormoy-Raclet, Ph. D du CHU Sainte-Justine.

32. Société canadienne du cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2015. Disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics-publication/?region=qc>.

La classification publiée en 2007 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) est reconnue comme un standard international relativement au typage et à la stadification des tumeurs gliales et autres tumeurs cérébrales [Louis *et al.*, 2007³³]. Or, les tumeurs cérébrales forment un groupe très hétérogène et leur classification à l'intérieur d'identités définies par l'OMS demeure un défi. Le tableau 1 présente quelques données épidémiologiques concernant les ADHG et autres tumeurs cérébrales dont l'histologie est équivoque.

Tableau 1 Tumeurs cérébrales pédiatriques primaires avec composante gliale (0-19 ans)

HISTOLOGIE	GRADE ¹	RÉPARTITION ²	INCIDENCE ^{2,3}	SURVIE RELATIVE À 10 ANS ⁴
Astrocytome pilocytaire	I	15,5 %	0,82	96,0 %
Astrocytome diffus	II	5,2 %	0,27	80,4 %
Astrocytomes autres (dont le XAP II)	I-III	1,9 %	0,1	70 % (XAP)
Astrocytome anaplastique	III	1,6 %	0,09	26,5 %
Glioblastome (dont le DIPG)	IV	2,7 %	0,14	12,6 %
Épendymome	I-III	5,3 %	0,28	64,9 %
Gliomes malins non-classés	III-IV	11,5 %	0,61	57,0 %
Neuronale/gliale (dont le GG)	I-III	6,9 %	0,36	72,4 %
Tumeurs embryonnaires (dont la PNET)	IV	12,5 %	0,66	55,8 %

Sigles et abréviations : DIPG : gliome pontique diffus (ou *diffuse intrinsic pontine glioma*); GG : gangliogliome; PNET : tumeur neuroectodermale primitive (ou *primitive neuroectodermal tumor*); XAP : xanthoastrocytome pléomorphe.

1. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [Louis *et al.*, 2007].

2. Données tirées du rapport statistique du CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United-States), 2006-2010. La répartition est rapportée sur toutes les tumeurs cérébrales pédiatriques (N = 21 512) et non uniquement les gliomes (N = 11 305 cas) [Ostrom *et al.*, 2013].

3. Taux d'incidence annuel par 100 000 personnes ajusté selon l'âge [Ostrom *et al.*, 2013].

4. La survie relative se définit comme le ratio de la survie observée d'un groupe de personnes atteintes d'un cancer et la survie prévue pour l'ensemble de la population présumée à toutes fins utiles exempte du cancer à l'étude et qui présente les mêmes caractéristiques (sexe, âge, secteur de résidence, etc.). Statistiques sur la survie 2004 [site Web], disponible à : <http://www.statcan.gc.ca/pub/84-601-x/2004001/4067481-fra.htm>.

L'astrocytome est une tumeur infiltrante du SNC qui se développe à partir des astrocytes. Les astrocytes sont des cellules gliales en forme d'étoile qui entourent, soutiennent et protègent les neurones [Greenberg, 1997]. Ces tumeurs sont classées en sous-groupes selon des paramètres histologiques et le degré de malignité sur une

33. Le système de gradation de l'OMS attribue aux tumeurs à évolution lente un « bas grade », soit I ou II selon leur caractère circonscrit ou non. Les tumeurs de grade I sont circonscrites et elles ont un meilleur pronostic que celles de grade II dont les limites imprécises rendent souvent difficile l'exérèse chirurgicale complète. Les tumeurs de « haut grade » sont caractérisées par une croissance rapide, soit au sein de foyers anaplasiques apparaissant dans une tumeur de bas grade (grade III) soit dans une grande partie ou dans l'ensemble de la masse tumorale (grade IV). Les signes de croissance rapide sont très importants (forte densité cellulaire, index mitotique élevé et anaplasie ou moindre différenciation cellulaire). La nécrose et la néovascularisation sont souvent observées dans les tumeurs de grade IV, mais il s'agit de signes inconstants et infidèles de la croissance rapide [adapté de l'*Atlas interactif de neuro-oncologie*, Association des neuro-oncologues d'expression française, <http://anocef.org/atlas/fr/index.html>].

échelle de I à IV selon le système de gradation de l'OMS [Louis *et al.*, 2014]. Les astrocytomes de bas grade sont généralement localisés et se développent lentement alors que les astrocytomes de haut grade se développent à un rythme accéléré et infiltrent les tissus environnants [Louis *et al.*, 2014; Greenberg, 1997]. L'ADHG est un terme accepté qui inclut à la fois l'astrocytome anaplasique de grade III (AA), le glioblastome de grade IV (GBM) ainsi que le gliome pontique diffus (DIPG). Ces types tumoraux sont décrits plus en détail aux paragraphes suivants.

Astrocytome anaplasique de grade III (AA)

L'AA se différencie des astrocytomes de bas grade par une cellularité augmentée, une activité mitotique élevée, un pléomorphisme cellulaire et nucléaire et une tendance à infiltrer les tissus environnants [Pfister *et al.*, 2009; Louis *et al.*, 2007]. L'AA peut se développer à partir d'un astrocytome de bas grade. On le trouve principalement dans les hémisphères cérébraux, mais aussi dans les structures médianes profondes du cerveau, la fosse postérieure (site préférentiel de l'épendymome anaplasique) ainsi que le tronc cérébral [Pfister *et al.*, 2009]. Le pronostic est sombre avec une survie relative à 10 ans de 26,5 %. La prolifération cellulaire de l'AA est importante et il peut évoluer rapidement vers un glioblastome de grade IV. Il se différencie principalement de ce dernier par l'absence de prolifération vasculaire et de nécrose observables à l'analyse histologique [Pfister *et al.*, 2009].

Glioblastome de grade IV (GBM)

Le GBM est une tumeur cérébrale primaire maligne et agressive classée grade IV par l'OMS [Louis *et al.*, 2007]. Les GBM pédiatriques progressent rarement à partir d'un gliome de bas grade et ils surviennent fréquemment *de novo* [Sturm *et al.*, 2012]. Les critères histologiques des GBM incluent une haute activité mitotique, une prolifération microvasculaire et des zones de nécrose [Louis *et al.*, 2007]. Les GBM constituent 80 % des tumeurs pédiatriques du tronc cérébral et ils sont associés à une survie relative à 3 ans entre 5 et 10 % [Karajannis *et al.*, 2008]. L'exérèse chirurgicale complète de cette tumeur infiltrante est quasi impossible [Wilson *et al.*, 2014].

Gliome pontique diffus de grade IV (DIPG)

Le DIPG est un GBM pédiatrique très agressif du tronc cérébral, qui apparaît parfois dans la littérature comme un diagnostic histopathologique [Adamski *et al.*, 2014; Saratsis *et al.*, 2014; Frazier *et al.*, 2009]. Une hémorragie intratumorale symptomatique, généralement localisée dans les régions nécrotiques, se produit dans presque 20 % des cas pédiatriques à la suite du diagnostic de DIPG [Green et Kieran, 2015]. Les thérapies sont rarement curatives et la survie médiane sans progression est de 7 mois alors que la survie globale est de 9 à 11 mois [Wolff *et al.*, 2011; Massimino *et al.*, 2008].

3.3 Nombre d'analyses anticipées et de patients visés

Le demandeur prévoit 24 cas annuellement en provenance du CHU Sainte-Justine, du CHUM, du CHU de Québec et du CUSM. Une demande additionnelle de 10 cas venant de l'extérieur du Québec est à prévoir, puisque ce test n'est pas disponible ailleurs au Canada.

3.4 Spécialités médicales concernées

Anatomopathologie, neurochirurgie, neuropathologie, oncologie, pédiatrie, radio-oncologie

3.5 Brève description de la situation actuelle

Même si l'évaluation clinique du patient et les résultats d'imagerie médicale peuvent fortement suggérer la présence d'un ADHG, l'étalon or concernant le diagnostic des tumeurs cérébrales repose principalement sur l'évaluation de l'aspect microscopique d'une biopsie tumorale [Ichimura *et al.*, 2012]. Toutefois, malgré des caractéristiques distinctives, plusieurs études ont démontré une faible reproductibilité des méthodes et une grande variation selon les observateurs relativement à la classification des tumeurs cérébrales. À titre d'exemple, la distinction entre un astrocytome pilocytique ou un xanthoastrocytome pléomorphe et un ADHG peut occasionnellement représenter un défi important pour le pathologiste étant donné que le pronostic et l'approche thérapeutique associés à ces tumeurs sont différents [Appin et Brat, 2014].

Des tests complémentaires tels que l'immunohistochimie et les analyses en génétique moléculaire aident à préciser le diagnostic et, dans certains cas, contribuent à une meilleure estimation du pronostic et de la valeur prédictive de réponse aux traitements. Les techniques habituellement utilisées pour mettre en évidence des délétions ou amplifications géniques sont l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la perte d'hétérozygotie et l'hybridation génomique comparative (CGH). Les mutations présentes dans certains gènes utilisés comme marqueurs moléculaires sont, pour leur part, mises en évidence par diverses techniques de séquençage.

Selon le demandeur, au cours des dernières années, l'utilisation de marqueurs moléculaires pour établir le diagnostic anatomopathologique est devenue un standard de pratique en neuropathologie. Actuellement, il n'existe aucune analyse permettant de déterminer le statut des mutations K27M et G34R/V dans les tumeurs cérébrales.

3.6 Données médico-administratives

Ne s'applique pas

3.7 Brève description des avantages évoqués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, les mutations K27M et G34R/V sont des marqueurs d'une grande spécificité et dont la sensibilité est suffisamment élevée dans la population pédiatrique pour justifier leur utilisation en neuropathologie diagnostique, particulièrement en raison du faible coût de la technologie utilisée. Toujours selon le demandeur, il est nécessaire de rechercher ces trois mutations conjointement, puisqu'elles sont mutuellement exclusives dans un ADHG donné. De plus, l'utilisation de plusieurs amorces dans une même réaction PCR est plus économique et rapide que la recherche de chacune de ces mutations individuellement ou en série.

Cette analyse sera utilisée comme outil diagnostique d'appoint sur des biopsies de tumeurs cérébrales pédiatriques de bas et de haut grade dont les résultats

histopathologiques sont équivoques. Selon le demandeur, cette situation n'est pas rare, particulièrement chez les patients pédiatriques. En effet, même de l'avis des experts du Children's Oncology Group, jusqu'à 20 % des tumeurs cérébrales sont difficilement classifiables dans une entité définie par l'OMS (Peter Burger, USCAP 2012 *Annual Meeting*³⁴). Le demandeur vise plus particulièrement à différencier les ADHG pédiatriques de cinq autres entités tumorales, soit le gangliome de grade I (GG), l'astrocytome pilocytaire de grade I (APC), le xanthoastrocytome pléomorphe de grade II (XAP), l'épendymome anaplasique de grade III (EA) ainsi que la tumeur neuroectodermique primitive de grade IV (PNET). Il est important de départager les ADHG des diagnostics différentiels précédemment énumérés, puisque leur pronostic et leur traitement sont différents [Adamski *et al.*, 2014; Louis *et al.*, 2007].

3.8 Assurance qualité

Le laboratoire est certifié par le Collège canadien de généticiens médicaux (Canadian College of Medical Genetic ou CCMG) et par Agrément Canada - ISO 15189. Il n'existe pas de contrôle de la qualité spécifique pour cette analyse, mais le laboratoire se soumet aux épreuves de séquençage Sanger du College of American Pathologists (CAP). Des témoins positifs et négatifs dont le génotype est connu sont inclus dans l'analyse. Le séquençage sera effectué de façon bidirectionnelle.

3.9 Remplacement d'un autre test

Cette analyse ne remplace aucune procédure inscrite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*.

4 DONNÉES PROBANTES

4.1 Valeur diagnostique

Indépendamment de la méthode employée pour déterminer le statut de la mutation K27M du gène *HIST1H3B* ainsi que des mutations K27M et G34V/R du gène *H3F3A*, plusieurs études de cohorte rétrospectives visant à évaluer leur fréquence parmi différents types de tumeurs cérébrales ont été recensées. Le tableau 2 présente un résumé des études qui ont évalué la valeur diagnostique de ces marqueurs.

Sensibilité et spécificité des marqueurs des mutations K27M et G34R/V dans les ADHG pédiatriques

Dans la première étude, le criblage d'une cohorte de 784 patients de tous âges, soit 159 cas pédiatriques et 625 adultes atteints de tumeurs cérébrales d'histologie et de grade différents, a démontré la présence des mutations K27M et G34R/V du gène *H3F3A* dans 34 % des ADHG pédiatriques. Ces mutations étaient absentes des autres types de tumeurs cérébrales pédiatriques et elles ont été trouvées dans seulement 3 % des ADHG chez l'adulte [Schwartzentruber *et al.*, 2012].

Dans la seconde étude, Wu et ses collègues [2012] ont effectué l'analyse Sanger de 95 ADHG pédiatriques ainsi que le séquençage de l'exome entier de 245 autres types de tumeurs cérébrales pédiatriques. Ils ont démontré que les trois mutations sont

34. Information tirée de la lettre justificative datée du 8 avril 2015 envoyée au D^r Yves Jalbert de la Direction de la biovigilance et de la biologie médicale du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) par le D^r Benjamin Ellezam, M.D. Ph. D., FRCPC.

des marqueurs diagnostiques exclusifs aux ADHG. Plus précisément, 11 % des ADHG étaient de statut K27M-H3.1, 40 % de statut K27M-H3.3 et 5 % de statut G34R/V contre 0 % pour les autres types de tumeurs [Wu *et al.*, 2012].

La mutation K27M-H3.3 a également été trouvée dans 71 % des ADHG pédiatriques (correspondant au diagnostic histopathologique du DIPG) [Khuong-Quang *et al.*, 2012].

Tableau 2 Valeur diagnostique des mutations K27M ou G34R/V des histones H3.1 et H3.3

ÉTUDE, ANNÉE	COHORTE, N ÂGE AU DIAGNOSTIC	HISTOLOGIE (N)	MÉTHODE	H3.1 N(%) HIST1H3B	H3.3 N(%) H3F3A		VALEUR DIAGNOSTIQUE
				K27M	K27M	G34R/V	
Schwartzentruber <i>et al.</i> , 2012	N = 48 2 à 20 ans	ADHG	WES et Sanger	S.O.	9/48 (19)	6/48 (13)	H3.3 muté, ADHG pédiatriques vs autres : 34 % vs 0 % H3.3 muté, ADHG pédiatrique vs adulte : 34 % vs 3 % H3.3 muté, GBM pédiatrique vs adulte : 36 % vs 3 % (p < 0.0001)
	N = 159 pédiatriques	ADHG (101) Autres (58)	Sanger	S.O.	34/101 (34) 0 (0)		
	N = 625 adultes	ADHG (426) Autres (199)		S.O.	11/426 (3) 0 (0)		
Wu <i>et al.</i> , 2012	N = 95 pédiatriques 0 à 22 ans	ADHG (95)	Sanger	10/95 (11)	38/95 (40)	5/95 (5)	K27M, ADHG vs autres : 56 % vs 0 %
	N = 252 pédiatriques	Autres (245)	WGS	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Khuong-Quang <i>et al.</i> , 2012	N = 42 7 ans [0-17]	ADHG (DIPG)	Sanger	0 (0)	30/42 (71)	0 (0)	K27M-H3.3, ADHG (DIPG) : 71 %
Gessi <i>et al.</i> , 2013	N = 123 11 ans [3 - 18]	ADHG	PSQ	S.O.	33/123 (27)	6/123 (5)	K27M-H3.3, ADHG vs PNET : 26 % vs 0 % G34R/V, ADHG vs PNET : 5 % vs 12 %
	N = 33 10 ans [1 - 17]	PNET		S.O.	0 (0)	4/33 (12)	
Venneti <i>et al.</i> , 2013	N = 76 Âge moyen de 110 à 156 mois (selon les sous-classes)	ADHG (20) Autres (56)	IHC	6/20 (30) 0 (0)		S.O. S.O.	Marquage faible ou absent en IHC (anti- H3K27me3), ADHG vs autres : 30 % vs 0 %
		ADHG (20)	Sanger	S.O.	6/20 (30)	0 (0)	
Gielen <i>et al.</i> , 2013	N = 321 9,5 ans [0-18]	ADHG (157) Autres (164)	PSQ	S.O. S.O.	40/157 (25) 0 (0)	7/157 (4) 1/164 (0.6)	K27M-H3.3, ADHG : Se = 25,5 % et Sp = 100 % G34R/V, ADHG vs autres : 4 % vs 0,6 %
Saratsis <i>et al.</i> , 2014	N = 31 8 ans [0,5-25]	ADHG (22) Autres (9)	Sanger	3/7 (43) 0 (0)	10/17 (59) 0 (0)	S.O. S.O.	K27M, ADHG (DIPG) vs autres : 77 % vs 0 %
Korshunov <i>et al.</i> , 2015	N = 202 12 ans [1-18]	ADHG	Sanger	69/202 (34)		24/202 (12)	K27M ou G34R/V, ADHG : 46 %

Sigles et abréviations : ADHG : astrocytome diffus de haut grade [ce terme inclut l'astrocytome anaplasique (AA), le glioblastome (GBM) et le gliome pontique diffus (*diffuse intrinsic pontine glioma* ou DIPG)]; IHC : immunohistochimie; N : nombre; PNET : tumeur neuroectodermale primitive (*primitive neuroectodermal tumor*); PSQ : pyroséquençage; Se : sensibilité; S.O. : sans objet; Sp : spécificité; WES : séquençage de l'exome entier (*whole exome sequencing*); WGS : séquençage du génome entier (*whole genome sequencing*).

Pour leur part, Venneti et ses collègues [2013] ont vérifié le profil immunohistochimique de 76 tumeurs pédiatriques, dont 20 ADHG, et celui de 56 tumeurs d'autres types à l'aide d'un anti-H3K27me3. Un marquage faible, voire absent, a été observé chez 30 % des ADHG pédiatriques étudiés contre 0 % pour les autres types de tumeurs. Les résultats de séquençage des ADHG ont permis de confirmer la présence de la mutation K27M dans les tumeurs produisant un marquage faible ou absent [Venneti *et al.*, 2013].

Gielen et ses collègues [2013] ont analysé une série de 321 tumeurs cérébrales pédiatriques, dont 157 ADHG et 164 tumeurs d'autres types. Ils ont démontré que 25,5 % des ADHG pédiatriques possédaient la mutation K27M-H3.3 alors qu'elle était absente des autres tumeurs. Les auteurs concluent que la mutation K27M-H3.1 est un marqueur diagnostique spécifique des ADHG avec une sensibilité de 25,5 % et une spécificité de 100 %. La mutation G34R/V a été trouvée dans 4 % des ADHG contre 0,6 % pour les tumeurs d'autres types [Gielen *et al.*, 2013].

Les résultats de Saratsis et ses collègues [2014] vont dans le même sens avec 43 % des ADHG pédiatriques positifs pour la mutation K27M-H3.1 et 59 % pour K27M-H3.3, contre 0 % pour les autres types de tumeurs cérébrales pédiatriques analysées.

Plus récemment, Kurshunov et ses collègues [2015] ont trouvé les mutations K27M et G34R/V dans 34 % et 12 % des ADHG pédiatriques analysés, respectivement.

Sensibilité et spécificité du marqueur G34R/V dans les tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET) du SNC

Dans l'étude effectuée par Gessi et ses collègues [2013], le criblage de 123 GBM et de 33 PNET, classés selon leurs caractéristiques morphologiques, a permis de démontrer la présence de la mutation G34R/V dans 12 % des PNET et 5 % des GBM analysés. Selon les auteurs, les tumeurs comportant la mutation G34R/V constitueraient un groupe histopathologique hétérogène présentant des caractéristiques microscopiques typiques à la fois des GBM et des PNET. Pour cette raison, et considérant sa faible représentation dans les tumeurs cérébrales en comparaison avec la mutation K27M, les auteurs concluent que la mutation G34R/V ne constituerait pas un marqueur moléculaire approprié pour le diagnostic neuropathologique [Gessi *et al.*, 2013]. Plus récemment, une étude menée par Korshunov et ses collègues [2016], ayant pour objectif d'effectuer une analyse histopathologique et moléculaire intégrée de 81 tumeurs primaires du SNC de statut G34R/V, soit 59 tumeurs ayant l'apparence d'un GBM et 22 autres correspondant à la description morphologique de la PNET, a démontré que ces dernières constituent une entité distincte de tumeurs malignes du SNC.

Les tumeurs ont été investiguées pour rechercher des altérations génomiques et épigénétiques. Les résultats démontrent, entre autres, que, malgré leur apparence histopathologique divergente, les GBM et les PNET du SNC comportant la mutation G34R/V possèdent une signature épigénétique uniforme, suggérant une origine biologique commune. En effet, aucune différence significative dans le profil de méthylation de l'ADN, considéré comme un outil pour la classification moléculaire des entités tumorales distinctes, n'a été trouvée. Ces résultats, couplés à d'autres données moléculaires, ont permis aux auteurs d'affirmer que les tumeurs de statut G34R/V sont en fait des gliomes de haut grade et ils recommandent la recherche de

la mutation G34R/V comme marqueur diagnostique de routine pour l'identification des tumeurs supratentorales du SNC [Korshunov *et al.*, 2016].

L'analyse intégrée des données présentées au tableau 2 permet de mettre en évidence que la mutation K27M-H3.3 serait présente dans 19 à 71 % des ADHG pédiatriques, suivie par K27M-H3.1 avec 0 à 43 % et G34R/V qui se trouverait dans 0 à 13 % des ADHG pédiatriques. Comme ces trois marqueurs sont mutuellement exclusifs dans une tumeur donnée, l'une ou l'autre de ces mutations serait présente dans 30 à 77 % des ADHG pédiatriques (sensibilité). De plus, la mutation G34R/V se trouverait dans $\leq 0,6$ % des autres types de tumeurs cérébrales pédiatriques alors que les mutations K27M-H3.3 et K27M-H3.1 en seraient complètement absentes. Les mutations du gène *H3F3A* (K27M et G34R/V de l'histone H3.3) seraient présentes dans ≤ 3 % des ADHG chez l'adulte. Ces dernières observations permettent d'estimer que ces trois marqueurs confondus ont une sensibilité de 30 à 77 % et une spécificité de près de 97 % pour les ADHG pédiatriques.

4.2 Valeur pronostique

Aucune étude relative à la valeur pronostique des marqueurs K27M et G34R/V n'a été retenue, puisque l'objectif de la présente analyse n'est pas de générer une information permettant de prédire l'issue de la maladie ou sa réponse à un traitement.

4.3 Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue, puisque l'objectif de la présente analyse n'est pas de générer une information permettant de choisir ou de modifier un traitement.

4.4 Validité analytique

La revue de littérature n'a pas permis de repérer d'études traitant de la validité analytique concernant spécifiquement la détection des mutations K27M et G34R/V dans un contexte clinique tel que décrit dans le présent avis.

4.5 Données fournies par le demandeur

Le laboratoire demandeur a choisi des amorces spécifiques pour les deux gènes où les régions entourant les mutations recherchées devaient être amplifiées. Ils ont extrait l'ADN de tumeurs fixées en bloc de paraffine et réalisé la PCR. Chaque produit d'amplification a ensuite été séquencé. Ils ont d'abord testé leur technique sur des échantillons normaux et, lorsque celle-ci a été au point, la validation a été réalisée sur trois échantillons présentant une mutation mise en évidence dans un laboratoire de recherche du Montreal Children's Hospital. Le processus de développement a suivi celui recommandé par des organisations professionnelles internationales comme le Canadian College of Medical Geneticists (CCMG). Des exemples de séquences anonymisées comportant les mutations K27M et G34R/V dans les gènes *H3F3A* et *HIST1HB3* sont fournis à l'annexe A.

Dans le cadre de son processus de validation, réalisé en 2014, le demandeur a effectué la recherche des mutations K27M et G34R/V sur 23 tumeurs, y inclus plusieurs cas pour lesquels le diagnostic d'astrocytome diffus de haut grade demeurait équivoque à la suite de l'analyse morphologique et immunohistochimique. À titre d'exemple, voici le descriptif de cinq cas pour lesquels

la détermination du statut des mutations K27M et G34R/V a été utilisée comme outil diagnostique d'appoint pour l'identification de tumeurs cérébrales d'histologie similaire :

- Dans un cas de tumeur hémisphérique chez un garçon de 12 ans pour lequel le diagnostic différentiel morphologique était celui d'un PNET, la présence d'une mutation G34R dans *H3F3A* a permis de confirmer le diagnostic de glioblastome;
- Dans deux cas de tumeur cérébrale pédiatrique (4 et 13 ans) où le diagnostic pouvait à la fois évoquer un glioblastome et un épendymome anaplasique, l'absence de mutation des histones n'a pas permis de trancher sur une base moléculaire;
- Dans un cas de tumeur diencephalique chez une jeune de 23 ans (chez qui le taux attendu de mutation K27M était relativement élevé), l'absence de mutation de K27M ajoutée à l'absence d'autres mutations caractéristiques de l'astrocytome (*ATRX* et *IDH1*) a apporté un soutien au diagnostic de PNET;
- Dans un cas de tumeur thalamique chez un jeune de 21 ans pour qui le diagnostic différentiel morphologique était celui d'un astrocytome pilocytaire, la présence d'une mutation K27M dans *H3F3A* a permis de confirmer le diagnostic de glioblastome.

5 IMPACTS BUDGÉTAIRES

N'ont pas été évalués

6 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Cancers rares, nécessité de concentrer l'expertise

7 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'AUTRES ORGANISATIONS

Selon l'International Society of Neuropathology (ISN), un diagnostic intégré comprenant à la fois des données histologiques et moléculaires est désormais nécessaire afin d'assurer une définition étroite et hautement uniforme des groupes tumoraux du SNC [Louis *et al.*, 2014]. Cette classification est critique, voire nécessaire à l'établissement d'un diagnostic, d'un pronostic ou d'un traitement adapté à l'entité tumorale. Plus précisément, il est reconnu et accepté par les neuropathologistes et autres experts du domaine que certains types de tumeurs pédiatriques possèdent une empreinte moléculaire différente de celle observée chez l'adulte. La mutation K27M de l'histone H3.3, entre autres, est mentionnée comme marqueur diagnostique spécifique des ADHG pédiatriques [Louis *et al.*, 2014].

Le College of American Pathologists (CAP) recommande l'intégration des données moléculaires dans le diagnostic clinique de divers types de tumeurs solides. À titre d'exemple, pour les néoplasies du SNC, les mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* sont recommandées pour la distinction des gliomes des glioses réactives. L'analyse du gène *BRAF* est recommandée dans le diagnostic des astrocytomes pilocytiques et des xanthoastrocytomes pléomorphiques³⁵.

35. Information tirée du site officiel du College of American Pathologists (CAP). *Clinical solid tumor molecular oncology: Selected tests by tumor type*, disponible à : <http://www.cap.org/web/home/resources/genomics-molecular-medicine-education-resources/genomics-molecular-medicine-tools-resources>.

8 SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION

8.1 Contexte

Les tumeurs cérébrales pédiatriques forment un groupe hétérogène et leur classification à l'intérieur d'entités définies par l'OMS demeure un défi. Le laboratoire requérant propose d'utiliser les mutations K27M et G34V/R du gène *H3F3A* ainsi que K27M du gène *HIST1H3B* comme outil diagnostique d'appoint afin de départager les ADHG pédiatriques de cinq autres diagnostics différentiels, soit le gangliome de grade I (GG), l'astrocytome pilocytaire de grade I (APC), le xanthoastrocytome pléomorphe de grade II (XAP), l'épendymome anaplasique de grade III (EA) ainsi que la tumeur neuroectodermique primitive de grade IV (PNET).

8.2 Valeur diagnostique

Les études répertoriées montrent que les mutations K27M et G34R/V des gènes *HIST1H3B* et *H3F3A* sont des marqueurs spécifiques des ADHG pédiatriques. La mutation K27M-H3.3 serait présente dans 19 à 71 % des ADHG pédiatriques, K27M-H3.1 dans 0 à 43 % et G34R/V dans 0 à 13 % de ces tumeurs. Ces trois mutations sont mutuellement exclusives dans une tumeur donnée. Analysées ensemble, elles seraient présentes dans 30 à 77 % des ADHG pédiatriques. De plus, la mutation G34R/V se trouverait dans $\leq 0,6$ % des autres types de tumeurs cérébrales pédiatriques alors que les mutations K27M-H3.3 et K27M-H3.1 en seraient complètement absentes. Les mutations du gène *H3F3A* (K27M et G34R/V de l'histone H3.3) seraient présentes dans ≤ 3 % des ADHG chez l'adulte. Ces dernières observations permettent d'estimer que ces trois marqueurs confondus ont une sensibilité de 30 à 77 % et une spécificité de près de 97 % pour les ADHG pédiatriques.

L'analyse intégrée des caractères histopathologiques et moléculaires des tumeurs de statut G34R/V démontre qu'elles constituent un type de gliome de haut grade distinct qui inclurait des tumeurs présentant des caractéristiques microscopiques typiques à la fois des GBM et des PNET.

8.3 Validité analytique

La validation de l'analyse a été effectuée à l'aide de 23 échantillons dont 3 présentaient une mutation connue. Le processus de développement a suivi celui recommandé par des organisations professionnelles internationales comme le Canadian College of Medical Geneticists (CCMG). Le laboratoire se soumet aux épreuves de séquençage Sanger du College of American Pathologists (CAP). Des témoins positifs et négatifs dont le génotype est connu sont inclus dans l'analyse. Le séquençage est effectué de façon bidirectionnelle.

8.4 Position ou orientations d'autres organismes

L'International Society of Neuropathology (ISN) reconnaît la mutation K27M comme marqueur diagnostique spécifique des ADHG pédiatriques.

Le College of American Pathologists recommande l'intégration des données moléculaires dans le diagnostic clinique de divers types de tumeurs solides comprenant les néoplasies du SNC.

9 RECOMMANDATION DE L'INESSS

Recherche des mutations K27M et G34R/V dans les histones des tumeurs cérébrales pédiatriques comme marqueurs diagnostiques des astrocytomes diffus de haut grade

La recommandation de l'INESSS

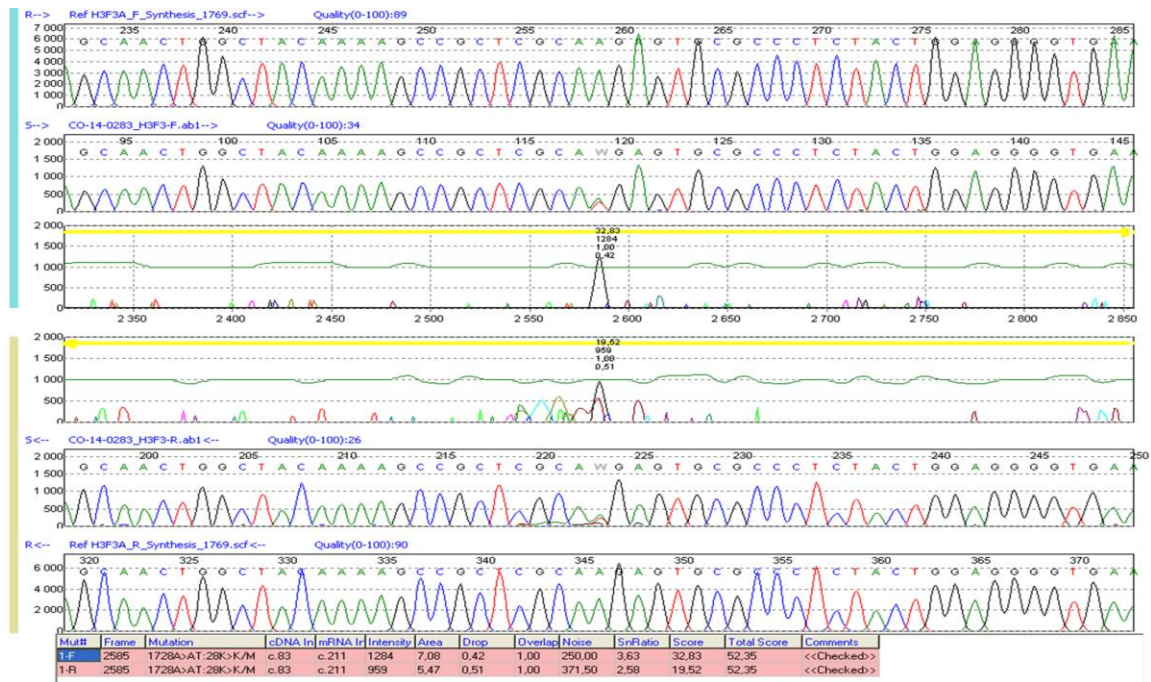
- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Maintien de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Retrait de l'analyse du *Répertoire*

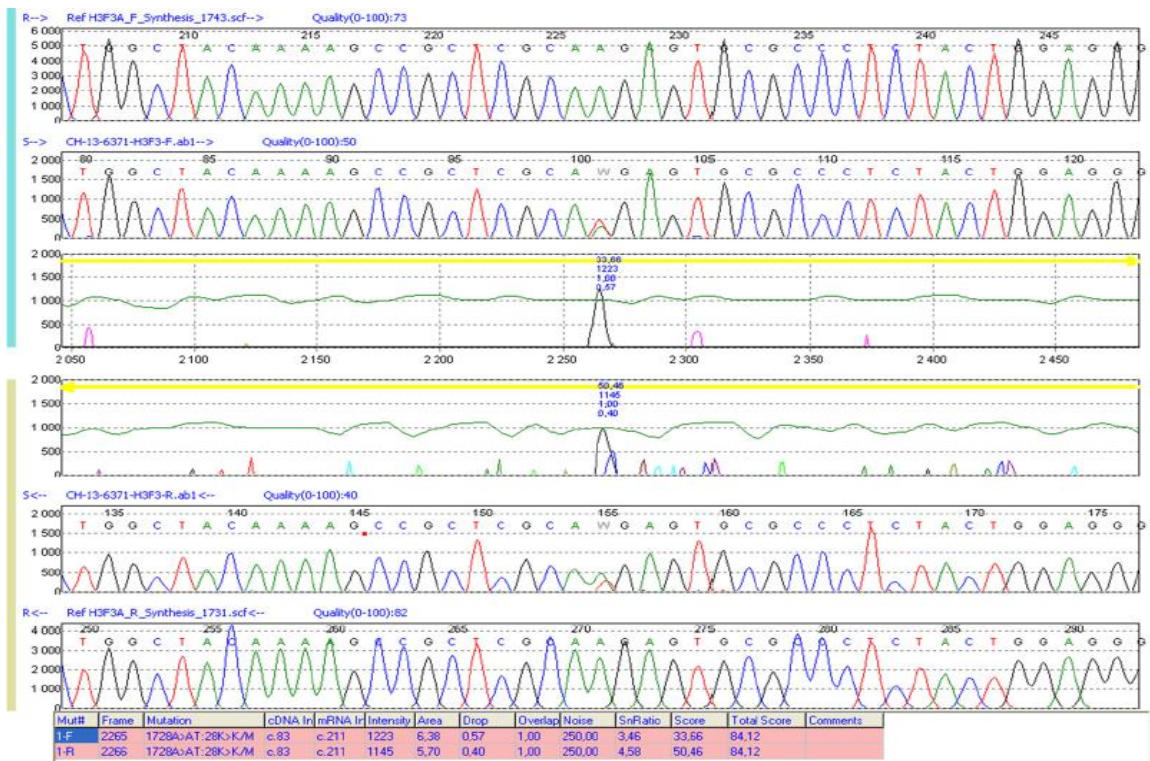
Précisions accompagnant la recommandation

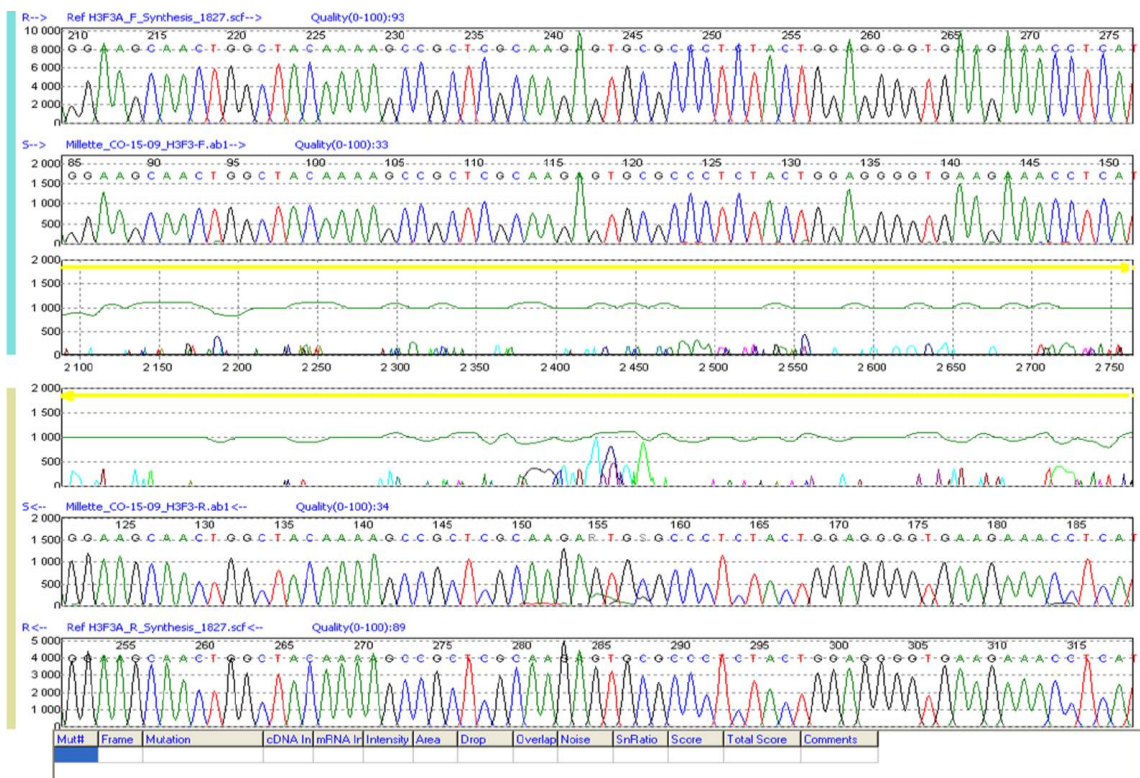
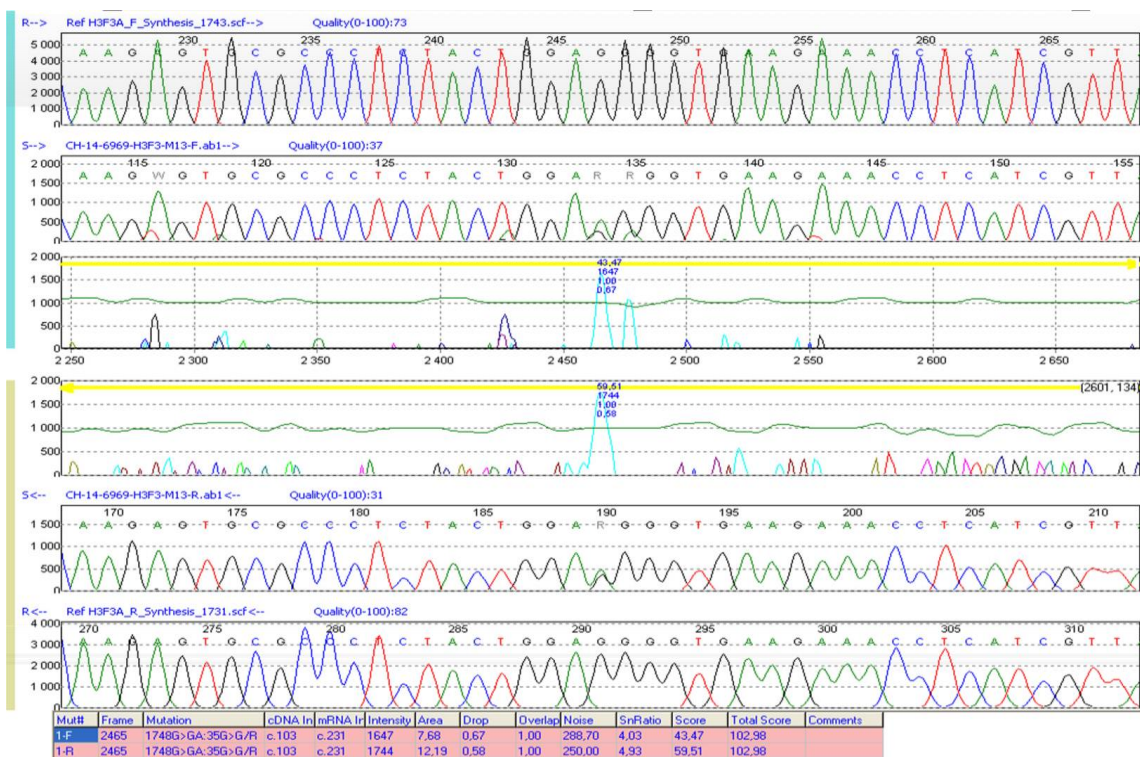
- ✓ La rareté de la maladie explique le faible nombre d'échantillons disponibles pour effectuer une validation.
- ✓ Toutefois, si l'analyse n'est pas disponible, cela pourrait entraîner des répercussions négatives pour les patients atteints d'un astrocytome diffus de haut grade ou d'une tumeur cérébrale d'histologie similaire.

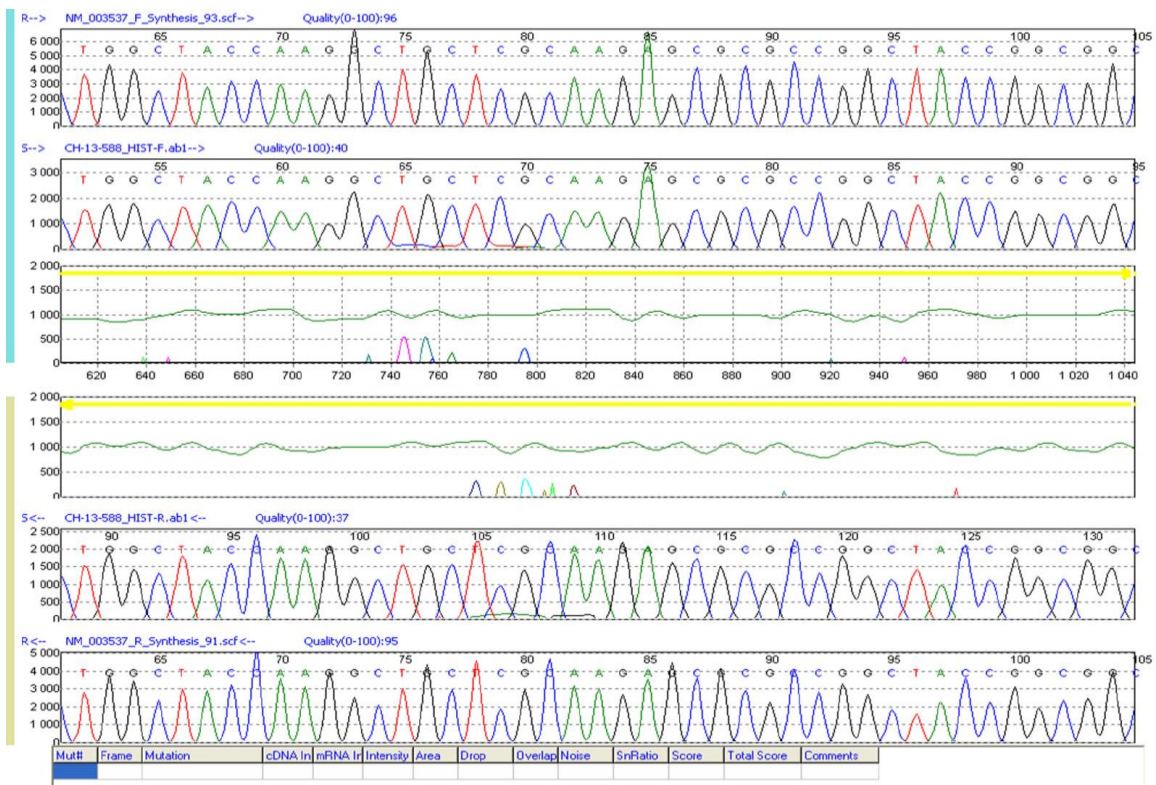
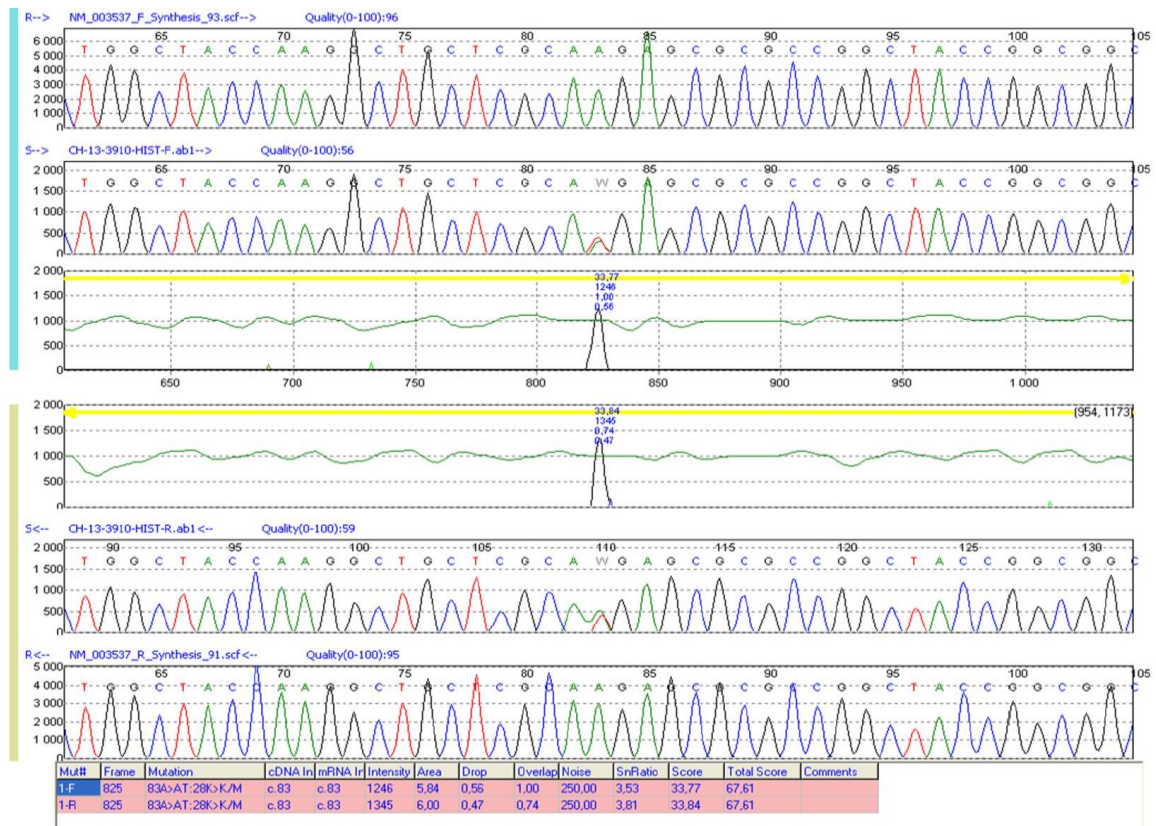
ANNEXE A

Séquences anonymisées des amplicons des gènes *H3F3A* (histone H3.3) et *HIST1H3B* (histone H3.1) contenant les mutations K27M et G34R/V









RÉFÉRENCES

- Adamski J, Tabori U, Bouffet E. Advances in the management of paediatric high-grade glioma. *Curr Oncol Rep* 2014;16(12):414.
- Appin CL et Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J* 2014;20(1):66-72.
- Frazier JL, Lee J, Thomale UW, Noggle JC, Cohen KJ, Jallo GI. Treatment of diffuse intrinsic brainstem gliomas: Failed approaches and future strategies. *J Neurosurg Pediatr* 2009;3(4):259-69.
- Gessi M, Gielen GH, Hammes J, Dorner E, Muhlen AZ, Waha A, Pietsch T. H3.3 G34R mutations in pediatric primitive neuroectodermal tumors of central nervous system (CNS-PNET) and pediatric glioblastomas: possible diagnostic and therapeutic implications? *J Neurooncol* 2013;112(1):67-72.
- Gielen GH, Gessi M, Hammes J, Kramm CM, Waha A, Pietsch T. H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: A marker for diffuse high-grade astrocytomas. *Am J Clin Pathol* 2013;139(3):345-9.
- Green AL et Kieran MW. Pediatric brainstem gliomas: New understanding leads to potential new treatments for two very different tumors. *Curr Oncol Rep* 2015;17(3):436.
- Greenberg MS. Astrocytoma. Dans : *Handbook of neurosurgery: Volume One*. 4^e éd. Lakeland, FL : Greenberg Graphics Inc.; 1997 : 244-56.
- Ichimura K, Nishikawa R, Matsutani M. Molecular markers in pediatric neuro-oncology. *Neuro Oncol* 2012;14(Suppl 4):iv90-9.
- Karajannis M, Allen JC, Newcomb EW. Treatment of pediatric brain tumors. *J Cell Physiol* 2008;217(3):584-9.
- Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012;124(3):439-47.
- Korshunov A, Capper D, Reuss D, Schrimpf D, Ryzhova M, Hovestadt V, et al. Histologically distinct neuroepithelial tumors with histone 3 G34 mutation are molecularly similar and comprise a single nosologic entity. *Acta Neuropathol* 2016;131(1):137-46.
- Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, Bender S, Sturm D, Capper D, et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol* 2015;129(5):669-78.

- Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al. International Society of Neuropathology—Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2014;24(5):429-35.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2):97-109.
- Massimino M, Spreafico F, Biassoni V, Simonetti F, Riva D, Trecate G, et al. Diffuse pontine gliomas in children: Changing strategies, changing results? A mono-institutional 20-year experience. *J Neurooncol* 2008;87(3):355-61.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013;15(Suppl 2):ii1-56.
- Pfister S, Hartmann C, Korshunov A. Histology and molecular pathology of pediatric brain tumors. *J Child Neurol* 2009;24(11):1375-86.
- Saratsis AM, Kambhampati M, Snyder K, Yadavilli S, Devaney JM, Harmon B, et al. Comparative multidimensional molecular analyses of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma reveals distinct molecular subtypes. *Acta Neuropathol* 2014;127(6):881-95.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012;482(7384):226-31.
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012;22(4):425-37.
- Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, Martinez D, Huse JT, Heguy A, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol* 2013;23(5):558-64.
- Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* 2014;5:64.
- Wolff JE, Rytting M, Vats T, Ater J, Mahajan A, Woo S, et al. Induction treatment for diffuse intrinsic pontine glioma, experience of M.D. Anderson Cancer Center. *Anticancer Res* 2011;31(6):2265-9.
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012;44(3):251-3.