

Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG

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

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

ANALYSE DES TRANSLOCATIONS DES SARCOMES DES TISSUS MOUS ET OSSEUX PAR SNG (RÉFÉRENCE – 2018.01.001)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal, Hôpital Maisonneuve – Rosemont

Mise en garde

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

Conflits d'intérêts

Le D^r Lambert Busque n'a pas participé aux délibérations et s'est retiré au moment de formuler la recommandation. Le D^r Sébastien Labonté, responsable du secteur de pathologie moléculaire à l'Hôtel-Dieu de Québec, a déclaré travailler sur la migration des tests moléculaires des sarcomes vers le SNG.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation de même que l'exactitude du contenu en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, les experts consultés sont :

- D^r Michel Pavic, hématologue – oncologue au CIUSSS de l'Estrie;
- D^r Sébastien Labonté, anatomopathologiste au CHU de Québec – Université Laval;
- D^r Vincent Castonguay, hématologue – oncologue, CHU de Québec – Université Laval.

2. RÉSUMÉ

	Analyse
Demandeur	CIUSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal, Hôpital Maisonneuve-Rosemont.
Nom et objectif de l'analyse	L'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux sert à confirmer le diagnostic (ou à exclure un diagnostic différentiel), préalablement élaboré à partir des analyses morphologiques, histologiques et immunohistochimiques. Le demandeur propose d'utiliser une technique de SNG avec un enrichissement de gènes ciblés (trousse TruSight ^{MC} RNA Fusion Panel, Illumina ^{MC}).
Situation actuelle	<ul style="list-style-type: none"> • Les spécimens de sarcomes sont évalués par un pathologiste qui élabore un diagnostic basé sur la morphologie, l'histologie et les analyses en immunohistochimie. • Dans les cas où le diagnostic inclut un sarcome porteur de translocation (~ 33 %), la détection des gènes de fusions oncogéniques se fait principalement par RT-PCR. • Le demandeur propose le remplacement de l'analyse RT-PCR par l'analyse de SNG pour la clientèle desservie par son établissement.
Nombre d'analyses prévues	Le demandeur estime un nombre annuel d'analyses se situant entre 150 et 200.
Valeur diagnostique	L'ensemble des études retenues montrent que les analyses moléculaires sont utiles pour certaines tumeurs dont le phénotype est moins spécifique et qui peuvent soulever plusieurs diagnostics différentiels.
Valeur pronostique/thérapeutique	Aucune étude montrant une influence significative de la présence d'une translocation sur le pronostic des patients n'a été repérée. Les valeurs pronostiques et thérapeutiques de l'analyse proposée sont principalement associées à sa valeur diagnostique puisqu'un manque de précision diagnostique ou une modification du diagnostic à la suite des résultats des analyses moléculaires peut avoir un effet sur le pronostic et les décisions de traitement.
Impact budgétaire	L'impact net annuel d'un premier scénario dans lequel l'analyse par SNG remplacerait les analyses effectuées par RT-PCR pour la clientèle desservie par le centre demandeur et les cas difficilement classifiables suivant la RT-PCR pour l'ensemble du Québec est estimé à 93 665 \$. Un impact net annuel de 219 603 \$ est estimé si l'analyse par SNG est utilisée en remplacement de toutes les analyses par RT-PCR pour l'ensemble du Québec.
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	Plusieurs sociétés savantes (dont le NCCN et l'ESMO) reconnaissent l'utilité des analyses moléculaires en tant que techniques complémentaires pour conforter le diagnostic morphologique pour les sarcomes, surtout lorsque le diagnostic histologique spécifique est douteux, que la présentation clinique est atypique ou lorsque les résultats des analyses moléculaires peuvent procurer une valeur pronostique et/ou prédictive.
Enjeux particuliers	Selon le NCCN et l'ESMO, les résultats des analyses devraient toujours être interprétés selon le contexte clinique et les caractéristiques pathologiques du patient. Les analyses moléculaires peuvent influencer la stratégie de traitement, notamment en apportant une modification du diagnostic.

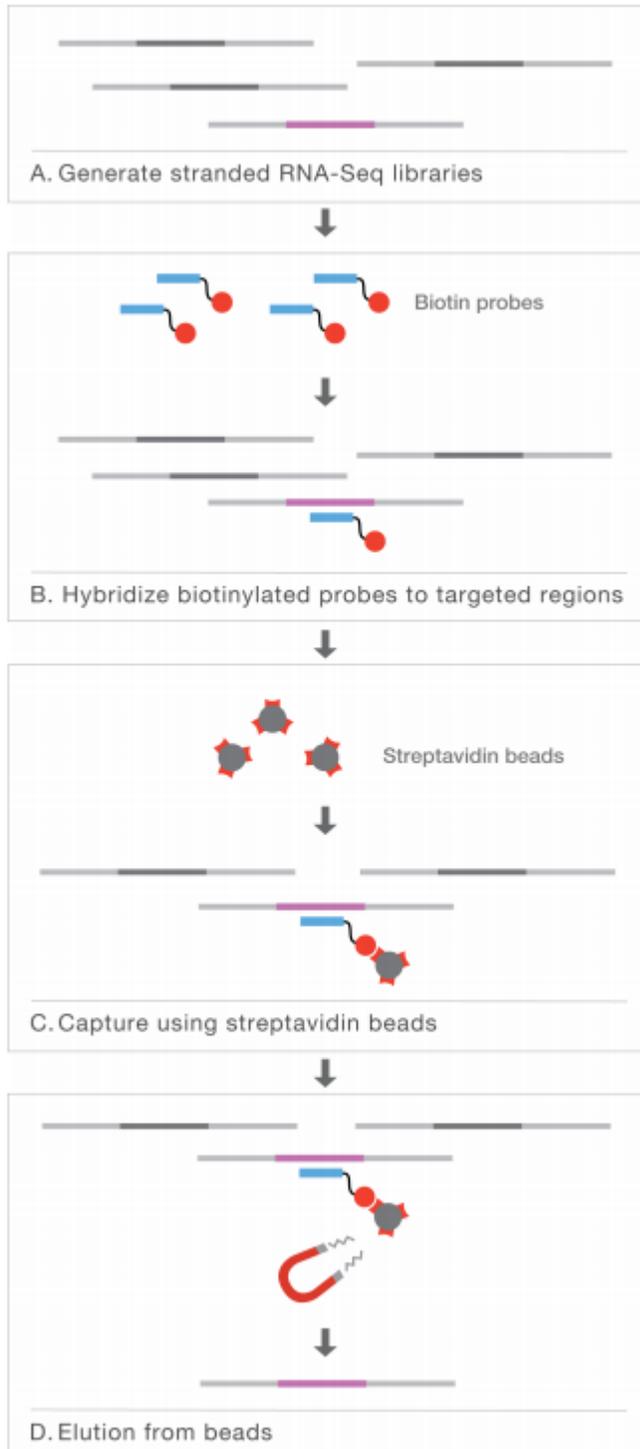
3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

L'analyse des translocations diagnostiques des sarcomes des tissus mous et osseux par la détection des gènes de fusion des sarcomes sert à confirmer le diagnostic (ou à exclure un diagnostic différentiel), préalablement élaboré à partir des analyses histologiques et immunohistochimiques, d'un sarcome des tissus mous ou osseux par une méthode de séquençage de nouvelle génération (SNG) avec un enrichissement des gènes ciblés.

3.2. Description de la méthode

L'analyse des translocations associées aux sarcomes proposée par le demandeur est effectuée à l'aide de la trousse commerciale TruSight^{MC} RNA Fusion Panel de la compagnie Illumina^{MC}. La méthode est basée sur une approche de PCR multiplex sur des bibliothèques d'ADN réalisées à partir de l'ARN provenant d'échantillons de tumeurs fixées au formaldéhyde et enrobées de paraffine (FFPE) ou à partir de tissus (frais ou congelés) (figure 1). Les fragments d'ARN sont convertis en ADN double brin auquel des adaptateurs indexés sont liés à chacune des extrémités. La bibliothèque est amplifiée par PCR et les séquences cibles hybridées à l'aide de sondes spécifiques marquées à la biotine. Deux cycles d'amplification et d'hybridation sont effectués, ce qui permet une meilleure spécificité de l'hybridation. L'ADN complémentaire cible est ensuite capturé par des billes liées à la streptavidine, qui se lient aux sondes biotinées. Cette technique permet d'obtenir une bibliothèque d'ADN enrichie pour les gènes de fusion impliquant les gènes sélectionnés. La bibliothèque ainsi obtenue est alors séquencée et analysée pour la présence de gènes de fusion à l'aide de logiciels. La trousse comporte un panel de 507 fusions de gènes associées à différents cancers.



Source : Feuille de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel (Illumina) disponible à : <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf> (consulté le 16 juillet 2018).

Figure 1 Capture de gènes ciblés par la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Les spécimens, des blocs de tissus frais ou paraffinés provenant de biopsies ou d'excisions chirurgicales, seront envoyés dans un premier temps au laboratoire de pathologie de l'installation Maisonneuve-Rosemont. Après l'identification de tissu tumoral adéquat, les coupes du bloc seront acheminées au laboratoire de diagnostic moléculaire pour les analyses moléculaires et bio-informatiques.

L'algorithme de traitement des échantillons cliniques proposé par le demandeur est présenté à l'annexe A.

3.4. Société ou concepteur

Le demandeur propose d'utiliser la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel de la compagnie Illumina^{MC}.

Il existe deux trousse commerciales non homologuées ciblant spécifiquement les translocations associées à des sarcomes des tissus mous et osseux. Chacune de ces trousse ne cible que 26 gènes (différents gènes sont ciblés selon la trousse utilisée) :

- Archer FusionPlex^{MC} Sarcoma Panel (ArcherDX)
- Sarcoma Comprehensive Panel^{MC} (Fulgent)

3.5. Homologation

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

3.6. Valeur pondérée : 852,65

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Les patients qui ont reçu un diagnostic de sarcome, posé à la suite à d'une étude histologique conventionnelle, dont le sous-type est connu pour être associé à une translocation spécifique, afin de confirmer le diagnostic ou d'exclure un diagnostic différentiel.

4.2. Description de la maladie visée

Les sarcomes représentent un groupe hétérogène de tumeurs d'origine mésenchymale de différentes étiologies, formé de plus de 100 sous-types histologiques [Groisberg *et al.*, 2017]. Les sarcomes des tissus mous se forment dans les muscles, les articulations, le tissu adipeux, les nerfs, les tissus profonds de la peau et les vaisseaux sanguins [Burningham *et al.*, 2012]. Les tumeurs malignes osseuses, telles que les ostéosarcomes et le sarcome d'Ewing, se forment dans les os et le cartilage [Burningham *et al.*, 2012]. En 2013¹, 1 255 Canadiens ont reçu un diagnostic de sarcome des tissus mous et 765 décès associés à ces cancers sont survenus. Les sarcomes des tissus mous représentent le cinquième groupe de

¹ Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques sur le sarcome des tissus mous [site Web], <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/soft-tissue-sarcoma/statistics/?region=qc> (consulté le 13 juillet 2018).

cancers le plus souvent diagnostiqué chez les enfants, avec une incidence de 6 % au Canada² [Ellison et Janz, 2015].

Les sarcomes peuvent être classés en deux catégories : les sarcomes à caryotype complexe et ceux à caryotype simple. Les sarcomes à caryotype complexe présentent des anomalies génétiques multiples (par exemple de multiples translocations chromosomiques, des mutations, des amplifications et des délétions) et sont souvent aneuploïdes, contrairement aux sarcomes à caryotype simple qui comportent une ou quelques anomalies chromosomiques pathogéniques caractéristiques (telles que des mutations, des amplifications géniques ou des translocations de gènes) [Van de Rijn *et al.*, 2014; Lahat *et al.*, 2008]. Le premier groupe montre souvent un phénotype histologique hautement agressif observé, entre autres, dans les sarcomes pléomorphes indifférenciés, les liposarcomes pléomorphes et les léiomyosarcomes [Van de Rijn *et al.*, 2014]. Grâce aux avancements technologiques en cytogénétique, un nombre important de translocations chromosomiques caractéristiques de sarcomes ont été décelées [Xiao *et al.*, 2018]. Les sarcomes associés aux translocations constituent un sous-type classique avec une nosologie distincte [Dufresne *et al.*, 2018]. Les principaux gènes de fusion résultant des translocations associées aux sarcomes sont présentés en détail à l'annexe B.

Malgré leurs caractéristiques biologiques et histologiques variées, le traitement des sarcomes non métastatiques demeure similaire et consiste généralement en une combinaison de chirurgie et de radiothérapie quelquefois accompagnées d'une chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante³ [Grisberg *et al.*, 2017]. Néanmoins, malgré un traitement local ou régional adéquat, jusqu'à 40 % des patients développeront des métastases. Le principal traitement des tumeurs avancées est la chimiothérapie [Lucchesi *et al.*, 2018]. La survie globale médiane des patients présentant un sarcome des tissus mous métastatique est de 14 mois. Elle a augmenté de 50 % dans les 20 dernières années [Italiano *et al.*, 2011]. La survie relative après 5 ans, pour l'ensemble des sarcomes des tissus mous, est de 65 % au Canada⁴.

² Entre les années 2006 et 2010.

³ L'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le rhabdomyosarcome sont des tumeurs qui nécessitent presque toujours un traitement de chimiothérapie adjoint au traitement local de la tumeur (communication de Dr Castonguay, hématologue-oncologue, CHU de Québec, 12 septembre 2018).

⁴ Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques de survie pour le sarcome des tissus mous [site Web], disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/soft-tissue-sarcoma/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=qc> (consulté le 13 juillet 2018).

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur estime que le nombre d'analyses prévues se situe entre 150 et 200 par année au Québec.

4.4. Situation actuelle

En présence d'un cas présumé de sarcome des tissus mous ou osseux, un échantillon de tissu, provenant d'une biopsie ou d'une résection chirurgicale, est envoyé au pathologiste qui procède à l'examen morphologique du bloc et à une coloration à l'hématoxyline éosine d'une coupe. Le pathologiste évalue le contenu en cellules tumorales et choisit une section à analyser par immunohistochimie⁵.

Dans le cas où le sarcome du diagnostic initial primaire ou différentiel (basé sur l'examen histologique et les analyses immunohistochimiques) est connu comme étant porteur d'une translocation spécifique, une analyse pour la détection de la translocation soupçonnée est demandée pour confirmer le diagnostic ou écarter un diagnostic différentiel. Présentement, la détection des translocations se fait par RT-PCR (de l'anglais *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) et couvre les principales translocations de 10 sous-types de sarcomes (voir la section 4.5). La recherche de certaines translocations avec des sites de cassures multiples (ex. *EWSR1-FL1*) se fait par RT-PCR multiplex, de manière à capter tous les sites de coupures. Cette approche permet d'ailleurs de couvrir environ 90 % des translocations du sarcome d'Ewing⁶. Environ 90 % à 95 % des cas de sarcomes porteurs de translocations sont présentement couverts en situation clinique.

⁵ Information fournie par Dr Sébastien Labonté, anatomo-pathologiste, CHU de Québec – Université Laval.

⁶ Information fournie par Madame Chantal Courtemanche, responsable de l'Unité d'interface (CHU de Québec, Centre de recherche clinique et évaluative en oncologie, CRCEO).

Tableau 1 Incidence de différents sous-types de sarcomes des tissus mous et osseux

SOUS-TYPE DE SARCOME	INCIDENCE RAPPORTÉE (par 100 000)	NOMBRE DE CAS ANNUELS ESTIMÉS AU QUÉBEC*
SOUS-TYPES DE SARCOMES ACTUELLEMENT COUVERTS AU QUÉBEC†		
Sarcome alvéolaire des parties molles	0,01	1
Sarcome à cellules claires	0,01	1
Sarcome fibromyxoïde de bas grade / Fibrosarcome épithélioïde sclérosant	0,09	7
Sarcome d'Ewing	0,08	7
Rhabdomyosarcome alvéolaire	0,05	4
Sarcome synovial	0,13	11
Liposarcome myxoïde	0,09	11
Dermatofibrosarcome‡	0,36	30
SOUS-TYPES DE SARCOMES ACTUELLEMENT NON COUVERTS AU QUÉBEC		
Hémangioendothéliome épithélioïde	0,01	1
Sarcome stromal endométrial	0,12	10
Tumeur fibreuse solitaire§	0,04	3
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	0,01	1
PEComa	0,01	1

Adapté de Mastrangelo *et al.*, 2012 et Ducimetière *et al.*, 2011.

* Estimation du demandeur

† Le fibrosarcome congénital de même que le chondrosarcome myxoïde sont également couverts au Québec. Le demandeur estime à un par année le nombre de cas de ces tumeurs au Québec.

‡ Le dermatofibrosarcome est une tumeur qui ne nécessite pas de confirmation moléculaire dans la majorité des cas. Les analyses moléculaires peuvent être utiles dans certains cas ambigus (communication avec Dr Sébastien Labonté, anatomo-pathologiste, CHU de Québec, 12 septembre 2018).

§ La tumeur fibreuse solitaire est une tumeur qui ne nécessite pas d'analyse moléculaire dans la majorité des cas. L'analyse de STAT6 en immunohistochimie permet de détecter la fusion NAB2-STAT6 avec une bonne fiabilité (communication avec Dr Sébastien Labonté, 12 septembre 2018).

4.5. Données médico administratives

La détection de translocations associées aux sarcomes des tissus mous et osseux par SNG n'est pas inscrite dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*.

Le tableau 2 présente les données de volumétrie concernant les analyses de translocations pour différents sous-types de sarcomes présentement offertes par RT-PCR.

Tableau 2 Volumétrie des analyses en lien avec la recherche de translocations dans les sarcomes des tissus mous et osseux pour les années 2015-2016, 2016-2017 et 2017-2018

ANALYSE	2015 - 2016		2016 - 2017		2017 - 2018	
	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)
60155 / 65014 Chondrosarcome myxoïde (EWSR1-TEC de la t(9;22), TAF2N-TEC de la t(9;17) (TAAN sur tissus)	5	1 400	4	1 120	5	1 400
60156 / 65030 Dermato-fibrosarcome (COL1A1-PDGFB de la t(17;22) (TAAN sur tissus)	13	3 172	12	2 928	15	3 660
21102 / 65040 Fibrosarcome congénital t(12;15) (TAAN)	0	0	0	0	1	155
60173 / 65130 Liposarcome myxoïde (FUS-CHOP de la t(12;16), EWSR1-CHOP de la t(12;22)) (TAAN) sur tissus	9	2 520	8	2 240	4	1 120
21095 / 65162 Rhabdomyosarcome alvéolaire t(1;13) t(2;13) (TAAN)	10	1 850	9	1 665	9	1 665
60183 / 65164 Sarcome à cellules claires ou histiocytome fibreux angiomatoïde (FUS-ATF1 de la t(12;16), EWSR1-CREB1 de la t(12;22), EWSR1-CREB1 de la t(2;22)) (TAAN)	9	2 880	20	6 400	27	8 640
60184 / 65166 Sarcome alvéolaire des tissus mous (ASPL-TFE3 de la t(X;17) (TAAN)	1	244	1	244	0	0
21096 / 65168 Sarcome Ewing EWS/FL1 t(11;22) et EWS/ERG t(21;22)	28	5 096	24	4 368	31	5 642
60185 / 65170 Sarcome fibromyxoïde de bas grade (FUS-CREB3L2 de la t(7;16), FUS-CREB3L1 de la t(11;16)) (TAAN)	18	5 400	6	1 800	9	2 700
21101 / 65172 Sarcome synovial t(x;18)	43	7 955	41	7 585	43	7 955
TOTAL	136	30 517	125	28 350	135	32 937

Source : Données du ministère de la Santé et des Services sociaux.

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

Selon le demandeur, cette nouvelle analyse a le potentiel d'améliorer l'investigation moléculaire des sarcomes, en permettant des diagnostics plus précis, plus rapides et pour un plus grand nombre de cas. Cela pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de ces cancers complexes et potentiellement guérissables.

Le diagnostic des sarcomes associés à des translocations se fait par une analyse histologique qui peut être complétée d'analyses immunohistochimiques, de FISH (de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*) et de RT-PCR. Les avantages de la technique de SNG proposée sont :

- de permettre un traitement adapté à la pathologie du patient;
- la possibilité d'identifier les gènes de fusion à une résolution nucléotidique;
- de détecter dans une seule analyse la présence d'une multitude de translocations différentes, variables et rares;
- la méthode peut avoir un meilleur rapport coût-efficacité que le FISH, par exemple, qui nécessite des sondes spécifiques pour chaque partenaire de fusion qui peuvent être rares dans certains cas;
- de permettre de réduire les délais en comparaison de l'approche de FISH qui est quelques fois complétée, de manière séquentielle, par la RT-PCR pour l'identification du gène partenaire (implique des fusions choisies, testées et validées);
- de permettre de simplifier la gestion des échantillons entre les laboratoires impliqués;
- de permettre de remplir un besoin clinique qui n'est pas couvert actuellement (l'analyse par RT-PCR n'est pas offerte pour plusieurs translocations diagnostiques moins communes);
- de permettre une meilleure précision diagnostique puisque l'essai peut détecter les fusions même lorsque la séquence de fusion varie, alors que la RT-PCR est très sensible à la séquence de liaison des amorces.

4.7. Assurance qualité

De nombreux points de contrôles, à diverses étapes de l'analyse, ont été instaurés par le demandeur pour cette technique :

Qualité de l'ARN : La qualité de l'ARN isolé des échantillons sera évaluée à l'aide d'une puce (Bioanalyzer RNA nano^{MC}, Agilent) pour quantifier l'ARN total en fonction de sa taille et en déterminer sa qualité (facteur DV₂₀₀).

Qualité de la librairie : Des biopuces (Bioanalyzer DNA^{MC} 1 000) seront utilisées afin de quantifier et d'évaluer la taille des fragments d'ADN de la librairie. La taille de la majorité des fragments doit se situer autour de 250 à 300 nucléotides avant l'étape de l'hybridation des sondes. Une reprise de la librairie est prévue si la concentration d'ADN est inférieure à 20 ng/μl pour les fragments d'une taille de 160 à 170 nucléotides. Une deuxième évaluation de la qualité de la librairie est prévue lorsque la librairie finale est générée. Advenant une concentration d'ADN de la librairie inférieure à 20 ng/μl pour les fragments entre 200 et 1 000 nucléotides, une nouvelle librairie sera générée pour cet échantillon.

Qualité des séquences obtenues : Les séquences obtenues devront démontrer un Q-score ≥ 30 (signifiant que la probabilité d'une base incorrecte est inférieure à 1/1 000).

Qualité des résultats obtenus : Des données de validation locales ont montré qu'un nombre de lectures de 2 millions par le logiciel *Local Run Manager (RNA Fusion Module, Illumina^{MC})* est suffisant pour obtenir un résultat fiable. Cependant, tous les résultats positifs pour une fusion seront considérés si le nombre de lectures est de 1,5 million ou plus puisque les fusions seront validées par une technique moléculaire alternative. De plus, un deuxième logiciel de détection des fusions (JAFFA) sera utilisé. La qualité des résultats sera vérifiée par l'analyse de 15 gènes *pseudo-housekeeping*⁷ couverts par le panel de gènes TruSight^{MC} RNA Fusion. Les résultats seront confirmés par une analyse manuelle des séquences de fusion avec le logiciel d'alignement BLAST. La pertinence des séquences de fusion détectées sera vérifiée dans différentes bases de données de fusions associées aux différents types de sarcomes.

Contrôle de qualité par une méthode alternative : Pendant une période d'un an, qui correspond à la période de validation prévue, le laboratoire demandeur procédera à une confirmation des fusions détectées par RT-PCR. Dans un souci de protection du patient et dans un contexte où la limite de détection est difficilement évaluable, le demandeur s'engage, sur l'ensemble de la période de validation et de mise en place de la technique, à transférer les échantillons, pour lesquels aucune fusion n'aura été détectée, vers les laboratoires externes, comme c'est le cas actuellement.

Contrôle de qualité externe : Un contrôle de qualité externe pour l'étude des translocations génétiques dans les cas de sarcomes est possible via le service *United Kingdom National External Quality Assessment Services (UK NEQAS)* nommé : *Sarcoma testing by RT-PCR and FISH*.

De plus, le demandeur propose de participer à l'échange d'échantillons anonymisés annuellement avec le centre canadien spécialisé en sarcomes *Sarcoma Unit (Mont Sinai Hospital, Toronto)*.

5. DONNÉES PUBLIÉES

Dans le cadre de cette évaluation, 12 études comportant des données liées à la détection de translocations associées aux sarcomes des tissus mous et osseux et à leur influence sur le diagnostic, le pronostic ou la prise en charge, ont été retenues [Cote *et al.*, 2018; Lucchesi *et al.*, 2018; Watson *et al.*, 2018; Hartrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2016; Italiano *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015; Neuville *et al.*, 2013]. Les caractéristiques de ces études sont présentées à l'annexe D.

5.1. Corrections et précisions diagnostiques résultant de la recherche de translocations dans les sarcomes des tissus mous et osseux

Deux études prospectives retenues [Italiano *et al.*, 2016; Neuville *et al.*, 2013] avaient pour objectif, entre autres, d'évaluer l'impact diagnostique des analyses moléculaires des sarcomes. L'étude d'Italiano et ses collaborateurs [2016] comptait

⁷ Ces gènes ont été sélectionnés pour leur niveau stable d'expression élevée, peu importe le type de sarcome.

384 patients ayant reçu un diagnostic de sarcome des tissus mous ou osseux, alors que l'étude de Neuville et ses collaborateurs [2013] comptait 1 484 tumeurs de tissus mous et viscéraux primaires, dont 286 cas présumés de translocations. Pour ces deux études, le diagnostic primaire des tumeurs posé par un pathologiste spécialisé en sarcomes, basé sur le contexte clinique et l'examen histologique, et stratifié selon le niveau de confiance du diagnostic (certain, probable ou possible), a été révisé suite à l'obtention des résultats des analyses moléculaires.

Pour l'étude d'Italiano [2016], une modification du diagnostic, suite aux analyses moléculaires, a été apportée à 53 de 384 patients (13,8 %). Quarante-neuf de ces 53 patients avaient un diagnostic de sarcome associé à des translocations. Les résultats de confirmation du diagnostic prémoléculaire stratifié selon le niveau de confiance sont présentés dans le tableau 3. Le diagnostic moléculaire a confirmé 94 % des diagnostics jugés certains et 71 % des diagnostics probables. Dans le cas de l'étude de Neuville [2013], les analyses moléculaires de sarcomes soupçonnés de translocations ont permis de confirmer un diagnostic jugé certain ou probable dans 86 % et 83 % des cas, respectivement. Toutefois, le diagnostic initial posé avec un faible niveau de confiance (possible) a été écarté dans 77 % des cas (tableau 3).

Les révisions diagnostiques de l'étude d'Italiano [2016] ont influencé le plan de traitement de 41 patients sur 49 (83,6 %) et le pronostic de 38 patients sur 49 (77,5 %). En somme, les données d'Italiano [2016] et de Neuville [2013] montrent que le diagnostic basé uniquement sur la morphologie peut être trompeur dans environ 20 % des cas de sarcomes. De plus, la révision du diagnostic peut entraîner des conséquences sur le pronostic et la prise en charge des patients [Italiano *et al.*, 2016].

Tableau 3 Capacité des analyses moléculaires à confirmer le diagnostic initial stratifié selon le niveau de confiance, pour les translocations associées aux sarcomes

NIVEAU DE CONFIANCE DU DIAGNOSTIC	RÉSULTATS DES ANALYSES MOLÉCULAIRES				
	Italiano <i>et al.</i> , 2016		Neuville <i>et al.</i> , 2013		
	POSITIFS	NÉGATIFS	POSITIFS	NÉGATIFS	NON INTERPRÉTABLES
CERTAIN	157/166 (94 %)	9/166 (5 %)	72/84 (86 %)	3/84 (3 %)	9/84 (11 %)
PROBABLE	91/129 (71 %)	38/129 (29 %)	62/75 (83 %)	12/75 (16 %)	1/75 (1 %)
POSSIBLE	20/89 (22 %)	69/89 (78 %)	19/89 (21 %)	68/89 (77 %)	2/89 (2 %)

Plusieurs exemples de diagnostics révisés, suite à la détection de translocations par des analyses moléculaires dans les sarcomes, ont été repérés dans la littérature et sont présentés dans le tableau 4. Les études retenues ont utilisé des approches de SNG, à l'exception de l'étude d'Italiano et ses collaborateurs [2016], laquelle a plutôt eu recours à la RT-PCR et au FISH.

Tableau 4 Révisions diagnostiques résultant de la recherche de translocations de sarcomes

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
Italiano <i>et al.</i> , 2016 [†] (384)	Lésion réactionnelle (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2) Histiocytofibrome bénin (3)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Sarcome de bas grade non classé (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2) Tumeur solitaire fibreuse (3)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Périneuriome (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Tumeur de la famille des sarcomes d'Ewing (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome à cellules rondes
	Dermatofibrosarcome protuberans (1) Tumeur solitaire fibreuse (2)	Tumeur solitaire fibreuse
	Fibrosarcome (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Tumeur stromale génitale bénigne (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Sarcome synovial (1) Sarcome à petites cellules non classé (2)	Sarcome non classé
	Liposarcome à cellules myxoïdes/rondes (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome à cellules fusiformes non classé
	Léiomyosarcome (1) Liposarcome indifférencié (2)	Liposarcome indifférencié
	Myxofibrosarcome de bas grade (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Sarcome à cellules fusiformes/myxoïdes (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2) Chondrosarcome myxoïde (3)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Léiomyosarcome pléomorphe (1) Liposarcome indifférencié (2)	Liposarcome indifférencié
	Léiomyosarcome (1) Liposarcome indifférencié (2)	Liposarcome indifférencié
	Rhabdomyosarcome alvéolaire (1) Rhabdomyosarcome embryonnaire (2)	Rhabdomyosarcome embryonnaire
	Sarcome non classé (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome synovial
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome indifférencié à petites cellules rondes
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Chondrosarcome (2) Sarcome synovial (3) Sarcome indifférencié (4)	Sarcome indifférencié
	Rhabdomyosarcome embryonnaire (1) Rhabdomyosarcome alvéolaire (2)	Rhabdomyosarcome alvéolaire

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
	Lymphome non hodgkinien (1) Leucémie (2) Rhabdomyosarcome (3)	Rhabdomyosarcome alvéolaire
	Sarcome synovial (1) Carcinosarcome (2)	Carcinosarcome
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2) Lymphome (3)	Tumeur maligne non différenciée
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2) Lymphome (3)	Tumeur maligne non différenciée
	Sarcome synovial (1) Sarcome indifférencié (2)	Tumeur de la gaine des nerfs périphériques
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Tumeur rhabdoïde (2) Tumeur desmoplastique (3)	Sarcome indifférencié à petites cellules rondes
	Sarcome synovial (1) Carcinome sarcomatoïde (2)	Carcinome sarcomatoïde
	Schwannome (1) Tumeur de la gaine des nerfs périphériques (2) Rhabdomyosarcome alvéolaire (3) Rhabdomyosarcome embryonnaire (4)	Rhabdomyosarcome sclérosant
	Sarcome à cellules fusiformes (1) Tumeur de la gaine des nerfs périphériques (2) Sarcome synovial (3)	Tumeur de la gaine des nerfs périphériques
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Carcinome neuroendocrine (2)	Carcinome neuroendocrine indifférencié
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome indifférencié à petites cellules rondes (2)	Sarcome indifférencié à petites cellules rondes
	Sarcome synovial (1) Tumeur solitaire fibreuse (2)	Tumeur solitaire fibreuse
	Sarcome à cellules rondes et fusiformes (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2)	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing
	Blastome pleuro pulmonaire (1) Mésenchymome (2) Rhabdomyosarcome embryonnaire (3)	Tumeur maligne mésenchymateuse avec composante rhabdomyosarcomatique
	Rhabdomyosarcome embryonnaire (1) Rhabdomyosarcome alvéolaire (2)	Rhabdomyosarcome alvéolaire
	Rhabdomyosarcome embryonnaire (1) Rhabdomyosarcome alvéolaire (2)	Rhabdomyosarcome alvéolaire
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2) Sarcome non classé (3)	Sarcome non classé
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2) Sarcome non classé (3)	Tumeur solitaire fibreuse
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2) Sarcome à cellules claires (3)	Sarcome synovial
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome à petites cellules (2)	Tumeur mésenchymateuse maligne à cellules rondes

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
	Sarcome à cellules claires (3)	
	Sarcome synovial	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing	Sarcome à cellules rondes (fusion <i>BCOR-CCNB3</i>)
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Ostéosarcome à petites cellules (2)	Ostéosarcome de haut grade
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2)	Rhabdomyosarcome à cellules fusiformes
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2) Autre sarcome (3)	Méningiome métastatique
	Sarcome synovial (1) Autre sarcome (2)	Tumeur à petites cellules
	Sarcome synovial (1) Sarcome non classé (2)	Sarcome prostatique à cellules fusiformes
	Sarcome synovial (1) Ostéosarcome (2) Sarcome non classé (3)	Tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques
	Liposarcome à cellules myxoïdes/rondes (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2)	Sarcome indifférencié à cellules rondes
	Harris <i>et al.</i> , 2016 (89)	Sarcome d'Ewing
Mélanome malin de stade III		Sarcome cutané à cellules claires (<i>EWSR1-ATF1</i>)
Watson <i>et al.</i> , 2018 (94)	Sarcome à petites cellules rondes non classé	Péricytome (<i>ACTB-GLI1</i>)
	Sarcome à petites cellules rondes non classé	Carcinome de type NUT (<i>BRD3-NUTM1</i>)
	Tumeur solitaire fibreuse	Dermatofibrosarcome protuberans (<i>COL1A1-PDGFB</i>)
	Sarcome fibromyxoïde de bas grade	Myoépithéliome (<i>EWSR1-PBX1</i>)
	Tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques	Sarcome sinonasal (<i>PAX3-MAML3</i>)
Cote <i>et al.</i> , 2018 (133)	Tumeur de glande salivaire	Sarcome d'Ewing (<i>EWSR1-FL1</i>)
	Angiosarcome épithélioïde de haut grade	Hémangioendothéliome épithélioïde (<i>WWTR1-CAMTA</i>)
Chang <i>et al.</i> , 2016 (59)	Sarcome d'Ewing	Tumeur similaire au sarcome d'Ewing (<i>CIC-FOXO4</i>)
	Histiocytome fibreux de haut grade	Sarcome non différencié (absence de fusion)
	Sarcome de cellules claires du rein	Sarcome non différencié (<i>BCOR-CCNB3</i>)
Mody <i>et al.</i> , 2015 (91)	Myofibromatose infantile	Fibrosarcome infantile (<i>LMNA-NTRK1</i>)
	Médulloblastome	Rhabdomyosarcome (<i>PAX3-NCOA2</i>)

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
Oberg <i>et al.</i> , 2016 (101)	Sarcome indifférencié	Fibrosarcome infantile (EML4-NTRK3)

* Dans plusieurs cas, la fusion spécifique n'a pas été précisée dans l'étude d'Italiano et ses collaborateurs [2016].

† Parmi les 53 diagnostics révisés suite à des analyses moléculaires, 49 étaient associés à la recherche de translocations.

L'importance diagnostique clinique liée à la détection des translocations associées aux sarcomes a été mise en évidence par plusieurs études [Cote *et al.*, 2018; Watson *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2016; Italiano *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015; Neuville *et al.*, 2013]. Les résultats de ces travaux montrent que les analyses moléculaires sont utiles pour certaines tumeurs dont le phénotype immunologique est moins spécifique et qui peuvent soulever plusieurs diagnostics différentiels. Elles doivent toutefois être interprétées dans leur contexte clinique et histologique puisque la même translocation peut être présente dans différentes tumeurs [Neuville *et al.*, 2013].

5.2. Utilité de l'identification de transcrits de fusions pour le diagnostic de sarcomes dans les cas de diagnostics pathologiques imprécis

Watson et ses collaborateurs [2018] ont évalué l'efficacité du séquençage du transcriptome à classer les sarcomes atypiques, les sarcomes pour lesquels aucune aberration génétique pathogénique n'a été détectée, ou les cas présumés de sarcomes. Dans ce contexte, un gène de fusion a été détecté dans 55 des 94 échantillons analysés. 26 des 55 échantillons positifs exprimaient un gène de fusion rapporté de manière récurrente dans la littérature ou un transcrite de fusion émergent qui n'était pas inclus dans la procédure standard de RT-PCR utilisée. Cette étude a permis d'identifier des transcrits de fusions associées aux sarcomes pour 26 de 94 échantillons provenant de patients au diagnostic pathologique imprécis.

5.3. Transcrits de fusions comme cibles thérapeutiques potentielles dans les sarcomes des tissus mous et osseux

Bien que l'utilité de la détection de translocations dans les sarcomes soit principalement liée au diagnostic, la recherche documentaire a repéré huit études qui ont procédé au profilage de tumeurs dans le but de déceler des anomalies actionnables (de l'anglais *actionable alteration*)⁸ qui pourraient être utilisées pour guider un traitement personnalisé des patients [Cote *et al.*, 2018; Lucchesi *et al.*, 2018; Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015].

Sept études visaient des patients présentant des tumeurs avancées, métastatiques, récurrentes, réfractaires ou non résécables, pour qui les options de traitement étaient limitées [Cote *et al.*, 2018; Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015]. Seules deux études ne portaient que sur les sarcomes [Cote *et al.*, 2018; Lucchesi *et al.*, 2018]. Quoique peu de translocations actionnables aient été décelées (11 sur un total de

⁸ Une définition des anomalies moléculaires actionnables pour les études est présentée à l'annexe C.

302 sarcomes⁹ pour les huit études), des fusions actionnables pour les sarcomes ont été rapportées dans chacune des études, à l'exception de celle de Cote et ses collaborateurs [2018] (annexe E).

5.4. Valeur pronostique

Le pronostic est étroitement lié au diagnostic des différents sous-types de sarcomes des tissus mous et osseux. Par conséquent, la détection d'une translocation aboutissant à une modification du diagnostic peut influencer le pronostic du patient (section 5.1).

Néanmoins, cinq études, dont une revue systématique avec méta-analyse, portant sur la valeur pronostique de translocations spécifiques à certains sous-types de sarcomes ont été repérées [Bianchi *et al.*, 2017; Stegmaier *et al.*, 2017; Kubo *et al.*, 2015; Le Deley *et al.*, 2010; Van Doorninck *et al.*, 2010]. Toutefois, aucune d'entre elles ne montrait une influence significative de la présence d'une translocation sur le pronostic des patients.

La revue systématique avec méta-analyse retenue a analysé la valeur pronostique des translocations *PAX3-FOXO1* ou *PAX7-FOXO1* dans le rhabdomyosarcome alvéolaire [Kubo *et al.*, 2015]. La méta-analyse comprenait au total 993 patients provenant de 7 études. Parmi ces études, 3 montraient qu'il n'y a pas de différence significative de la survie entre les patients ayant un rhabdomyosarcome alvéolaire avec ou sans fusion. Le rapport des risques instantanés groupé de quatre études indiquait une probabilité de survie réduite des patients présentant une fusion *PAX3-FOXO1* comparativement à celle des patients présentant une fusion *PAX7-FOXO1*, bien que cette différence n'était pas significative ($p = 0,07$).

Bianchi et ses collaborateurs [2017] ont évalué l'influence des caractéristiques histologiques et moléculaires sur le pronostic de la maladie dans une cohorte rétrospective de 196 patients atteints de sarcome synovial des extrémités. Aucune corrélation n'a été observée entre le type de fusion, *SS18-SSX1* ou *SS18-SSX2*, et la survie. De même, aucune différence significative du statut de fusion *SYT-SSX* sur la survie globale ou la survie sans événement n'a été observée dans une cohorte de 74 patients¹⁰ ayant reçu un diagnostic de sarcome synovial¹¹ [Stegmaier *et al.*, 2017].

L'influence de la structure des transcrits de fusion sur la progression et la récurrence de tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing a été évaluée dans une cohorte de 565 patients recrutés dans l'étude clinique du *European Ewing Tumor Working Initiative of National Groups* (Euro-E.W.I.N.G 99) [Le Deley *et al.*, 2010]. Aucune différence significative de la valeur pronostique (risque de progression ou de récurrence) n'a été observée entre les différents transcrits de fusions. Selon Van Doorninck et ses collaborateurs [2010], les protocoles de traitement standards à cinq agents qui combinent l'ifosfamide et l'étoposide à la chimiothérapie à trois agents (vincristine, doxorubicine et cyclophosphamide) ont permis d'améliorer drastiquement la situation des patients atteints d'une tumeur non de type 1 qui avait préalablement été associée à un moins bon pronostic [Riley *et al.*, 2003].

⁹ Parmi les 1 151 patients, seulement 142 avaient une tumeur de type sarcome ou sarcome associé aux translocations.

¹⁰ Cette cohorte était principalement formée d'enfants et d'adolescents.

¹¹ En analyse univariée et multivariée du modèle de régression de Cox.

5.5. Valeur thérapeutique

Des évidences de pertinence clinique de l'analyse des translocations dans la détermination de traitements ciblés des sarcomes ont été présentées à la section 5.1.

5.6. Validité analytique

Comparaison de l'approche par SNG de gènes ciblés aux techniques de FISH et de RT-PCR

Dans une étude visant à évaluer l'applicabilité d'une approche de SNG ciblé avec une PCR ancree multiplex (de l'anglais *AMP-based targeted NGS*) pour la détection de fusions dans les tumeurs osseuses et des tissus mous, Lam et ses collaborateurs [2018] ont comparé les résultats obtenus par SNG à ceux obtenus par FISH conventionnel, par RT-PCR et par immunohistochimie (lorsque possible).

Dans 3 des 48 cas pour lesquels une fusion a été détectée par l'approche de SNG ciblé, la technique de FISH conventionnelle n'a pas détecté de fusion dans une première tentative. L'utilisation de nouvelles sondes a permis de confirmer les résultats du SNG dans un deuxième temps pour chacun de ces cas. Dans un cas de sarcome d'Ewing, le SNG ciblé a révélé une fusion *EWSR1-FL1* plus rare (fusion de l'exon 10 du gène *EWSR1* à l'exon 5 du gène *FL1*) qui n'avait pas été détectée par la RT-PCR. Subséquemment, la synthèse de nouvelles amorces basées sur la séquence de la fusion détectée par le SNG ciblé et un séquençage de Sanger ont permis de confirmer la présence de la fusion. Toutefois, la technique de SNG ciblé n'a pas permis la détection d'une translocation impliquant le gène *EWSR1* détectée par FISH chez une patiente. Sur 11 échantillons ne répondant pas aux critères de qualité pour l'analyse par SNG, 5 ont révélé la présence d'une fusion par FISH. Les auteurs ont rapporté un taux d'échec de 14 % de l'approche par SNG, qu'ils ont attribué au processus de décalcification ou de fixation de certains échantillons.

Selon les auteurs de l'étude, l'utilisation d'une approche de SNG ciblé avec une PCR ancree multiplex démontrerait des résultats supérieurs aux techniques de FISH et de RT-PCR lorsque les critères de qualité des échantillons sont remplis pour les cas négatifs de fusion.

Données de validation du fabricant de la trousse

Des analyses de concordance de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel avec les techniques de FISH et de RT-PCR pour la détection de transcrits de fusion ont été effectuées (tableau 5)¹². Les données montrent qu'il y a une concordance de la trousse commerciale avec les techniques de FISH et de RT-PCR pour les trois échantillons analysés.

¹² Données provenant du feuillet de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel (Illumina), disponible à : <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf> (consulté le 15 août 2018).

Afin d'évaluer la capacité de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel à détecter des fusions à partir d'échantillons de tissus FFPE (dont l'ARN est souvent dégradé), le fabricant a analysé huit échantillons dont l'ARN était de qualité variable. Le logiciel Local Run Manager RNA Fusion Module (Illumina^{MC}) a été utilisé pour l'identification des fusions à partir des résultats de séquences (tableau 6). Les résultats montrent qu'une librairie peut être préparée à partir de seulement 10 ng d'ARN total de tissu congelé ou de 20 ng d'ARN de tissu FFPE.

Tableau 5 Concordance de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel pour la détection de fusion avec les techniques de FISH et RT-PCR

TRUSIGHT ^{MC} RNA FUSION PANEL						RT-PCR	FISH
ÉCHANTILLON	FUSION	SÉQUENCE DE FUSION (N)	SÉQUENCE DE RÉFÉRENCE (GÈNE 1)	SÉQUENCE DE RÉFÉRENCE (GÈNE 2)	COORDONNÉES CYTOGÉNÉTIQUES	RÉSULTATS	RÉSULTATS
1	BCR-ABL1 ABL1-BCR	205 7	462 23	67 392	Rsa(22;9) (q11.23;q34.12) Rsa(9;22) (q34.12; q11.23)	BCR-ABL	BCR-ABL1
2	AF4-MLL MLL-AF4	57 16	443 22	59 272	Rsa(4;11) (q21.3;q23.3) Rsa(11;4) (q23.3;q21.3)	MLL-AF4	Réarrangement <i>MLL</i>
3	WWTR1- CAMTA1	21	178	5	Rsa(3;1) (q25.1;q36.23)	WWTR1-CAMTA1	n.d.

Abréviation : n. d. : Non disponible.

Tableau 6 Détection de fusions dans des échantillons de FFPE avec la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel

ÉCHANTILLON	DV ₂₀₀	ARN TOTAL DE DÉPART	SÉQUENCE PF PAR ÉCHANTILLON	FUSION ATTENDUE	RÉSULTAT
FFPE-1	32	100 ng	2,99 M	EWSR1-FL1	fusion détectée
FFPE-2	64	50 ng	3,02 M	EWSR1-FL1	fusion détectée
FFPE-3	72	20 ng	3,39 M	SS18-SSX2	fusion détectée
RHU	s. o.	10 ng	3,95 M	BCR-ABL1 BCAS4-BCAS3 NUP214-XKR3	fusions détectées
FFPE-5	74	50 ng	3,99 M	EML4-ALK	fusion détectée
FFPE-6	57	50 ng	3,12 M	SS18-SSX1	fusion détectée
FFPE-7	n.d.	50 ng	3,25 M	RP2-BRAF	fusion détectée
FFPE-8	n.d.	20 ng	2,68 M	LMNA-NTRK1	fusion détectée*

Abréviations : DV₂₀₀ : Pourcentage de fragments d'ARN de plus de 200 nucléotides; FFPE : Tissu fixé au formaldéhyde et enrobé de paraffine; n. d. : Non disponible; PF : *Passing filter* (mesure de pureté du signal de chaque groupe de séquences lors de l'amplification); RHU : Séquence de référence humaine universelle; s. o. : Sans objet.

* Fusion détectée en abaissant le seuil du score de confiance du logiciel *Local Run Manager* de 0,6 à 0,5.

5.7. Données fournies par le demandeur

Le centre demandeur a fourni un document de validation analytique de 65 pages repris de manière presque intégrale dans cette section.

Spécificité analytique

Le centre demandeur a d'abord voulu vérifier si cette nouvelle technique de détection des fusions impliquées dans les cas de sarcomes par SNG donnait des résultats identiques aux techniques actuellement utilisées (études histologiques et immunohistochimiques conventionnelles, et RT-PCR, lorsque possible). Pour ce faire, ils ont sélectionné 34 échantillons de sarcomes différents précédemment analysés par la pathologiste spécialisée en sarcomes de leur établissement, par des analyses histologiques et immunohistochimiques. De ceux-ci, 10 avaient également été analysés par un laboratoire externe désigné pour l'analyse de la fusion suspectée par RT-PCR.

Ces échantillons avaient tous été prélevés entre 2006 et 2017 et étaient principalement des coupes en rubans de bloc FFPE (n = 29) ou des tissus congelés (n = 5).

Pour leur étude, 19 types de sarcomes différents ont été testés.

Le tableau 7 résume les résultats obtenus à partir des fichiers de résultats générés par les logiciels bio-informatiques utilisés (*Local Run Manager* et *JAFFA*).

Tableau 7 Résultats de l'étude de validation sur la détection de fusions impliquées dans les sarcomes à l'aide du panel SNG

ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC PRÉMOLÉCULAIRE	CONFIRMÉ PAR PCR	NOMBRE DE LECTURES (SNG)	DIAGNOSTIC DU PANEL DE FUSIONS SNG	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
1	dermatofibrosarcome	non	2 631 462	aucun	fusion inconnue <i>KANSL1-KAT6B</i>	5/28
2	dermatofibrosarcome	non	4 322 971	dermatofibrosarcome	<i>COLA1-PDGFB</i>	670/0
3	sarcome fibromyxoïde de bas grade	positif pour <i>CREB3L2-FUS</i>	2 659 257	sarcome fibromyxoïde de bas grade	<i>CREB3L2-FUS</i> , <i>FUS-CREB3L2</i>	33/36
4	fibrosarcome épithélioïde sclérosant	non	4 136 010	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s. o.
5	fibrosarcome infantile	négatif pour <i>ETV6-NTRK3</i>	2 540 683	aucun	aucune	s. o.
6	tumeur solitaire fibreuse	négatif pour <i>SS18-SSX1/SSX2</i>	4 587 657	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	283/nd
7	tumeur solitaire fibreuse	non	4 125 898	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	17/24
8	tumeur solitaire fibreuse	non	2 784 377	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	82/0
9	tumeur myofibroblastique inflammatoire	non	2 807 613	aucun	aucune	s. o.
10	tumeur myofibroblastique inflammatoire ou sarcome synovial	quantité d'ARN trop faible	4 680 030	aucun	aucune (ratio sous-optimal) biopsie trocart	s. o.
11	histiocytome fibreux angiomatoïde	positif pour <i>EWSR1-CREB1</i>	2 877 930	histiocytome fibreux angiomatoïde	<i>EWSR1-CREB1</i>	14/34
12	sarcome synovial	positif pour <i>SS18-SSX1/SSX2</i>	4 070 101	sarcome synovial	<i>SS18-SSX1</i>	270/22
13	sarcome synovial	oui	2 339 308	sarcome synovial	<i>SS18-SSX1</i>	88/518
14	sarcome synovial suspecté	négatif pour <i>SS18-SSX1/SSX2</i>	1 849 981	sarcome synovial	<i>SS18-SSX1</i>	168/nd
15	tumeur solitaire fibreuse	non	3 478 569	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	66/241
16	sarcome d'Ewing	non	3 282 502	sarcome d'Ewing	<i>EWSR1-FLI1</i>	0/22
17	sarcome d'Ewing	oui	2 918 611	sarcome d'Ewing	<i>EWSR1-FLI1</i>	90/153
18	sarcome d'Ewing	oui (HMR)	2 646 579	sarcome d'Ewing	<i>EWSR1-FLI1</i>	12/nd

ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC PRÉMOLECULAIRE	CONFIRMÉ PAR PCR	NOMBRE DE LECTURES (SNG)	DIAGNOSTIC DU PANEL DE FUSIONS SNG	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
19	tumeur desmoplastique à petites cellules rondes	négatif pour fusions <i>EWSR1-FLI1</i> et <i>EWSR1-ERG</i>	2 956 449	sarcome d'Ewing	<i>FUS-ERG</i>	112/90
20	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	négatif pour <i>EWSR1-NR4A3</i> , <i>TAF15-NR4A3</i> , <i>EWSR1-FLI1</i> , <i>EWSR1-ERG</i> , <i>EWSR1-TEC</i> et <i>TAF2N-TEC</i>	5 383 090	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	<i>EIF4A2-NR4A3</i>	1 282/11
21	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	positif pour <i>TAF15-NR4A3</i>	2 699 501	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	<i>TAF15-NR4A3</i>	10/19
22	sarcome à cellules claires	positif pour <i>EWSR1-ATF1</i>	2 943 544	sarcome à cellules claires	<i>EWSR1-ATF1</i>	49/82
23	myoépithéliome	négatif pour <i>EWSR1-TEC</i>	2 055 082	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	<i>TCF12-NR4A3</i>	129/176
24	myoépithéliome	non	2 107 836	aucun	aucune	s.o.
25	rhabdomyosarcome alvéolaire	positif pour <i>PAX7-FOXO1</i>	4 187 604	rhabdomyosarcome alvéolaire	<i>PAX7-FOXO1</i>	19/304
26	rhabdomyosarcome alvéolaire	positif pour <i>PAX3-FOXO1</i>	2 586 192	rhabdomyosarcome alvéolaire	<i>PAX3-FOXO1</i>	39/75
27	liposarcome myxoïde	non	2 863 920	liposarcome myxoïde	<i>FUS-DDIT3</i> , <i>DDIT3-FUS</i>	27/146
28	liposarcome myxoïde	non	941 966	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s.o.
29	hémangioendothéliome épithélioïde	non	4 090 590	hémangioendothéliome épithélioïde	<i>WWTR1-CAMTA1</i>	74/341
30	tumeur du stroma endométrial de haut grade	non	3 122 919	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s.o.
31	tumeur du stroma endométrial de haut grade	non	4 724 021	fusion inconnue	<i>WDR70-NUP155</i>	166/207

ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC PRÉMOLECULAIRE	CONFIRMÉ PAR PCR	NOMBRE DE LECTURES (SNG)	DIAGNOSTIC DU PANEL DE FUSIONS SNG	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
32	tumeur du stroma endométrial de bas grade	non	3 727 334	aucun	aucune	s.o.
33	tumeur du stroma endométrial de bas grade	non	3 203 421	aucun	aucune	s.o.
34	tumeur du stroma endométrial de bas grade	non	74 482	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s.o.

Légende :

Diagnostic de la pathologie : Diagnostic extrait du rapport de pathologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, basé sur les études histologiques, immunohistochimiques et moléculaires (lorsque disponibles).

Confirmé RT-PCR : Fusion testée par RT-PCR au CHU de Québec.

Nombre de lectures : Nombre de lectures totales de l'échantillon selon le logiciel *Local Run Manager* d'Illumina^{MC}.

Diagnostic du panel de fusions SNG : Diagnostic évoqué en fonction des fusions détectées par le panel SNG et confirmé par les différentes bases de données.

Nombre de lectures de fusion *Local Run Manager* /JAFFA : Nombre de lectures spécifiques de la fusion détectée, extrait des logiciels *Local Run Manager* et JAFFA, respectivement.

De ce tableau, les informations suivantes peuvent être tirées :

Tableau 8 Concordance des fusions détectées par rapport au diagnostic histologique (n = 34)

FUSION DÉTECTÉE PAR LE LABORATOIRE EXTERNE	FUSION DÉTECTÉE PAR LE PANEL SNG	NOMBRE DE CAS	NOMBRE DE CAS (%)
Identique	identique	11	32 %
Non testée	conforme au diagnostic	7	21 %
Négatif par RT-PCR	conforme au diagnostic	2	6 %
Non testée	différente du diagnostic	2	6 %
Non testée	différente du diagnostic (fusion de nature inconnue)	2	6 %
Non testée	aucune	4	12 %
Non testée	spécimens ne remplissant pas les standards de qualité	6	18 %
TOTAL		34	100 %

À noter que suite aux résultats de SNG, la présence de toutes les fusions trouvées par SNG dans chacun des échantillons a été confirmée localement, par RT-PCR ou par qPCR (Ewing - Synovial), ce qui confirme la spécificité de l'analyse SNG.

Selon le demandeur, ces données permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Pour tous les spécimens de sarcomes ayant eu une fusion détectée par RT-PCR (plus de 30 % des cas), cette même fusion est détectée avec le panel de fusions par SNG. La spécificité et la sensibilité de la technique par SNG sont donc équivalentes à la RT-PCR.
- Dans sept échantillons supplémentaires, dont les analyses moléculaires n'avaient pas été effectuées, des fusions ont été détectées, ce qui confirme du même coup le diagnostic de ces sarcomes, établi par le pathologiste. Dans ces cas, l'analyse SNG était la seule preuve moléculaire confortant le diagnostic du sarcome.
- Pour deux échantillons, la technique par RT-PCR (soit le *Gold Standard* en détection de fusion) ne parvenait pas à confirmer le diagnostic différentiel du pathologiste. Toutefois, le panel de fusion par SNG a permis de les identifier. Dans un des cas (échantillon n° 14), une délétion de 130 nucléotides rendait impossible la liaison d'une amorce utilisée pour la détection du sarcome synovial et dans le deuxième cas (échantillon n° 20), les fusions retrouvées par SNG étaient des fusions à incidences rares dans les chondrosarcomes myxoïdes extrasquelettiques. La RT-PCR ciblant cette fusion rare n'avait donc pas été développée par le laboratoire externe. Le SNG permet donc d'éviter les diagnostics de sarcome erronés causés par les limitations techniques de la RT-PCR.
- Le laboratoire demandeur a obtenu une divergence de diagnostic relatif au type de sarcome présent pour deux spécimens en comparant les analyses de pathologie et celles de SNG : Dans le cas de l'échantillon n° 19, le rapport du pathologiste soulève, comme diagnostic différentiel, un sarcome d'Ewing et, de manière moins certaine, une tumeur desmoplastique à petites cellules rondes. Toutefois, les analyses par RT-PCR effectuées dans un centre externe se sont avérées négatives pour les fusions *EWSR1-FLI1* et *EWSR1-ERG*, ce qui réfute

le diagnostic de sarcome d'Ewing. Par conséquent, le diagnostic final retenu était une tumeur desmoplastique à petites cellules rondes, connue pour être associée avec les translocations *EWSR1-WT1* ou *EWSR1-ERG*. Ainsi, grâce à l'analyse de SNG, la présence de la fusion *FUS-ERG* a pu être détectée, soit une fusion plus rare retrouvée dans les sarcomes d'Ewing et n'ayant pas été développée dans le centre externe ayant effectué l'analyse initiale, confirmant le diagnostic de sarcome d'Ewing.

- Pour l'échantillon n° 23, à la lecture du rapport final de pathologie, le laboratoire demandeur a compris que les analyses effectuées par le pathologiste ne lui permettaient pas de conclure quel était le type de sarcome exact qui se retrouvait dans l'échantillon analysé. Son diagnostic différentiel suggérait un myoépithéliome des tissus mous, un chondrosarcome myxoïde extrasquelettique, une tumeur fibromyxoïde ossifiante ou un chondrome des tissus mous. Toutefois, le diagnostic choisi fut le myoépithéliome, en raison de l'absence de détection de fusion par les techniques moléculaires du centre externe. Grâce au panel de fusions de SNG, un diagnostic de chondrosarcome myxoïde extrasquelettique a pu être posé. À la lueur de ces nouveaux résultats moléculaires, le pathologiste a confirmé être en accord avec ce diagnostic corrigé.
- Pour deux échantillons, le n° 1 (dermatofibrosarcome) et le n° 31 (tumeur du stroma endométrial de haut grade), la présence de nouvelles fusions n'ayant jamais été répertoriées dans les sarcomes, ni dans les différentes bases de données énumérées¹³ a été détectée. Pour l'échantillon n° 1, une recherche de la littérature a démontré que cette fusion a déjà été observée dans une tumeur bénigne du muscle lisse de type léiomyome rétropéritonéal. Pour l'échantillon n° 31, il s'agit d'une nouvelle fusion n'ayant jamais été rapportée dans la littérature. Puisqu'aucun lien ne peut être fait entre les translocations trouvées et les sarcomes pour ces deux spécimens, la conduite sera de ne pas rapporter ces fusions au rapport de pathologie. Pour l'étude de validation, un des spécimens a été validé par RT-PCR et a confirmé la présence de cette nouvelle fusion.
- Pour 12 % des échantillons testés (total de quatre spécimens), l'analyse n'a pas été en mesure de détecter de fusions, ce qui confirme le diagnostic retenu par le pathologiste. Quelques explications peuvent être ici évoquées :
 - Bien que le sous-type de sarcome détecté par le pathologiste lors de ses analyses histologiques et immunohistochimiques soit connu pour être associé à des fusions intergéniques, cela ne garantit pas qu'une fusion se trouve réellement dans l'échantillon du patient. Selon le demandeur, la

¹³ Base de données Mitelman sur les anomalies chromosomiques et les fusions intergéniques impliquées dans le cancer

<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

<http://cgap.nci.nih.gov/Genes/GeneFinder>

Base de données Quiver de la compagnie Archer, rapportant les fusions intergéniques

<http://quiver.archerdx.com/>

Base de données COSMIC Fusion

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/fusion>

Base de données sur les fusions, par le MD Anderson/TCGA

<http://www.tumorfusions.org/>

Base de données sur les fusions, par Universidad de Navarra

<http://www.unav.es/genetica/TICdb/>

pénétrance d'une fusion versus le sous-type de sarcome associé peut varier de 10 % à 100 %.

- L'échantillon analysé contient des fusions non caractérisées, mais les deux partenaires ne se trouvent pas ciblés dans le panel TruSight^{MC} RNA Fusion.
- Le ratio de cellules sarcomateuses par rapport aux cellules normales est trop faible. Pour pallier cette problématique, le pathologiste devra confirmer la présence d'une bonne proportion (> 20 %) de tissu sarcomateux dans les échantillons afin de pouvoir effectuer la demande du panel de fusions par SNG.
- Un niveau d'expression trop faible du gène fusionné peut rendre sa détection impossible.
- Une fusion entre deux gènes juxtaposés, dans la même orientation et sur le même chromosome, peut être éliminée par les filtres bio-informatiques utilisés. En effet, advenant une fusion entre deux gènes, la distance minimale doit être de 100 000 nucléotides (valeur modifiable). Cette contrainte a comme but d'empêcher la détection de fusions faux-positives causées par la poursuite de transcription au travers du gène suivant (*readthrough transcript*).
- Finalement, six des spécimens testés (n° 4, n° 9, n° 10, n° 28, n° 30 et n° 34), ont été considérés comme n'étant pas de qualité suffisante pour que le résultat soit fiable. Plusieurs raisons expliquent cette absence de résultat :
 - Bien que l'ARN extrait réponde aux standards de qualité (DV₂₀₀, résultats de Bioanalyser), la librairie peut parfois se retrouver en qualité ou en quantité sous-optimale (via analyses sur puces ADN Bioanalyser). Les échantillons n° 10 et n° 28 en sont de bons exemples avec aucune fusion détectée, possiblement en raison d'un nombre de lectures bien en deçà des deux millions requises. Vraisemblablement, un problème technique est survenu lors de la préparation des librairies (ex. : perte d'échantillon lors de la purification par billes magnétiques, erreur de manipulation des réactifs, etc.). L'expérience avec le séquençage de ces échantillons a quand même été poursuivie pour l'étude de validation, afin d'en documenter l'impact sur les résultats finaux. Les résultats ont confirmé que ces extractions étaient inadéquates. Toutefois, la conduite aurait été différente avec des échantillons cliniques où ces deux librairies auraient été reprises après l'échec de ce point de contrôle de qualité.
 - L'échantillon est de trop petite taille ou de mauvaise qualité. Pour l'échantillon n° 34, il s'agissait d'une biopsie à l'aiguille de trop petite taille pour extraire une quantité suffisante d'ARN. Le laboratoire externe a également été confronté à la même problématique, selon le rapport officiel. Des rubans de coupes supplémentaires devraient alors être demandés au laboratoire de pathologie afin d'augmenter la quantité de cellules à extraire.
 - Plus les échantillons fixés au formaldéhyde (FFPE) sont vieux, plus l'ARN risque d'être dégradé. Ceci a été constaté lors de tests avec un échantillon datant de 2006 (résultats non montrés) et dont la qualité de l'ARN extrait était sous-optimale.

- Finalement, pour les échantillons n° 4, n° 9 et n° 30, l'ARN était de bonne qualité, la librairie finale de taille et en quantité attendue et le nombre de lectures était supérieur à deux millions. Toutefois, le point de contrôle final d'expression des 15 *pseudo-housekeeping genes* a échoué. Les résultats du panel de fusion obtenus pour ces échantillons n'étaient donc pas fiables et, dans un contexte clinique, l'expérience devrait être répétée à partir du début.

La spécificité analytique de la technique a également été confirmée en vérifiant la présence de fusions dans sept lignées cellulaires commercialisées et connues pour être porteuses de fusions. Le tableau 9 présente les résultats de fusions attendus et obtenus à l'aide du panel de gènes de fusion. Une corrélation de 100 % a été obtenue, ce qui démontre la capacité de ce panel à détecter des fusions entre divers gènes.

Tableau 9 Validation du panel de gènes de fusion TruSight RNA^{MC} Fusion avec sept lignées cellulaires décrites

ÉCHANTILLON	LIGNÉE CELLULAIRE	NO DE PRODUIT COMMERCIAL	FUSION DÉCRITE	NOMBRE DE LECTURES	FUSION TROUVÉE	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
1	K562	ATCC-CCL-243	<i>BCR-ABL, NUP214-XKR3</i>	2 934 338	<i>BCR-ABL, NUP214-XKR3</i>	123/291 16/29
2	SupB15	ATCC-CRL-1929	<i>BCR-ABL</i>	4 322 971	<i>BCR-ABL</i>	49/80
3	MV-4-11	ATCC-CRL-9591	<i>AFF1-KMT2A</i>	4 531 494	<i>AFF1-KMT2A</i>	245
4	EOL	DSMZ-ACC-386	<i>FIP1L1-PDGFR</i>	2 767 540	<i>FIP1L1-PDGFR</i>	20/0
5	NB4	DSMZ-ACC-207	<i>PML-RARA</i>	2 706 834	<i>PML-RARA</i>	24/8
6	A-673	ATCC-CRL-1598	<i>EWSR1-FLI1</i>	7 126 381	<i>EWSR1-FLI1</i>	47/446
7	RD-ES	ATCC-HTB-166	<i>EWSR1-FLI1</i>	2 933 807	<i>EWSR1-FLI1</i>	168/1 281

Sensibilité analytique et limites de détection

Les résultats obtenus avec l'utilisation du panel TruSight^{MC} RNA Fusion par SNG étaient d'ordre qualitatif (présence ou absence de fusion) et non pas quantitatif. Cette analyse est réservée aux cas diagnostiques et ne pourrait être utilisée dans le cas de recherche de maladie résiduelle. Le centre demandeur a tout de même analysé la sensibilité analytique relative de cette nouvelle analyse. Pour ce faire, ils ont utilisé deux approches différentes.

Dans la première, un échantillon connu pour porter la fusion *BCR-ABL* a été dilué de manière sériée. Des dilutions de cet échantillon de 10 %, 1 % et 0,1 % (non montré) ont été effectuées. Comme démontré dans le tableau 10, une linéarité dans le nombre de fusions détectées en fonction des dilutions effectuées est observée. Cette expérience a également permis de mettre en évidence le fait que la sensibilité de la technique est dépendante de l'expression de la fusion générée par le transcrit, ainsi que par la quantité de cellules porteuses de la fusion dans l'échantillon. Par conséquent, une fusion très fortement exprimée dans peu de cellules sarcomateuses pourra être détectée et, inversement, une fusion étant très peu exprimée pourrait ne pas être détectée en présence d'un nombre appréciable de cellules sarcomateuses. Chaque fusion aura donc un niveau d'expression différent et, par conséquent, une sensibilité différente.

Tableau 10 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion au niveau de sa sensibilité de détection

ÉCHANTILLON	FUSION DÉCRITE	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager)	
				BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
Lignée <i>BCR-ABL</i> 100 %	<i>BCR-ABL</i>	4 433 335	<i>BCR-ABL</i>	77	52
Lignée <i>BCR-ABL</i> 10 %		4 390 748	<i>BCR-ABL</i>	6	4
Lignée <i>BCR-ABL</i> 1 %		3 817 036	<i>BCR-ABL</i>	0	0

Abréviation : M : Millions.

Dans la deuxième expérience de sensibilité analytique, le contrôle externe commercial Seraseq^{MC} Fusion RNA v2 a été utilisé. Ce contrôle est composé d'un mélange de plusieurs lignées cellulaires et de constructions artificielles comportant des fragments d'ADN qui encodent la fusion recherchée. Chaque fusion étant par la suite quantifiée par la compagnie à l'aide de la PCR digitale (ddPCR). Le tableau 11 montre la confirmation de 10 des 14 fusions présentes dans ce contrôle commercial. Les fusions non détectées, mais devant pourtant être comprises dans ce contrôle, semblent être celles présentes en moindre quantité. En effet, les fusions *KIF5B-RET*, *SLC34A-ROS1*, *SLC45A3-BRAF* et *TMPRSS2-ERG* étaient parmi les moins abondantes, soit avec moins de 373 copies/ng d'ARN. Toutefois, trois fusions moins abondantes, présentant 283, 316 et 361 copies/ng d'ARN, ont été détectées.

Plusieurs facteurs peuvent affecter l'efficacité et la capacité à détecter la présence de fusions; en voici quelques-uns :

1) Nombre de copies de la fusion (expression de la fusion, nombre de cellules sarcomateuses)

Comme discuté précédemment, plus la fusion est fortement exprimée dans l'échantillon, plus les chances de la détecter sont grandes. De plus, plus la quantité de cellules à analyser est grande, meilleures sont les chances de détection.

2) Possibilité de détecter un seul ou les deux partenaires de la fusion

Durant la fabrication de la librairie, l'étape critique de la détection ou non des fusions est la capture des fusions à l'aide de sondes spécifiques. Les fusions ayant les deux gènes contenus dans le panel démontreront une sensibilité accrue par rapport à celles où un seul des deux partenaires est ciblé.

3) Nombre de sondes couvrant les régions juxtaposées à la fusion

Pour des raisons similaires à celles évoquées en 2, une plus grande variabilité de sondes capables de lier les fragments de librairies (fusions) offrira une plus grande efficacité dans la détection des fusions.

D'autre part, afin de confirmer que le processus expérimental est optimal, trois échantillons ont été partagés avec des collaborateurs de Toronto pour qu'ils soient testés de manière indépendante (voir tableaux 11 et 15). Un des échantillons fournis était de l'ARN provenant du contrôle commercial Seraseq^{MC} Fusion RNA v2 (tableau 11). À l'aide du même panel de gène de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion, ils ont obtenu des résultats très semblables, à quelques petites différences près. En effet, ils ont détecté une fusion *KIF5B-RET* en faible quantité que le centre demandeur n'a pas récupérée, mais ils n'ont pas été en mesure de détecter trois fusions (*CD74-ROS1*, *LMNA-NTRK1* et *EGFR-SEPT14*) détectées par le centre demandeur. À la lumière de ces résultats, il est possible de conclure que le processus analytique du laboratoire demandeur est efficace puisqu'il est similaire à celui de l'un des laboratoires de référence en sarcomes du Canada. L'hypothèse la plus plausible émise par le demandeur, pour expliquer les divergences notées, est que certaines fusions du contrôle commercial se situent autour de la limite de détection de la technique par SNG, ce qui les rend parfois détectables, parfois indétectables.

Dans un souci de protection du patient et dans un contexte où la limite de détection est difficilement évaluable, le demandeur s'engage, sur l'ensemble de la période de validation et de mise en place de la technique (environ un an), à transférer vers les laboratoires externes les échantillons dans lesquels aucune fusion n'aura été détectée, comme c'est le cas actuellement. Après cette période de transition, une compilation des résultats sur les échantillons qui auront été reconnus comme n'étant pas porteurs de fusion sera effectuée et une réévaluation de la pratique sera faite, le cas échéant.

Tableau 11 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion par un contrôle externe commercial Seraseq^{MC} Fusion RNA v2 (lot 10244305)

FUSION ATTENDUE	NOMBRE DE COPIES (copies/ng)	DÉTECTÉE PAR LE LABORATOIRE DEMANDEUR	DÉTECTÉE PAR LE LABORATOIRE EXTERNE
EML4-ALK	316	oui	oui
KIF5B-RET	faible et variable	non	oui (1/2 – 1 copie)
NCOA4-RET	1 144	oui	oui
CD74-ROS1	361	oui	non
SLC34A-ROS1	286	non	non
TPM3-NTRK1	544	oui	oui
FGFR3-BAIAP2L1	419	oui	oui
PAX8-PPARG1	1 107	oui	oui
FGFR3-TACC3	391	oui	oui
LMNA-NTRK1	283	oui	non
SLC45A3-BRAF	373	non	non
TMPRSS2-ERG	157	non	non
EGFR- SEPT14	861	oui	non
ETV6-NTRK3	1 579	oui	oui
TOTAL		10/14	8/14

Note : Les gènes en caractère gras ne sont pas couverts par le panel TruSight^{MC} RNA Fusion.

Robustesse de la méthode

Dans le but de démontrer la robustesse de l'approche utilisée, une expérience de reproductibilité intra-expérience avec un spécimen analysé en triplicata et deux autres en duplicata a été réalisée, et ce, avec une librairie unique pour chaque échantillon. Cela a permis de couvrir l'ensemble des étapes de fabrication des librairies ainsi que celle du séquençage. La compilation des résultats du tableau 12 permet de constater que pour ces trois spécimens dérivés de sarcomes avec des fusions différentes, le nombre de fusions obtenu par le panel SNG est similaire, ce qui démontre la reproductibilité de la technique.

Tableau 12 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion : Reproductibilité intra-expérience n° 1

ÉCHANTILLON	FUSION DÉCRITE	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)	
				BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
Sarcome synovial 1A	SS18-SSX1	4 070 101	SS18-SSX1	270/nd	199
Sarcome synovial 1B		3 376 435	SS18-SSX1	314/nd	279
Sarcome synovial 1C		3 740 801	SS18-SSX1	281/nd	225
Tumeur solitaire fibreuse 1A	NAB2-STAT6	4 384 001	NAB2-STAT6	243/nd	166
Tumeur solitaire fibreuse 1B		4 587 657	NAB2-STAT6	283/nd	185
Sarcome d'Ewing 1A	EWSR1-FLI1	2 646 579	EWSR1-FLI1	12/nd	14
Sarcome d'Ewing 1B		4 948 745	EWSR1-FLI1	5/nd	3

Abréviations : M : Millions; nd : Non déterminé.

Une deuxième expérience de reproductibilité intra-expérience a été effectuée en répétant sept fois le même spécimen (une lignée cellulaire) à l'aide de librairies différentes avec un séquençage commun. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13 et montrent la reproductibilité intra-expérience du panel de gènes TruSight^{MC} RNA Fusion. La variation maximale entre le nombre de fusions détectées dans chaque analyse pour les fusions *AFF1-KMT2A* et *KMT2A-AFF1* était respectivement de 29 et de 21. Les écarts types obtenus montrent que ce panel n'est pas conçu pour quantifier précisément des transcrits de fusions, mais plutôt pour donner une information globale de détection ou non de fusions. En aucun cas, l'information sur le nombre de fusions détectées par l'utilisation du panel de fusions par SNG ne sera utilisée ou communiquée, afin d'éviter toute tentative de corrélation entre le nombre de fusions et l'état ou le niveau de la pathologie, corrélation qui serait erronée.

**Tableau 13 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA
Fusion : Reproductibilité intra-expérience n° 2**

ÉCHANTILLON	FUSIONS ATTENDUES (VALIDÉES)	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)	
				BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
MV-4-11 n° 1	<i>AFF1-KMT2A</i> <i>KMT2A-AFF1</i>	4 531 494	<i>AFF1-KMT2A</i>	245	162
			<i>KMT2A-AFF1</i>	111	73
MV-4-11 n° 2		4 390 748	<i>AFF1-KMT2A</i>	198	135
			<i>KMT2A-AFF1</i>	116	79
MV-4-11 n° 3		3 817 036	<i>AFF1-KMT2A</i>	279	219
			<i>KMT2A-AFF1</i>	154	121
MV-4-11 n° 4		3 764 398	<i>AFF1-KMT2A</i>	220	175
			<i>KMT2A-AFF1</i>	128	102
MV-4-11 n° 5		3 598 398	<i>AFF1-KMT2A</i>	222	185
			<i>KMT2A-AFF1</i>	124	103
MV-4-11 n° 6		3 883 385	<i>AFF1-KMT2A</i>	232	179
			<i>KMT2A-AFF1</i>	133	103
MV-4-11 n° 7		3 337 457	<i>AFF1-KMT2A</i>	236	212
			<i>KMT2A-AFF1</i>	146	131
Moyenne <i>AFF1-KMT2A</i>				181 ± 29	
Moyenne <i>KMT2A-AFF1</i>				102 ± 21	

Abréviation : M : Millions.

De plus, la robustesse de la technique a été vérifiée par son pouvoir de reproductibilité inter-expériences où des spécimens étaient analysés à partir de librairies différentes, à des journées différentes et lors d'expériences de séquençage différentes. Pour ce faire, la lignée cellulaire K562 décrite précédemment pour contenir deux fusions différentes, chacune exprimée à un niveau différent, a été utilisée. Le tableau 14 résume les résultats obtenus lors de ces analyses. Malgré une variation supérieure aux expériences de reproductibilité intra-expérience, les deux fusions peuvent être détectées dans chacune des expériences, et ce, à des niveaux similaires.

Tableau 14 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion : Reproductibilité inter-expériences

ÉCHANTILLON	EXPÉRIENCE	FUSION DÉCRITE (VALIDÉE)	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)	
					BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
Lignée cellulaire K562	1	<i>BCR-ABL</i> <i>NUP214-XKR3</i>	1 543 857	<i>BCR-ABL</i>	244	474
				<i>NUP214-XKR3</i>	44	86
	2		2 031 685	<i>BCR-ABL</i>	383	566
				<i>NUP214-XKR3</i>	43	63
	3		1 497 413	<i>BCR-ABL</i>	168	337
				<i>NUP214-XKR3</i>	27	54
Moyenne <i>BCR-ABL</i>					459 ±115	
Moyenne <i>NUP214-XKR3</i>					68 ±17	

Abréviation : M : Millions.

Finalement, le demandeur a voulu vérifier que le processus analytique entier (contrôle qualité sur l'ARN, quantification de l'ARN, fabrication de la librairie, quantification des librairies, séquençage et analyse des résultats) était similaire à celui d'un laboratoire ayant beaucoup d'expérience avec le panel de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion, soit plus de 400 échantillons de sarcomes séquencés par SNG. Pour ce faire, des ARN extraits (trois différents : le contrôle externe commercial ainsi que les échantillons inter-laboratoire n° 1 et n° 2), de même que deux librairies pour les échantillons inter-laboratoires n° 1 et n° 2 générées dans le laboratoire demandeur (résultats non montrés) ont été soumis au laboratoire *Molecular Diagnostics Pathology & Lab Medicine* du Mount Sinai Hospital afin qu'ils soient intégrés aux échantillons de routine de leur laboratoire. En effet, une corrélation de 100 % a été obtenue pour les résultats issus des librairies préparées dans le laboratoire local (cette étape permet de vérifier l'efficacité à séquencer et à interpréter les résultats), de même qu'une efficacité légèrement supérieure à partir de l'ARN (cette étape permet de vérifier l'ensemble du processus) en comparant les résultats obtenus avec ceux de Toronto. En effet, pour les deux échantillons inter-laboratoire, la corrélation est de 100 %, tandis que pour le contrôle externe commercial, le laboratoire local a détecté deux fusions supplémentaires, qui semblaient toutefois très peu abondantes.

Tableau 15 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion par l'échange de deux spécimens avec un laboratoire de Toronto accrédité pour effectuer cette analyse en Ontario

ÉCHANTILLON	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	DÉTECTÉE (laboratoire local)	DÉTECTÉE (laboratoire externe)
Inter-laboratoire n° 1	2 631 462	<i>KMT2A-YAP1</i>	oui	oui
		<i>YAP1-KMT2A</i>	oui	oui
Inter-laboratoire n° 2	4 322 971	<i>FGFR1-CEP83</i>	oui	oui

Selon le demandeur, les résultats obtenus lors des expériences réalisées sur des échantillons cliniques montrent que l'utilisation du panel TruSight^{MC} RNA Fusion pour la détection de fusions associées aux sarcomes est un moyen d'obtenir des diagnostics précis, s'appuyant sur des données moléculaires fiables.

La compagnie Illumina^{MC} assure que les 507 fusions de gènes incluses dans le panel TruSight^{MC} RNA Fusion sont complètement couvertes (les 7 690 exons) par des sondes (de 80 nucléotides en moyenne), ce qui permet de purifier chacun de ces gènes (fusionnés ou non). De plus, afin de s'assurer que les extrémités de chaque gène sont couvertes, des sondes ciblant 160 nucléotides au niveau du 5' UTR et du 3' UTR sont utilisées. Au total, 21 283 sondes se trouvent dans la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion. La compagnie fournit l'information permettant de visualiser toutes les régions couvertes.

Le centre demandeur a vérifié, pour chacun des 94 gènes liés aux sarcomes d'intérêt, si la couverture de ceux-ci est complète (tableau 16).

Tableau 16 Couverture des 94 gènes de la trousse TruSight^{MC} Fusion vérifiée par le centre demandeur

Gène	Couverture (%)	Régions couvertes par NGS (décrire)	Gène	Couverture (%)	Régions couvertes par NGS (décrire)
ALK	100	Tous les exons + 160 nt du 5' et du 3' UTR	NR4A3	97.1	Tous les exons sauf : 102390347-102390714 = 167 nt
ASPSCR1	100	idem	NTRK3	100	Tous les exons + 160 nt du 5' et du 3' UTR
ATF1	100	idem	NUTM2B	100	idem
ATIC	100	idem	OMD	100	idem
BCOR	100	idem	PATZ1	100	idem
CAMTA1	100	idem	PAX3	100	idem
CAR5	100	idem	PBX1	100	idem
CCNB3	100	idem	PDGFB	100	idem
CDH11	100	idem	PDGFRB	100	idem
CDX1	100	idem	PHF1	100	idem
CIC	100	idem	PLAG1	100	idem
CLTC	100	idem	POU5F1	100	idem
CNBP (ZNF9)	100	idem	PPFIBP1	100	idem
COL1A1	100	idem	PRKAR1A	100	idem
COL1A2	100	idem	RANBP2	100	idem
COL6A3	100	idem	RAD51B (RAD51L1)	100	idem
CREB1	100	idem	ROS1	100	idem
CREB3L1	100	idem	RREB1	100	idem
CREB3L2	100	idem	SEC31A	100	idem
CSF1	100	idem	SFPQ	100	Tous les exons sauf : 33638323-33638305 = 182 nt
DDIT3	100	idem	SMARCA5	100	idem
DUX4	100	idem	SP3	100	idem
EML4	100	idem	SRF	100	idem
EPC1	100	idem	SS18	100	idem
ERG	100	idem	SS18L1	100	idem
ETV1	100	idem	SSX1	100	idem
ETV4	100	idem	SSX2	100	idem
ETV6	100	idem	SSX4	100	idem
EWSR1	100	idem	STAT6	100	idem
FEV	100	idem	SUZ12	100	idem
FGFR1	100	idem	TAF15	100	idem
FLI1	100	idem	TCF12	100	idem
FOXO1	100	idem	TEAD1	100	idem
FOXO4	100	idem	TFE3	100	idem
FUS	100	idem	TFG	100	idem
GLI1	98.3	Tous les exons sauf : 57864097-57864160 = 63 nt	TGFBR3	100	idem
HAS2	100	idem	THRAP3 (TRAP150)	100	idem
HEY1	100	idem	TPM3	100	idem
IRF2BP2	100	idem	TPM4	100	idem
JAZF1	100	idem	USP6	100	idem
MBTD1	100	idem	WT1	100	idem
MEAF6	100	idem	WWTR1	100	idem
MYH9	100	idem	YAP1	100	idem
NAB2	89,6	Tous les exons sauf : 57485464-57485634 = 170 nt 57487269-57487383 = 114 nt	YWHAE	100	idem
NCOA1	100	idem	ZC3H7B	100	idem
NCOA2	100	idem	ZNF444	100	idem
NFATC2	100	idem			
NONO	97.4	Tous les exons sauf : 70510567-70510642 = 75 nt			

Cette analyse a permis de révéler une couverture imparfaite dans le cas de cinq gènes, soit : *GLI1*, *NAB2*, *NONO*, *NR4A3* et *SFPQ*. Voici en détail l'analyse de ces couvertures imparfaites et son impact :

GLI1 a une région de 63 nucléotides non couverte (couverture à 98,3 %). Son unique partenaire rapporté est *ACTB*, non couvert par le panel de fusion. Donc, toute fusion *ACTB-GLI1* se produisant dans cette région pourrait être difficilement détectable. Toutefois, les fragments d'ADN complémentaire utilisés lors de l'étape

d'hybridation et de capture ont une taille moyenne de 250 nucléotides permettant la liaison par des sondes avoisinantes.

NAB2 a deux régions de 170 et de 140 nucléotides non couvertes (couverture à 89,6 %). Ses partenaires sont *STAT6* et *PDGFR β* , qui sont couverts à 100 % par le panel de fusion. Donc, toute fusion *NAB2-STAT6* et *NAB2-PDGFR β* sera détectée. Les deux régions non couvertes n'ont donc aucun impact.

NONO a une région de 75 nucléotides non couverte (couverture à 97,4 %). Son unique partenaire rapporté est *TFE3* couvert à 100 % par le panel de fusion. Donc, toute fusion *NONO-TFE3* sera détectée. La région non couverte n'a donc aucun impact.

NR4A3 a une région de 167 nucléotides non couverte (couverture à 97,1 %). Ses partenaires sont *TAF15*, *TGF*, *TCF12*, *EWSR1* et *HSPA8*. Tous sont couverts à 100 % par le panel de fusion, sauf *HSPA8* qui n'est pas couvert. Donc, toute fusion *NR4A3-HSPA8* se produisant dans cette région pourrait être difficilement détectable. Toutefois, cette fusion n'aurait été rapportée que dans un seul article scientifique [Urbini *et al.*, 2017]. L'impact de cette région non couverte serait mineur, selon le demandeur.

SFPQ a une région de 182 nucléotides non couverte (couverture à 95,1 %). Son unique partenaire rapporté est *TFE3*, couvert à 100 % par le panel de fusion. Donc, toute fusion *SFPQ-TFE3* sera détectée. La région non couverte n'a donc aucun impact.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération (SNG). Ce test vise les patients qui ont reçu, à la suite d'une étude histologique conventionnelle, un diagnostic de sarcome dont le sous-type est connu pour être lié à une translocation spécifique, afin de confirmer le diagnostic ou d'exclure un diagnostic différentiel. L'analyse présentée comporte deux scénarios :

- le premier considère la réalisation de l'analyse par SNG en remplacement des analyses par RT-PCR effectuées pour la clientèle desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont), mais réalisées au CHU de Québec – Université Laval (site de L'Hôtel-Dieu de Québec), en plus des cas difficilement classifiables issus de l'analyse par RT-PCR pour l'ensemble du Québec;
- le second considère les coûts liés à la réalisation de l'analyse par SNG en remplacement de celles effectuées par RT-PCR pour l'ensemble du Québec.

Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du MSSS. L'analyse porte sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses s'appuyant sur des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans les tableaux 17 et 18. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- Selon les experts consultés, il y aurait en moyenne 350 nouveaux cas de sarcomes des tissus mous et osseux par année au Québec.

- Parmi ces cas, seul le tiers pourrait requérir une analyse par RT-PCR pour en préciser le diagnostic et uniquement 10 % des cas issus de cette analyse serait jugés difficilement classifiables.
- Ainsi, parmi ces 350 nouveaux cas annuels de sarcomes des tissus mous et osseux, 117 analyses par RT-PCR pourraient être requises. Parmi celles-ci, le tiers concernerait la population desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont), soit environ 39 analyses. Les analyses par RT-PCR requises par le demandeur sont réalisées par le CHU de Québec – Université Laval, qui corrobore cette hypothèse.
- À la suite de l'analyse par RT-PCR, il y aurait alors environ 4 cas difficilement classifiables pour lesquels le CHU de Québec – Université Laval utilise actuellement, si cela est jugé nécessaire pour clarifier la situation, diverses techniques, dont l'analyse par panel réalisée par des collaborateurs hors du Québec. Bien que les coûts liés à ces techniques soient difficilement quantifiables, ces cas pourraient justifier le recours à une analyse par SNG.
- Le demandeur estime plutôt que 50 à 67 analyses seraient réalisées par SNG annuellement au CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont). Ces projections sont considérées dans les analyses de sensibilité présentées dans les tableaux suivants.
- Selon les données médico administratives consultées concernant la volumétrie et le coût des analyses de translocations pour différents sous-types de sarcomes présentement disponibles par RT-PCR, le coût moyen de ces analyses est évalué à 227 \$.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur pour l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG est de 852,65.

Scénario 1 : Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG en remplacement des analyses effectuées par RT-PCR réalisées au CHU de Québec pour la clientèle desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont). Ce scénario intègre aussi les cas difficilement classifiables suivant la RT-PCR pour l'ensemble du Québec

- Les analyses par RT-PCR réalisées par le CHU de Québec – Université Laval pour la population desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont) seraient maintenant réalisées par le centre demandeur, en plus des 10 % de cas jugés difficilement classifiables pour l'ensemble du Québec.
- Ainsi, il est anticipé que 47 analyses par SNG seraient réalisées dans chacune des trois prochaines années, et ce, considérant que l'analyse par SNG permet de diagnostiquer précisément tous les cas de sarcomes des tissus mous et osseux, sans nécessiter d'autres analyses subséquentes.

Tableau 17 Coûts liés à l'introduction au Répertoire du test permettant l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération (SNG)

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout au Répertoire du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération				
Analyses RT-PCR	39	39	39	117
Coûts	8 853 \$	8 853 \$	8 853 \$	26 559 \$ ^a
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout au Répertoire du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération				
Analyses SNG ^b	47	47	47	141
Coûts	40 075 \$	40 075 \$	40 075 \$	120 225 \$
Impact net	31 222 \$	31 222 \$	31 222 \$	93 665 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			65 693 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			125 390 \$
^a Cela ne considère pas le coût de certaines analyses par FISH ou par IHC ni même des envois hors Québec à des centres collaborateurs pour clarifier les cas difficilement classifiables.				
^b Considère que l'analyse des cas difficilement classifiables du Québec serait réalisée par SNG.				

Scénario 2 : Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG en remplacement des analyses effectuées par RT-PCR pour l'ensemble du Québec

- Dans ce scénario, le remplacement de toutes les analyses effectuées par RT-PCR au Québec est envisagé.
- Ainsi, 117 analyses par SNG seraient réalisées au cours de chacune des trois prochaines années.

Tableau 18 Coûts liés à l'introduction au Répertoire du test permettant l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération (SNG)

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération au Répertoire				
Analyses RT-PCR	117	117	117	351
Coûts	26 559 \$	26 559 \$	26 559 \$	79 677 \$
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération au Répertoire				
Analyse SNG	117	117	117	351
Coûts	99 760 \$	99 760 \$	99 760 \$	299 280 \$
Impact net	73 201 \$	73 201 \$	73 201 \$	219 603 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			187 695 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			281 543 \$

L'ajout du test permettant l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération pourrait générer des coûts

supplémentaires d'environ 94 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années, advenant que l'analyse par SNG soit utilisée en remplacement des analyses de RT-PCR nécessaires pour la population desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont) en plus du 10 % des cas jugés difficilement classifiables suivant une analyse par RT-PCR pour l'ensemble du Québec. Des coûts supplémentaires d'environ 220 000 \$ sur l'ensemble des trois prochaines années sont anticipés si l'analyse est introduite en remplacement de toutes les analyses de RT-PCR effectuées pour le Québec.

Selon le demandeur, l'objectif de cette démarche n'est pas de remplacer les analyses en place, faites avec professionnalisme dans un autre laboratoire du Québec. L'introduction de cette approche remplacera d'abord localement les analyses actuellement réalisées ailleurs au Québec. Le premier scénario semble donc celui préconisé par le demandeur.

Enfin, selon les experts consultés, il n'est pas clair actuellement que l'analyse par SNG permettrait une meilleure prise en charge des patients atteints de sarcomes et pourrait donc influencer les coûts liés à celle-ci.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Selon le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) et le European Sarcoma Network Working Group (ESMO), les résultats des analyses devraient toujours être interprétés selon le contexte clinique et les caractéristiques pathologiques du patient [Casali *et al.*, 2018; Von Mehren *et al.*, 2016]. Pour cette raison, le diagnostic de sarcome devrait être établi par un pathologiste ayant accès à ces analyses supplémentaires.

Les analyses moléculaires peuvent influencer la stratégie de traitement [Italiano *et al.*, 2016]. Notamment, Italiano et ses collaborateurs soulignent que la correction diagnostique a permis à certains patients d'éviter une morbidité associée à une chimiothérapie qui n'était pas nécessaire et certains patients ont, au contraire, pu bénéficier d'un traitement mieux adapté.

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

Aucune recommandation spécifique à la détection de translocations par SNG dans les sarcomes n'a été repérée. Toutefois, des recommandations concernant les analyses moléculaires dans le diagnostic des sarcomes ont été abordées par des organisations savantes.

8.1. National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

Selon le NCCN, la méthode de référence pour le diagnostic des sarcomes des tissus mous se base sur l'examen microscopique de coupes histologiques afin d'établir un diagnostic morphologique de la tumeur [Von Mehren *et al.*, 2016]. L'association reconnaît l'utilité de techniques complémentaires permettant de conforter le diagnostic morphologique (y compris l'immunohistochimie, la cytogénétique, la microscopie électronique et les analyses moléculaires génétiques). Les résultats des analyses devraient toujours être interprétés selon le contexte clinique et les caractéristiques pathologiques du patient. Pour cette raison, le

diagnostic de sarcome devrait être établi par un pathologiste ayant accès à ces analyses supplémentaires.

8.2. European Society for Medical Oncology (ESMO)

Sarcomes des tissus mous et viscéraux

L'ESMO considère également que le diagnostic pathologique des sarcomes des tissus mous se base d'abord sur l'examen morphologique et immunohistochimique [Casali *et al.*, 2018]. Il devrait toutefois être accompagné d'analyses moléculaires lorsque :

- le diagnostic histologique spécifique est douteux;
- la présentation clinique est atypique;
- les résultats des analyses moléculaires peuvent procurer une valeur pronostique et/ou prédictive.

L'ESMO encourage les laboratoires qui offrent les analyses moléculaires à participer à des programmes externes d'assurance de la qualité.

8.3. British Sarcoma Group (BSG)

Sarcomes des tissus mous

Selon le groupe de travail BSG, le diagnostic pathologique des sarcomes des tissus mous repose sur la morphologie et l'immunohistochimie [Dangoor *et al.*, 2016]. Il devrait être complété de plus en plus à la pathologie moléculaire pour confirmer les diagnostics caractérisés par des anomalies génétiques spécifiques telles que des mutations d'activation, des translocations chromosomiques ou des amplifications chromosomiques, à l'aide de techniques telles que le FISH et la RT-PCR. Le diagnostic moléculaire peut être particulièrement utile lorsque la présentation pathologique clinique est atypique ou que le diagnostic histologique est douteux.

Sarcomes osseux

Le groupe de travail BSG recommande une confirmation moléculaire génétique de translocation pour le sarcome d'Ewing, particulièrement si la présentation clinico-pathologique est atypique ou que le diagnostic basé sur l'histologie est douteux [Gerrand *et al.*, 2016]. Un laboratoire de référence pour le diagnostic du sarcome d'Ewing devrait posséder la technologie de FISH et de RT-PCR et participer à un programme externe d'assurance qualité.

8.4. Le Groupe espagnol de recherche en sarcomes (GEIS)

L'utilisation de techniques moléculaires n'est pas nécessaire pour le diagnostic de tous les cas de sarcomes [Garcia del Muro *et al.*, 2016]. Les analyses moléculaires devraient être réalisées surtout lorsque :

- le diagnostic histologique spécifique est douteux;
- la présentation clinico-pathologique est atypique;
- il peut y avoir une pertinence pronostique ou prédictive.

Dans le cas de sarcome des tissus mous, le but de l'étude moléculaire est de détecter la présence de translocations chromosomiques et des réarrangements géniques ou fusions par RT-PCR ou par FISH.

8.5. Le Forum dermatologique européen (EDF), l'Association européenne de dermato-oncologie (EADO) et l'Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer (EORTC)

Recommandations pour le diagnostic du dermatofibrosarcome

Un consensus d'associations recommande que tous les cas présumés de dermatofibrosarcome protuberans soient confirmés par les marquages immunohistochimiques appropriés (CD34, facteur XIIIa et stromelysine-3) [Saiag *et al.*, 2015]. Selon ce groupe, la détection de translocations chromosomiques et de transcrits de fusions géniques par FISH et par RT-PCR à partir d'échantillons de tissus FFPE est utile pour confirmer les cas de diagnostics difficiles.

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG

La recommandation de l'INESSS

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

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'INESSS reconnaît l'utilité clinique de cette analyse qui a le potentiel d'apporter une précision diagnostique dans un contexte de tumeurs complexes difficiles à classer. Il reconnaît également un gain potentiel d'efficacité permettant de raccourcir le temps requis pour obtenir un diagnostic final.
- ✓ Étant donné l'ampleur du panel de gènes compris dans l'analyse, l'INESSS recommande de rapporter uniquement les résultats de translocations jugés pertinents pour le diagnostic établi par le pathologiste.
- ✓ Les données de validation analytique ont été jugées suffisantes.

ANNEXE A

Algorithme de traitement des échantillons cliniques proposé par le demandeur

Le demandeur précise que l'algorithme proposé est basé sur les recommandations de l'ESMO et du NCCN [Casali *et al.*, 2018; Von Mehren *et al.*, 2016].

Étape 1 : Réception et révision de la demande d'envoi d'analyse moléculaire

Toute demande accompagnée d'un rapport de pathologie complété sera acceptée s'il est jugé justifié de rechercher une translocation chromosomique par technologie SNG, dans le but de confirmer un diagnostic présomptif de sarcome associé à une translocation chromosomique ou d'y exclure d'un diagnostic différentiel.

Étape 2 : Réception du spécimen et révision du bloc de tissu paraffiné ou tissu frais

Dans un premier temps, une coupe du bloc de tissu reçu sera révisée par un pathologiste afin de confirmer et quantifier globalement le pourcentage de tissu sarcomateux présent. Si le spécimen est jugé inadéquat, la poursuite de l'analyse moléculaire sera avortée et une demande de nouveau spécimen sera envoyée au requérant. Si le spécimen est jugé adéquat, les coupes en ruban seront effectuées par le pathologiste.

Étape 3 : Extraction de l'ARN et génération de la librairie grâce au panel de fusion ARN TruSight^{MC} d'Illumina

Durant cette étape, la qualité de l'ARN extrait sera analysée et, advenant un échantillon sous-optimal, l'étape d'extraction d'ARN sera répétée.

Étape 4 : Recherche de la présence de translocation par SNG à partir de la librairie générée à l'étape 3

Étape 5 : Interprétation des résultats

La détection des fusions s'effectuera à l'aide des outils bio-informatiques Local Run Manager d'Illumina et JAFFA. De plus, la confirmation des fusions sera effectuée manuellement à l'aide du logiciel BLAST. Finalement, l'association entre la fusion trouvée et les fusions connues comme étant liées aux cas de sarcomes sera effectuée grâce à une recherche dans les bases de données spécifiques.

Étape 6 : Validation des résultats

La qualité de l'analyse sera validée par l'utilisation concomitante d'un algorithme de contrôle de qualité (voir figure 2). Si le spécimen analysé remplit les critères définis de qualité, toute fusion détectée sera donc considérée comme valide. Si le spécimen analysé ne remplit pas les critères de qualité définis, toute fusion sera donc invalidée et l'analyse aura conséquemment échoué.

De plus, durant la période d'implantation et de validation de cette nouvelle technologie, une étape supplémentaire de validation serait effectuée par la confirmation de toute fusion (attendue ou nouvelle) exécutée par une méthode alternative (RT-PCR).

Étape 7 : En présence de concordance, délivrance et validation du rapport final

Dans le cas de la détection d'une translocation connue :

Le résultat du transcrit de fusion apparaîtra sur le rapport d'analyse. Celui-ci sera accompagné d'une interprétation clinique qui énoncera que la présence de la translocation détectée permet d'appuyer un diagnostic d'un sous-type de sarcome. Prenons pour exemple la translocation *EWSR1-ATF1*; sa présence peut appuyer un diagnostic de sarcome à cellules claires, d'histiocytome fibreux angiomatoïde ou de myoépithéliome. Ce résultat serait donc à interpréter à la lumière de l'analyse morphologique et immunohistochimique de même que selon le contexte clinique.

Dans le cas de la détection d'une translocation inconnue :

L'interprétation clinique va dépendre du type de translocation découverte. Dans le cas d'un nouveau partenaire d'un gène déjà connu pour être réarrangé dans les sarcomes (par exemple, *EWSR1*), le résultat du transcrit de fusion apparaîtra sur le rapport d'analyse avec une mention spéciale. Celui-ci indiquera la découverte d'une nouvelle translocation avec un gène connu pour être réarrangé dans certains sous-types de sarcomes, mais avec un partenaire inédit. Ce résultat sera donc à interpréter à la lumière de l'analyse morphologique et immunohistochimique de même que le contexte clinique.

Dans le cas d'une découverte de translocation impliquant deux gènes inconnus pour être réarrangés en sarcome, le résultat du transcrit de fusion n'apparaîtra pas dans le rapport. Il serait plutôt mentionné dans le rapport, qu'aucune des translocations connues en sarcome et couvertes par le panel n'a été documentée. Ces découvertes inédites seront colligées et confrontées de façon périodique à la littérature. Si, dans les années qui suivent, certaines de ces nouvelles translocations sont validées, un addendum au rapport original émis sera alors envoyé au requérant.

Dans le cas d'absence de détection d'une translocation connue :

Durant la période d'implantation et de validation de cette analyse, nous demanderons à ce que tout échantillon présentant une absence de détection de fusion par SNG soit testé par une approche conventionnelle de RT-PCR par les centres externes offrant l'analyse de la fusion suspectée (Hôtel-Dieu de Québec ou Hôpital Sainte-Justine) afin d'éliminer les faux-négatifs.

L'énoncé d'absence de translocation détectable sera accompagné d'un énoncé sur la qualité du spécimen analysé, de même que la conformité aux standards de qualité pour l'échantillon analysé.

En aucun temps l'absence de translocation ne permettra de confirmer le diagnostic d'un sous-type particulier de sarcome. Toutefois, cela sera toujours à corroborer avec l'ensemble des données morphologiques, immunohistochimiques et cliniques.

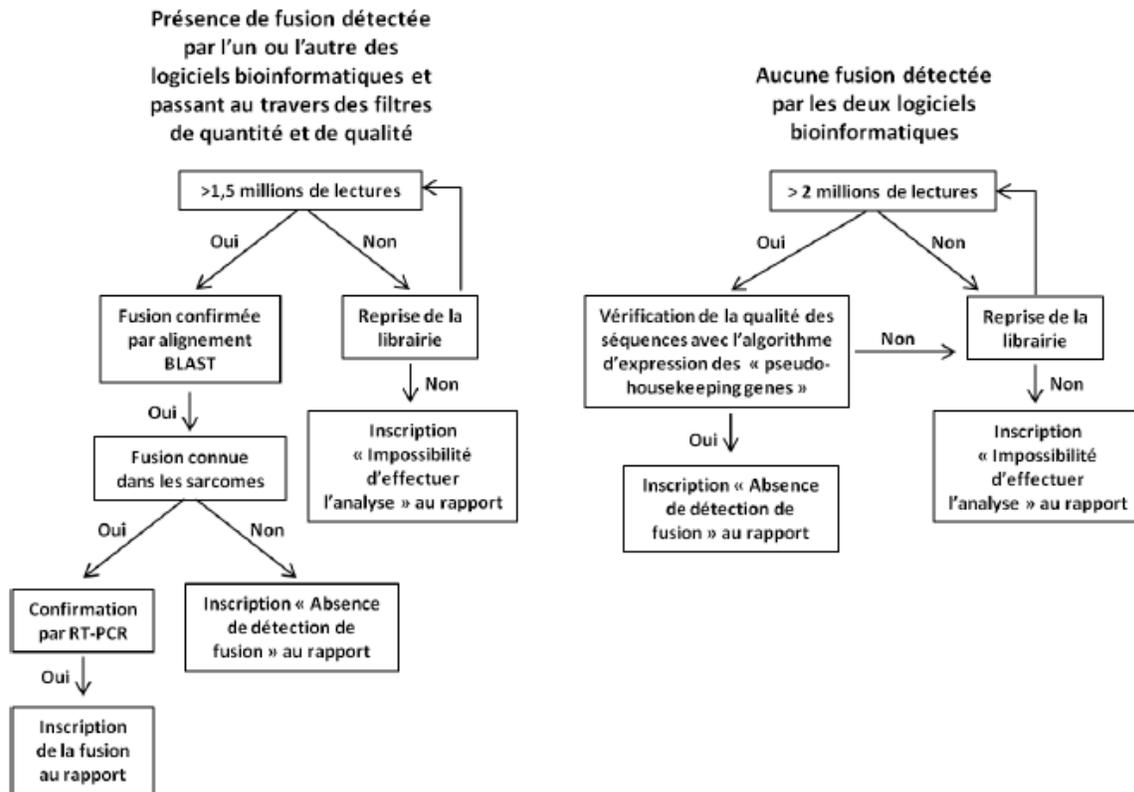


Figure 2 Algorithme de prise de décisions basé sur les analyses bioinformatiques

ANNEXE B

Principales translocations associées aux sarcomes

SOUS-TYPE	FUSION
Rhabdomyosarcome alvéolaire	PAX3-FOXO1, PAX7-FOXO1, PAX3-NCOA1, PAX3-AFX
Sarcome alvéolaire des parties molles	TFE3-ASPSCR1*
Sarcome avec réarrangement <i>BCOR</i>	BCOR-CCNB3, BCOR-MAML3, ZC3H7B-BCOR
Sarcome avec réarrangement <i>CIC</i>	CIC-DUX4, CIC-FOXO4
Sarcome à cellules claires	EWSR1-ATF1*, CREB1-EWSR1
Tumeur desmoplastique à cellules rondes	EWSR1-WT1
Dermatofibrosarcome protuberans	COL1A1-PDGFB
Sarcome du stroma endométrial de bas grade	JAZF1-SUZ12, PHF1-JAZF1, EPC1-PHF1, MEAF6-PHF1, MBTD1-CXorf67
Sarcome du stroma endométrial de haut grade	YWHAE-NUTM2, ZC3H7B-BCOR
Hémangioendothéliome épithélioïde	WWTR1-CAMTA1, YAP1-TFE3
Sarcome d'Ewing	EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-FEV, EWSR1-ETV1, EWSR1-E1AF, EWSR1-ZSG, FUS-ERG*, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV4, EWSR1-POU5F1, EWSR1-PATZ1, EWSR1-SP3, EWSR1-NFATC2, FUS-FEV, BRD4-NUT*
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	EWSR1-NR4A3, TAF2N-NR4A3, TCF12-NR4A3, TFG-NR4A3, RBP56-NR4A3
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	TPM3-ALK*, TPM4-ALK, CLTC-ALK*, RANBP2-ALK, ATIC-ALK*, CARS-ALK, SEC31L1-ALK, PPFIBP1-ALK, TFG-ROS1, YWHAE-ROS1, TGFBR3-MGEA5
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	FUS-CREB3L2, FUS-CREB3L1
Chondrosarcome mésenchymateux	HEY1-NCOA2
Liposarcome myxoïde	<i>FUS-DDIT3, EWSR1-DDIT3</i>
Hémangioendothéliome pseudomyogénique	SERPINE1-FOSB
Histiocytome fibreux angiomatoïde	FUS-ATF1, EWSR1-ATF1*, EWSR1-CREB1*
Myoépithéliome	EWSR1-POU5F1, EWSR1-ZNF444, EWSR1-PBX1
Fibrosarcome épithélioïde sclérosant	FUS-CREB3L2, EWSR1-CREB3L1, FUS-CREB3L1
Fibrosarcome infantile	ETV6-NTRK3*
Tumeur solitaire fibreuse	NAB2-STAT6
Sarcome synovial	SS18-SSX1/SSX2/SSX4
Sarcome myxoïde pulmonaire primaire	EWSR1-CREB1

Adapté de Al-Zaid *et al.*, 2017 et Schaefer *et al.*, 2018.

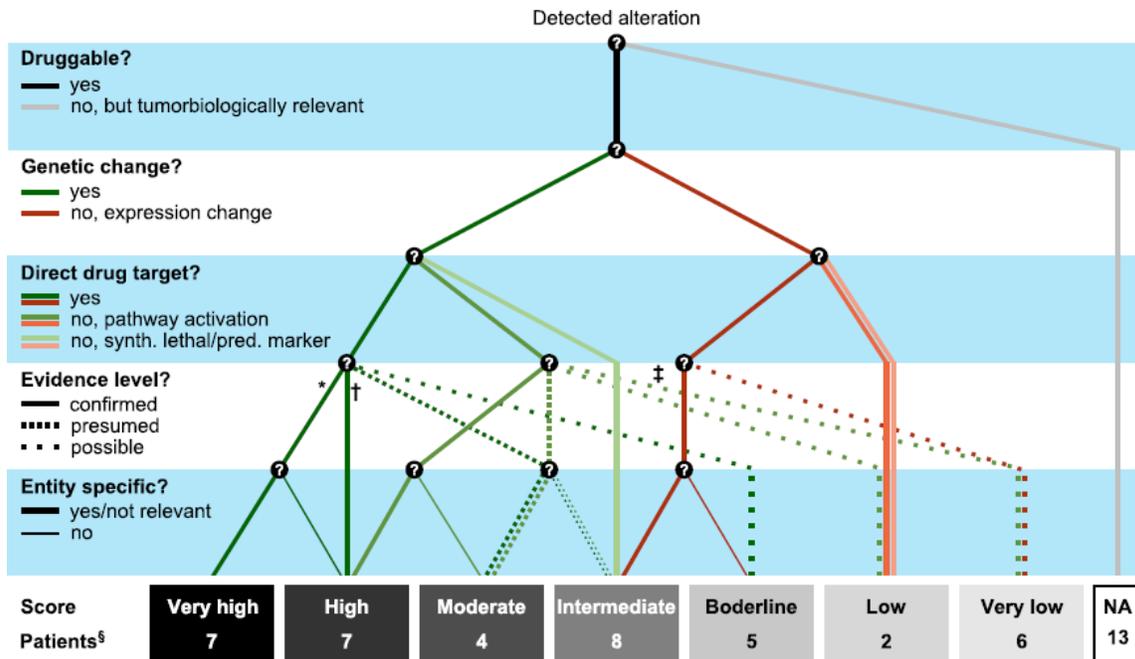
* Ces fusions sont observées dans plusieurs types histologiques de tumeurs et ne sont donc pas spécifiques à un certain type de tumeur ni même à un sarcome.

ANNEXE C

Caractérisation des cibles moléculaires actionnables ou à prioriser selon les études

ÉTUDE	ANOMALIE ACTIONNABLE
Lucchesi <i>et al.</i> , 2018	<ol style="list-style-type: none"> 1) Anomalies associées à des médicaments anticancers approuvés. 2) Biomarqueurs de soins standards prédicteurs de réponse à des médicaments non approuvés pour le traitement de sarcomes. 3) Anomalies associées à des évidences cliniques probantes de valeur prédictive (sans être un biomarqueur ou un médicament de soins standards approuvé). 4) Anomalie associée à des évidences biologiques probantes de valeur prédictive (sans être un biomarqueur ou un médicament de soins standards approuvé).
Harttrampf <i>et al.</i> , 2017	Une anomalie actionnable réfère à une anomalie moléculaire ou un sentier de signalisation dans la tumeur du patient et/ou une analyse germinale qui pourrait théoriquement être ciblée par un médicament approuvé ou un agent (dans toute phase de développement clinique) agissant de manière directe ou indirecte sur le sentier impliqué.
Cote <i>et al.</i> , 2018	Les anomalies testables ou actionnables ont été définies comme celles qui pourraient être acceptables à l'admissibilité dans une étude clinique récente ou en cours.
Pincez <i>et al.</i> , 2017	Anomalie moléculaire dans un gène pathogénique (ou présumément pathogénique) pouvant être ciblé.
Oberg <i>et al.</i> , 2016	<ol style="list-style-type: none"> 1) Un médicament approuvé par la FDA ou un médicament expérimental, capable d'inhiber la cible ou des cibles en aval dans le sentier de signalisation, était offert. 2) Il y a des évidences précliniques qui appuient la possibilité de cibler efficacement la fonction anormale du gène muté et/ou qui appuient la possibilité d'un bénéfice clinique. 3) De l'information est donnée sur le dosage approprié selon l'âge.
Chang <i>et al.</i> , 2016	<ol style="list-style-type: none"> 1) Une mutation de la lignée germinale, y compris une mutation non-sens ou une insertion-délétion avec un changement de cadre de lecture, d'un gène consensus de cancer ou pathogénique, ou probablement pathogénique, selon le American College of Medical Genetics (ACMG). 2) Les anomalies génomiques qui ont mené à un changement du diagnostic du patient. 3) Un évènement somatique (y compris un changement de nucléotide unique, une insertion-délétion, une amplification, une délétion ou un gène de fusion) qui peut être ciblé ou pour lequel le patient peut être traité avec un médicament approuvé par la FDA ou dans le contexte d'un essai clinique selon les critères NCI-<i>adult</i> MATCH-<i>Criteria</i>.
Mody <i>et al.</i> , 2015	Toute anomalie génomique révélée par l'analyse de séquençage pouvant mener à 1) un changement de la prise en charge du patient par la détection d'une anomalie moléculaire pouvant être ciblée, 2) un changement du diagnostic ou de la stratification pronostique, ou 3) la détection d'anomalies germinales liées au cancer, procurant de l'information concernant les risques potentiels de divers cancers chez les patients ou les apparentés.

Abréviation : FDA : De l'anglais *Food and Drug Administration*.



Source : Worst *et al.*, 2016.

Figure 2 Algorithme de priorisation des cibles thérapeutiques chez des patients pédiatriques à risque élevé de récurrence ou de tumeurs réfractaires

Pour l'étude de Worst et ses collaborateurs [2016], un panel d'expert a priorisé les cibles potentielles à transmettre au médecin traitant pour la prise de décision clinique sur une base individuelle.

Le score de priorisation des patients se basait sur l'existence d'un médicament associé à l'anomalie génomique détectée, la présence d'un changement génétique, l'existence d'un médicament ciblant directement l'anomalie génomique, le niveau de preuves et la spécificité.

ANNEXE D

Description des études retenues

<p>Lam [2018]</p>	<p>Période de recherche : 2004 à 2015 (14 échantillons) Janvier 2016 à septembre 2017 (67 échantillons)</p> <p>Nombre de patients : 81 échantillons patients</p> <p>Buts : Évaluer l'applicabilité d'un SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex (<i>AMP-based targeted NGS</i>) pour la détection de translocations dans les tumeurs osseuses et des tissus mous lors du diagnostic de routine.</p> <p>Primaire : Les résultats obtenus par SNG ont ensuite été comparés à ceux obtenus par un FISH conventionnel et par la RT-PCR, et par immunohistochimie lorsque possible.</p>	<p>Population cible : Patients présentant une tumeur osseuse ou des tissus mous.</p> <p>Méthodes : Les résultats de détection de translocations dans des tumeurs osseuses et des tissus mous, obtenus par une méthode de SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex (trousse Archer FusionPlex Sarcoma^{MC}, comprenant un panel de 26 gènes), ont été évalués et comparés aux techniques de FISH et de RT-PCR.</p>	<p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sur 58 de 81 échantillons (72 %), une analyse moléculaire alternative a été effectuée : <ul style="list-style-type: none"> ▪ FISH (n = 55); ▪ RT-PCR (n = 1); ▪ FISH et RT-PCR (n = 2) - Dans 16 cas, une analyse d'immunohistochimie a été utilisée afin de procurer de l'information supplémentaire sur la présence ou l'absence de translocations. - Dans les 7 autres cas, aucune analyse supplémentaire n'a pu être effectuée. <p><u>Cas concordants</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Une concordance entre la méthode SNG et une méthode de référence (FISH, RT-PCR ou les deux) a été observée dans 25 cas. - Dans un cas, la technique de SNG a permis d'identifier le gène <i>PBX1</i> comme partenaire de fusion du gène <i>EWSR1</i>, ce qui a mené à changer le diagnostic de sarcome d'Ewing en diagnostic de carcinome myoépithélial. <p><u>Cas non concordants</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Des résultats non concordants entre la méthode de SNG et une méthode de référence (FISH, RT-PCR ou les deux) ont été observés dans 5 cas (4 cas de FISH et 1 cas de RT-PCR). Ces cas ont été analysés par une troisième méthode indépendante. ▪ CAS 1 : L'analyse par SNG a révélé une fusion COL1A1-PDGFB dans un cas soupçonné de dermatofibrosarcome protuberans, pour lequel les
--------------------------	---	--	---

			<p>sondes de FISH commerciales n'avaient pas permis de détecter cette fusion. L'utilisation de nouvelles sondes de FISH et d'amorces de RT-PCR a confirmé les résultats de SNG.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ CAS 2 : Dans un cas dont la morphologie et les résultats d'immunohistochimie étaient indicatifs d'un sarcome d'Ewing, mais dont les résultats du FISH avec des sondes de point de bris pour EWSR1 étaient difficiles à interpréter, le SNG a montré la présence d'une fusion EWSR1-ERG confirmant le diagnostic. Subséquemment, la synthèse de nouvelles sondes a permis la confirmation de la fusion par FISH. De plus, l'analyse par immunohistochimie était positive pour ERG. ▪ CAS 3 : Un cas présumé de sarcome d'Ewing négatif par FISH a été confirmé en SNG par la détection de la fusion EWSR1-FL1. L'utilisation de sondes rapprochées pour EWSR1 et de sondes de colocalisation ont permis de confirmer les résultats du SNG dans un deuxième temps. ▪ CAS 4 : Dans un cas dont la morphologie et l'analyse immunohistochimique étaient indicatives d'un sarcome d'Ewing et pour lequel un bris du gène EWSR1 avait été détecté par FISH, l'analyse par la RT-PCR demeurait négative. L'analyse par SNG a révélé une fusion EWSR1-FL1 plus rare (fusion de l'exon 10 du gène EWSR1 à l'exon 5 du gène FL1). La synthèse de nouvelles amorces basées sur la séquence de la fusion détectée par SNG a permis de confirmer la présence de la fusion par RT-PCR et par un séquençage de Sanger ensuite. ▪ CAS 5 : Chez une patiente dont un chondrosarcome myxoïde extrasquelettique et un carcinome myoépithélial faisaient partie du diagnostic différentiel, aucune fusion n'a été détectée par SNG, alors qu'une fusion impliquant le gène EWSR1 avait été révélée par FISH. <p>- Dans 5 des 11 cas où l'analyse par SNG n'a détecté aucune fusion, une fusion détectée par FISH</p>
--	--	--	---

			<p>suggère que, pour les échantillons de faible qualité, l'utilisation du FISH pourrait être préférable.</p> <p>Conclusions :</p> <p>Les auteurs ont observé un taux d'échec de 14 % associé à l'approche SNG ciblée utilisée, pouvant s'expliquer par le processus de décalcification ou de fixation de certains échantillons. De plus, puisque la technique utilise des amplicons de taille relativement petite, il est difficile de faire la distinction entre des gènes homologues avec un degré d'identité élevé.</p> <p>Les auteurs ont conclu que l'analyse de SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex démontrerait des résultats supérieurs aux techniques de FISH et de RT-PCR tant que tous les critères de qualité sont remplis dans les cas négatifs pour une fusion.</p>
<p>Italiano [2016]</p> <p>France</p> <p>Étude observationnelle prospective multicentrique</p>	<p>Période de recherche :</p> <p>22 juin 2009 au 30 octobre 2012</p> <p>Nombre de patients :</p> <p>384</p> <p>Buts :</p> <p>Primaire :</p> <p>Évaluer les effets cliniques d'une implantation systématique d'analyses moléculaires pour améliorer les erreurs diagnostiques de sarcomes.</p> <p>Secondaire :</p> <p>Évaluer la différence des effets de la</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Disponibilité d'un échantillon de tissu à partir d'une biopsie ou d'une résection chirurgicale; - Suspicion de dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand, de liposarcome dédifférencié, de sarcome d'Ewing, de sarcome synovial, de rhabdomyosarcome alvéolaire ou de liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes. Le diagnostic a été établi selon la classification des tumeurs de l'Organisation mondiale de la Santé; - Un examen par un pathologiste spécialisé en sarcomes; 	<p>Résultats :</p> <p><u>Diagnostic :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Le diagnostic a été catégorisé comme certain par le pathologiste dans 166/384 cas (43 %), et une anomalie moléculaire spécifique a été détectée dans 157/166 (94 %) cas avec un diagnostic morphologique considéré comme certain. Dans 9 de ces cas, le résultat de l'analyse moléculaire contredisait le diagnostic du pathologiste. - Le diagnostic a été catégorisé comme probable dans 129/384 (34 %) des cas. L'analyse moléculaire était négative dans 38/129 (29 %) des cas pour lesquels le diagnostic final a été modifié et 35 d'entre eux ont été corrigés. Dans 2 cas, le pathologiste a maintenu le diagnostic de l'analyse histologique en se basant sur la présentation typique de ces tumeurs. - Des résultats préliminaires suggèrent que la sensibilité et la spécificité ne sont pas très différentes entre les échantillons provenant de tissus congelés et fixés au formaldéhyde et paraffinés. Seule une légère

	<p>détection d'anomalies génétiques sur le diagnostic de sarcomes entre les échantillons provenant de tissus congelés et fixés au formaldéhyde et enrobés de paraffine.</p> <p>Contexte :</p> <p>Des progrès dans le domaine de la génétique moléculaire des sarcomes ont permis l'identification d'anomalies spécifiques à certains types de sarcomes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Disponibilité de tissu congelé (hormis un patient de la cohorte 1 puisque l'analyse de détection de CD34 par immunohistochimie requérait un échantillon fixé au formaldéhyde et enrobé de paraffine); - Informations sur le patient et accès au dossier; - Un diagnostic final a été établi en fonction du contexte clinique, de l'histologie, de l'immunohistochimie et des résultats des analyses moléculaires; - La méthode de référence pour le diagnostic moléculaire du dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand était le marquage de CD34 en immunohistochimie, l'hybridation génomique comparative pour le liposarcome différencié et la RT-PCR pour le sarcome d'Ewing, le sarcome synovial, le rhabdomyosarcome alvéolaire et le liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes. Les méthodes innovatives étaient le FISH, la détection de translocations (toutes les cohortes sauf la cohorte 2), l'amplification de <i>MDM2</i> (cohorte 2), la PCR quantitative (cohorte 2) et la RT-PCR (cohortes 3 à 6). 	<p>différence a été notée dans le cas des sarcomes d'Ewing (cohorte 3).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dans 89/384 (23 %) des cas, le diagnostic a été catégorisé comme possible. L'analyse moléculaire était négative dans 69/89 (78 %) des cas. - Le diagnostic a été corrigé suite à l'examen des résultats des analyses moléculaires effectuées sur 53/384 (13,8 %) patients. - La correction du diagnostic initial a eu une influence sur l'évaluation pronostique ou la prise en charge du patient dans 45/53 (84,5 %) cas. <p>Conclusions :</p> <p>Des analyses moléculaires devraient être effectuées de façon systématique pour la précision diagnostique des sarcomes et pour une prise en charge adéquate, et ce, même lorsque le diagnostic histologique est établi par un pathologiste expert dans le domaine.</p> <p>Les résultats de l'étude montrent que, même lorsque les sarcomes sont évalués par des pathologistes experts, les analyses moléculaires génétiques peuvent procurer des données supplémentaires et indépendantes.</p> <p>Les effets des résultats des analyses génétiques sur la stratégie de traitement étaient très importants.</p> <p>Les résultats des analyses génétiques doivent être interprétés et considérés avec la morphologie de la tumeur. Aucune des analyses moléculaires ne possède seule une spécificité absolue.</p> <p>Les résultats de l'étude montrent les limites de l'approche purement morphologique qui peut occasionner une erreur de diagnostic dans certains cas (jusqu'à 23 % des cas).</p> <p>Limites :</p>
--	--	--	--

		<p>Population cible :</p> <p>Patient ayant été biopsié ou ayant subi une résection chirurgicale pour un diagnostic (ou suspicion) de sarcome et ayant été référé par un des 32 centres du <i>French Sarcoma Group/Reference Network in Pathology of Sarcomas</i>.</p> <p>Méthodes :</p> <p>6 cohortes :</p> <p>1- dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand (n = 50)</p> <p>2- liposarcome dédifférencié (n = 30)</p> <p>3- sarcome d'Ewing (n = 112)</p> <p>4- sarcome synovial (n = 97)</p> <p>5- rhabdomyosarcome alvéolaire (n = 46)</p> <p>6- liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes (n = 49)</p> <p>- Les biopsies ont été examinées par un pathologiste spécialisé en sarcomes, qui a établi un diagnostic primaire accompagné d'un ou de deux diagnostics différentiels (basé uniquement sur l'examen histologique).</p> <p>- Une analyse moléculaire a été effectuée par FISH (pour chacun des cas sur des tissus enrobés de paraffine), par hybridation génomique</p>	<p>Une amélioration du diagnostic ne garantit pas une prédiction plus fiable de la survie que celle établie uniquement sur le diagnostic histologique. Cet aspect doit être évalué au moyen d'une étude randomisée comparant les 2 méthodes diagnostiques (examen histologique et examen histologique avec analyses génétiques). Ce type d'étude serait difficile à implanter.</p> <p>La classification basée sur la morphologie (certain, probable ou possible), avant les analyses moléculaires, peut être subjective. Toutefois, il s'agit d'une classification pratique du degré de certitude du diagnostic, utilisée dans la pratique clinique et reflétant la difficulté de classification d'un histotype donné.</p>
--	--	--	--

		<p>comparative et par PCR quantitative (cohorte 2) ou RT-PCR (sur des échantillons de tissus congelés ou fixés enrobés de paraffine, cohorte 3 à 6).</p> <p>- Un diagnostic final a été établi selon les résultats des analyses moléculaires.</p> <p>- Les effets cliniques des corrections diagnostiques ont été évalués par un groupe d'experts.</p>	
<p>Lucchesi [2018] France Étude transversale</p>	<p>Nombre de patients : 584</p> <p>But :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caractériser les modifications génomiques pouvant être ciblées chez les patients atteints de sarcome des tissus mous. - Déterminer comment les cibles thérapeutiques identifiées dans le génome peuvent être utilisées pour guider le traitement personnalisé et ciblé des patients atteints de sarcome des tissus mous. 	<p>Population cible :</p> <p>Les patients atteints de sarcome des tissus mous.</p> <p>Exclusions :</p> <p>Tumeur desmoïde/fibromatose, myoépithéliome des tissus mous, sarcome de cellules dendritiques histiocytaires, sarcome de cellules dendritiques folliculaires, tumeur myofibroblastique inflammatoire, tumeur fibromyxoïde ossifiante, hémangiome, tumeur ténosynoviale à cellules géantes et myofibrome.</p> <p>Méthodes :</p> <p>Les sarcomes ont été divisés en 3 catégories :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sarcomes à génomes complexes (anomalies 	<p>Résultats :</p> <p>Caractéristiques des patients (sarcomes) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 294 (50,3 %) hommes; - 290 (49,7 %) femmes; - Âge médian de 56 ans (18 à 89 ans); - Caryotype complexe : 331 (57 %); - Sarcomes associés aux translocations : 144 (25 %); - Autres (mutation inactivatrice, amplicon simple) : 112 (19 %); - Le groupe « autres sarcomes » est le groupe qui compte le plus de modifications et celui des sarcomes associés aux translocations comptait le moins de mutations (90,8 % contre 77,8 %, $p < 0,10$ par test du χ^2). <p>Résultats du séquençage de nouvelle génération :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 697 modifications relevées dans 451 gènes (1 154 substitutions, 765 amplifications, 364 courtes insertions ou délétions et variantes d'épissage,

		<p>caryotypiques complexes sans patron spécifique);</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sarcomes associés aux translocations résultant en transcrit de fusion oncogénique; - Autres sarcomes : sarcomes sans mutations oncogéniques spécifiques ou amplifications récurrentes. <p>Les modifications génomiques ont été classées ainsi :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les modifications associées à des médicaments anticancers en sarcomes; - Des biomarqueurs prédicteurs de réponse aux médicaments non approuvés pour le traitement des patients avec sarcomes avec les soins standards; - Des modifications associées à des preuves cliniques convaincantes de valeur prédictive, mais n'étant pas considérées, comme un biomarqueur ou un médicament de soins standards; - Modifications associées à des preuves biologiques convaincantes de valeur prédictive, mais n'étant pas considérées comme un biomarqueur ou un 	<p>346 délétions homozygotes et 68 réarrangements géniques);</p> <ul style="list-style-type: none"> - Médiane de modification génomique : 4 (1 à 53) par cas. <p>Anomalies génomiques pouvant être ciblées :</p> <p>Au moins une anomalie génomique pouvant être ciblée a été détectée dans 239 cas (41 %).</p> <p>Un nombre significativement plus élevé d'anomalies génomiques pouvant être ciblées a été observé dans les sarcomes à génome complexe ou autre, comparativement aux sarcomes associés aux translocations (complexe : n = 131, autre : n = 89, translocations : n = 19, p < 0,001 par Chi²).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le nombre de translocations pouvant être ciblées dans les 10 principaux sous-types histologiques de sarcomes des tissus mous est de 2/308 (0,65 %). - Au moins 1 anomalie cliniquement pertinente susceptible de guider la décision d'un traitement ciblé a été relevée dans 239 de 585 cas (41 %) : <ul style="list-style-type: none"> ▪ 132/331 (40 %) sarcomes à caryotype complexe; ▪ 19/144 (13 %) des sarcomes associés aux translocations; ▪ 89/109 (82 %) des autres sarcomes; ▪ test de Chi² p < 0,001. <p>Conclusions :</p> <p>Jusqu'à 41 % des sarcomes des tissus mous possédait au moins une anomalie génomique pertinente cliniquement avec un potentiel d'influencer et de personnaliser le traitement.</p> <p>Le profilage génomique compréhensif peut déterminer de nouveaux paradigmes de traitement et améliorer la stratification pronostique des patients présentant un sarcome des tissus mous.</p>
--	--	--	---

		<p>médicament de soins standards.</p> <p>Paramètres : Présence d'une modification génomique pouvant être ciblée dans les sarcomes des tissus mous.</p>	
<p>Neuville [2013]</p> <p>Europe</p> <p>Étude de cohorte multicentrique</p>	<p>Période de recherche : 2 ans (2005-2006 pour Rhône Alpes et 2006-2007 pour Aquitaine et Veneto).</p> <p>Nombre de patients : 763 sarcomes.</p> <p>But : Évaluer l'impact diagnostic des analyses moléculaires de sarcomes dans une série épidémiologique (tous les nouveaux cas de sarcomes diagnostiqués dans une population et une période définie).</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <p>1) Tous les nouveaux cas de sarcome des tissus mous ou viscéraux selon la classification de l'Organisation mondiale de la Santé de 2012 (y compris les sarcomes et les tumeurs malignes intermédiaires à potentiel métastatique, tumeurs lipomateuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés tels que le dermatofibrosarcome protuberans ou le syndrome de Kaposi et les tumeurs stromales gastro-intestinales [TSGI]).</p> <p>2) Les cas diagnostiqués comme des cancers primaires au cours d'une période d'étude de 2 ans, même lorsqu'une métastase distale était présente au moment du diagnostic initial.</p> <p>3) Les cas impliquant des patients des deux sexes et de tout âge, résidant dans une des 3 régions suivantes : Rhône Alpes (France), Aquitaine (France) ou Veneto</p>	<p>Résultats :</p> <p>Il y avait 286 sur 1 484 cas de translocations soupçonnés (19 %).</p> <p>Une analyse moléculaire a été réalisée sur 248 cas, dont 153 étaient positifs (62 %), 83 négatifs (33 %) et 12 ont conduit à des résultats non interprétables (5 %).</p> <p><u>Translocations :</u></p> <p>Dans 116 cas, le diagnostic était considéré comme certain d'après le contexte clinique, l'histologie et les résultats d'immunohistochimie, avant d'entamer l'analyse moléculaire. Ces cas étaient principalement des dermatofibrosarcomes protubérans (86 cas), des liposarcomes myxoïdes ou à cellules rondes (18 cas) ou des tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les résultats des analyses moléculaires étaient positifs dans 72 cas sur 84 (86 %) lorsque le diagnostic initial était certain. - Lorsque le diagnostic initial était considéré comme probable, l'analyse moléculaire confirmait 62 cas sur 75, mais éliminait 12 cas (16 %, pour lesquels le diagnostic final était modifié). - L'analyse moléculaire a permis le diagnostic d'un sarcome avec translocation spécifique dans 19 cas sur 89 (21 %) lorsque le diagnostic initial d'un sarcome avec translocation était considéré comme possible seulement.

		<p>(Italie) (couvre une population de 13 millions).</p> <p>Exclusions :</p> <p>Tumeurs osseuses primaires.</p> <p>Méthodes :</p> <p>Un diagnostic prémoléculaire a été posé dans chacun des cas suspectés de lésion génétique spécifique, d'après le contexte clinique, histologique et l'immunohistochimie selon 3 niveaux de certitude :</p> <ul style="list-style-type: none"> - certain : lorsqu'un seul diagnostic est possible - probable : premier diagnostic envisagé, mais avec un diagnostic différentiel possible pour une autre tumeur. - possible : lorsque le diagnostic n'était pas le premier considéré. <p>Le diagnostic final était basé sur le contexte clinique, histologique et immunohistochimique, et sur les résultats des analyses moléculaires, le cas échéant.</p> <p><u>Analyses moléculaires :</u></p> <p>Sur des tissus enrobés de paraffine ou frais et congelés.</p> <p>TSGI : mutations de KIT et de PDGFRA</p> <p>Translocations (RT-PCR et/ou FISH) : tumeur neuroectodermique</p>	<p>- Dans cette série, une analyse moléculaire était nécessaire dans 31 cas (12 % des cas avec analyse moléculaire) pour atteindre le bon diagnostic de ces sarcomes avec translocation suspectée.</p> <p>Conclusions :</p> <p>Cette étude démontre l'impact des analyses moléculaires sur le diagnostic final de sarcomes et favorise ce type d'analyse sur toute tumeur soupçonnée de comporter une anomalie génomique spécifique et pour laquelle le diagnostic est incertain.</p> <p>Limites :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les analyses moléculaires ont un intérêt limité pour les TSGI puisque DOG1 sert de marqueur. La recherche de mutation est utile pour prédire la réponse à l'imatinib puisque des mutations comme PDGFRA D842V procurent une résistance à cet agent, selon les lignes directrices de l'ESMO. - 5 à 10 % des analyses moléculaires étaient non interprétables. En outre, le fait qu'un résultat soit négatif à l'analyse moléculaire ne permet pas d'infirmer le diagnostic.
--	--	--	--

		<p>périphérique, sarcome synovial, liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes, rhabdomyosarcome alvéolaire, sarcome fibromyxoïde de bas grade, tumeur desmoplastique à petites cellules rondes et dermatofibrosarcome protuberans (FISH seulement).</p> <p>Amplification de MDM2 pour les tumeurs lipomateuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés (FISH).</p>	
<p>Harttrampf [2017] France</p> <p>Étude clinique prospective unicentrique non randomisée (MOSCAT-01, NCT01566019)</p>	<p>Période de recherche : Décembre 2012 à janvier 2016</p> <p>Nombre de patients : 73</p> <p>But : Caractériser les anomalies génomiques dans les tumeurs solides récurrentes ou réfractaires de patients pédiatriques afin de sélectionner un traitement ciblé. Montrer que l'application clinique d'une approche génomique à haut débit mène à une amélioration de la situation clinique des patients atteints de cancer métastatique.</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enfants âgés de plus de 6 mois; - Patients ayant reçu au moins une première ligne de traitement; - Espérance de vie de plus de 3 mois; - Échelle de performance du <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> (ECOG) de 0/1 ou de l'échelle de jeu de Lansky ≥ 70 %; - Fonctionnement adéquat de la moelle osseuse et des organes. <p>Population cible : Les patients pédiatriques présentant une tumeur solide incurable, récurrente ou résistante.</p>	<p>Résultats :</p> <p><u>Données démographiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Âge médian de 10,9 ans (0,8 à 24,3 ans), 11 patients (15,1 %) étaient âgés de 18 ans ou plus au moment de l'inscription à l'étude. - La performance médiane était de 90 % à l'échelle de jeu de Lansky et de 0 à l'échelle de l'ECOG. - Les tumeurs impliquaient 25 types différents (37 % des tumeurs du SNC et 63 % des tumeurs solides extra-crâniennes). - Nombre médian de lignes de traitements subis préalablement de 2 (1 à 8). - Temps médian depuis le diagnostic initial : 26,8 mois (2,4 à 153,1 mois). - Temps de réponse médian entre la biopsie et les résultats des analyses moléculaires : 26 jours (ÉI : 19 à 41 jours). - 30 tumeurs sur 73 étaient des sarcomes (14 rhabdomyosarcomes, 6 sarcomes d'Ewing, 4 ostéosarcomes et 7 sarcomes autres). Aucune

		<p>Méthodes : Des échantillons de tissus provenant de biopsie ou de résection de tumeurs primaires ou métastatiques ont été analysés par hybridation génomique comparative, par SNG pour une sélection de 75 gènes, séquençage du génome complet et séquençage de l'ARN (TruSeq Stranded mRNA kit). Un programme de bio-informatique maison a été utilisé pour la détection de fusions.</p> <p>Le pourcentage de cellules cancéreuses des biopsies a été déterminé par un pathologiste expérimenté. Un seuil minimum de $\geq 30\%$ de cellules cancéreuses a été établi pour la poursuite des analyses, mis à part pour le séquençage de panel de gènes ciblés pour lequel l'analyse était réalisée sur les échantillons contenant plus de 10 % de cellules cancéreuses.</p> <p>Les résultats des analyses moléculaires étaient révisés de manière hebdomadaire par une équipe multidisciplinaire comprenant des scientifiques, des généticiens, des pathologistes et des cliniciens, afin de jumeler les patients au traitement ciblé le plus pertinent.</p>	<p>analyse moléculaire n'a été effectuée pour un rhabdomyosarcome congénital.</p> <p><u>Analyses moléculaires (n = 69) :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Aucune anomalie génomique considérée comme un biomarqueur clairement associé à un bénéfice clinique prouvé d'un traitement enregistré pour la maladie n'a été détectée chez les patients de la cohorte. - Globalement, une anomalie génomique potentiellement actionnable a été détectée par au moins une analyse chez 42 patients sur 69 (60,9 %), dont : <ul style="list-style-type: none"> ▪ 42,4 % nombre de copies; ▪ 33,3 % mutation; ▪ 14,5 % nombre de copies et mutation; ▪ 26 % plus d'une anomalie actionnable - Sur ces 42 patients, 14 (33,3 %, ou 19,2 % de la population d'étude complète) ont reçu un agent tumoral basé sur les résultats des analyses moléculaires. Cinq de ceux-ci ont démontré une réponse ou une stabilisation prolongée de la maladie. - Une fusion a été détectée ou confirmée chez 12 patients (non seulement des sarcomes). Cela a mené au changement du diagnostic dans 1 cas de gliome (en épéndymome). Parmi ces 12 fusions, 9 ont été détectées dans des sarcomes. - Un patient atteint de sarcome alvéolaire des parties molles caractérisé par la fusion <i>ASPSCR1-TFE3</i> menant à une suractivation de MET, avait déjà subi un traitement avec l'inhibiteur de MET crizotinib avant l'inclusion dans l'étude. Ce patient a cessé le traitement après 3 cycles du fait de sa toxicité. La réponse était une stabilisation de la maladie. <p>* Aucune autre fusion qui aurait été accessible pour un traitement ciblé n'a été détectée.</p>
--	--	--	--

		<p>Paramètres : Une anomalie actionnable a été définie comme l'identification d'une anomalie moléculaire ou d'une atteinte à un sentier de signalisation dans la tumeur du patient et/ou une analyse de mutations germinales qui auraient le potentiel d'être ciblées par un médicament approuvé ou par un agent dans un contexte de recherche à n'importe quelle phase de développement clinique, intervenant de façon directe ou indirecte dans le sentier touché.</p> <p>La priorisation a été basée sur la force des preuves d'une anomalie moléculaire et l'accessibilité au traitement ciblé.</p>	<p>Conclusions : Les évènements génétiques ayant un impact sur les cancers et l'accès limité aux agents ciblés à l'intérieur des études cliniques pédiatriques représentent les principaux obstacles.</p>
<p>Mody [2015] États-Unis Étude observationnelle d'une série de cas consécutifs (prospective) unicentrique</p>	<p>Période de recherche : Mai 2012 à octobre 2014</p> <p>Nombre de patients : 91</p> <p>But : Évaluer l'utilisation d'une approche clinique intégrative de séquençage et de consultation génétique dans l'évaluation et le traitement d'enfants et de jeunes adultes atteints de cancer.</p>	<p>Population cible : Enfants ou jeunes adultes (25 ans et moins) présentant une récurrence de cancer, un cancer réfractaire ou un cancer rare.</p> <p>Méthodes : Le contenu en cellules cancéreuses a été estimé par des pathologistes préalablement au séquençage. Une équipe multidisciplinaire (oncologistes, généticiens, pathologistes, biologistes, bio-informaticiens, bioéthiciens,</p>	<p>Résultats :</p> <p><u>Données démographiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Âge médian : 11,5 ans (1 à 22 ans). - 81 patients avaient un cancer réfractaire/récurrence au moment de l'inscription, avaient épuisé toutes les options thérapeutiques prouvées et consultaient pour des options thérapeutiques expérimentales. - 21 patients se sont inscrits au moment du diagnostic initial lorsqu'ils présentaient un diagnostic très rare ou une présentation atypique pour le groupe pédiatrique. <p><u>Analyses moléculaires :</u></p>

		<p>consultants génétiques, coordonnateurs d'études et experts ad hoc) a interprété et délibéré les résultats de séquençage sur une base hebdomadaire.</p> <p>Paramètres :</p> <ul style="list-style-type: none"> - La proportion de patients présentant des anomalies génomiques potentiellement actionnables. - Les résultats de la prise en charge basée sur les résultats de séquençage. - L'estimation de la proportion de patients ou de leur famille présentant un risque de nouveau cancer. <p>Une anomalie potentiellement actionnable a été définie comme une modification qui pourrait mener au changement de la prise en charge du patient en procurant une anomalie pouvant être ciblée, à un changement du diagnostic ou à la stratification du risque ou à l'identification de mutations germinales qui pourrait procurer de l'information aux patients ou à leur famille sur le risque de développer un cancer.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dans 91 cas (89 %), la qualité et/ou quantité de matériel était suffisante pour effectuer le séquençage, dont 28 cancers hématologiques (31 %) et 63 tumeurs solides (69 %). - Une anomalie génomique potentiellement actionnable a été découverte chez 42 patients (46 %), dont 9 (10 %) présentaient une anomalie germinale significative. - Des anomalies génomiques potentiellement actionnables ont été détectées chez 15 des 28 (54 %) patients atteints de cancer hématologique. - Des anomalies génomiques potentiellement actionnables ont été détectées chez 27 des 63 (43 %) patients pédiatriques présentant une tumeur solide. ▪ Le séquençage a permis de détecter une fusion LMNA-NTRK1 chez une patiente de 3 ans ayant préalablement reçu un diagnostic de myofibromatose infantile, puis de sarcome à cellules fusiformes de haut grade négatif pour la fusion ETV6-NTRK3 (par séquençage) et, enfin, de fibrosarcome infantile par analyse du transcriptome. Cette découverte a mené, non seulement à un changement du diagnostic, mais aussi à un traitement au crizotinib. La patiente a atteint une rémission partielle et a depuis maintenu une réponse favorable au crizotinib pendant une période de plus de 8 mois sans toxicité majeure. ▪ Le séquençage a également permis une correction diagnostique chez une patiente de 4 ans initialement diagnostiquée avec un médulloblastome qui exprimait la fusion PAX3-NCOA2 suggérant plutôt un rhabdomyosarcome. Cette observation a conduit à un changement de la prise en charge. - Des fusions ont été décelées dans 27 % des tumeurs solides avec une prédominance dans les sarcomes.
--	--	--	--

		<p><u>Résultats du séquençage pour les sarcomes</u></p> <p>- Les résultats du séquençage ont révélé des anomalies génomiques actionnables dans le cas de 10 sarcomes, dont 4 avec des fusions. Parmi ces fusions :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 2/4 fusions ont conduit à un changement du diagnostic; ▪ 3/4 fusions ont conduit à un changement du traitement; ▪ 2/4 fusions ont conduit à un traitement ciblé (traitement au pazopanib pour une fusion SFPQ-TFE3 d'un PEComa, qui a abouti à une réduction de 90 % de la tumeur sur une période de plus de 16 mois et à un traitement au crizotinib suite à un changement du diagnostic pour un fibrosarcome infantile, inhibiteur de NTRK1, pour une fusion LMNA-NTRK1 qui a conduit à une réduction de 50 % de la masse. <p>Conclusions :</p> <p>L'intégration des données cliniques du séquençage dans la prise en charge est possible; elle a permis de révéler des anomalies génomiques potentiellement actionnables chez 46 % des patients et était associée à une modification du traitement ainsi qu'à la consultation génétique dans une petite proportion des patients.</p> <p>Limites :</p> <p>L'absence d'un groupe contrôle a limité la capacité d'évaluer si la situation clinique s'améliorait chez les patients de l'étude en comparaison des patients traités par les soins standards.</p> <p>Chez certains patients, le séquençage lors d'une récurrence a été réalisé sur le tissu prélevé au moment du diagnostic initial. Cela n'est pas idéal alors que le génome de la tumeur peut évoluer en réponse au traitement.</p>
--	--	--

			Le temps de réponse plus long que prévu a limité la capacité de prendre des mesures cliniques chez plusieurs patients.
<p>Chang [2016] États-Unis Étude pilote unicentrique (NCT01109394)</p>	<p>Période de recherche : 2010 à décembre 2014</p> <p>Nombre de patients : 59</p> <p>But : Faire une étude clinique génomique multidimensionnelle chez les enfants, adolescents et jeunes adultes atteints de cancer récurrent ou réfractaire, afin de déterminer l'utilité et la faisabilité d'appliquer un traitement ciblé à partir du génome.</p>	<p>Exclusions : Tumeurs du système nerveux central</p> <p>Population cible : Patients présentant une tumeur solide, à l'exclusion des tumeurs du système nerveux central.</p> <p>Méthodes : Séquençage de l'exome complet, séquençage du transcriptome complet, analyse de polymorphisme mononucléotidique par biopuce.</p> <p>Paramètres : Une anomalie génomique actionnable a été définie comme l'identification d'une mutation germinale, un changement du diagnostic ou une mutation somatique (mutation ponctuelle, insertion ou délétion nucléotidique, amplification, délétion ou fusion génique) qui pourrait être ciblée par des médicaments approuvés ou investigués en essais cliniques.</p>	<p>Résultats :</p> <p><u>Données démographiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Âge médian au moment de la biopsie : 15 ans (7 mois à 25 ans) - 20 types de tumeurs solides : 10 (20 %) syndrome d'Ewing et 10 (20 %) neuroblastomes. - 9 cas (15 %) avaient des métastases et 5 (8 %) des cas incluaient des tumeurs séquentielles. <p><u>Résultats des analyses :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 26 (44 %) des patients avaient des gènes de fusion (la majorité des patients avaient un diagnostic de sarcome). - La détection d'une fusion chez 2 patients a mené à un changement du diagnostic chez ceux-ci (la fusion <i>CIC-FOXO4</i> a amené le changement d'un diagnostic de syndrome d'Ewing en un diagnostic de sarcome similaire au syndrome d'Ewing et la fusion <i>BCOR-CCNB3</i> d'un sarcome à cellules claires du rein à un sarcome non différencié). L'absence de gène de fusion a mené au changement diagnostic d'un histiocytome fibreux de haut grade en un sarcome non différencié. - 30/59 (51 %) des patients présentaient des mutations actionnables, dont 24 (41 %) présentaient une mutation actionnable dans le cadre d'essais cliniques accessibles, 4 (7 %) ont eu une correction diagnostique et 7 (12 %) présentaient une mutation germinale. - Un traitement ciblé a été instauré chez un patient atteint de sarcome myofibroblastique épithélial inflammatoire positif pour la fusion <i>RANBP2-ALK</i>.

			<p>À 8 mois suivant l'instauration d'un traitement au crizotinib, une réponse métabolique et anatomique complète a été observée. La monothérapie a été maintenue sur une période de 6 mois, mais le patient a eu une récurrence et a été transféré à un traitement de ceritinib. Le patient est décédé 2 ans après le début du traitement au crizotinib.</p> <p>Conclusions : Cette étude a permis de démontrer la faisabilité clinique du séquençage de nouvelle génération dans une population diverse de tumeurs pédiatriques solides récurrentes ou réfractaires. L'analyse du génome a le potentiel d'influencer le diagnostic et le traitement chez ces patients.</p> <p>La monothérapie ciblée peut prolonger la survie, mais risque de ne pas permettre la guérison complète, comme observé dans cette étude. Cela souligne l'importance d'une combinaison gène-médicament avec la thérapie conventionnelle.</p>
<p>Worst [2016]</p> <p>Allemagne</p> <p>Étude rétrospective unicentrique</p>	<p>Période de recherche :</p> <p>Nombre de patients : 57 (25 sarcomes, 23 tumeurs cérébrales, 9 tumeurs autres). Assez de tissu ou de contenu tumoral pour 52 patients.</p> <p>But : Déterminer des cibles thérapeutiques individuelles chez des patients pédiatriques exposés à un risque élevé de récurrence ou de tumeurs réfractaires.</p> <p>- Établir une logistique pour une analyse moléculaire en temps</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <p>Enfants, adolescents et jeunes adultes âgés de 1 à 40 ans, atteints de maladie oncologique progressive réfractaire ou avec récurrence (avec un traitement initial selon le protocole du GPOH) ainsi que des indications primaires spécifiques.</p> <p>Méthodes : Séquençage de l'exome complet, séquençage du génome complet à basse couverture, séquençage de l'ARN complétement d'analyses de méthylation et d'expression sur biopuces. Les mutations ponctuelles, petites insertions/délétions, les</p>	<p>Résultats :</p> <p><u>Données démographiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Âge moyen : 13 ans incluant 14 jeunes adultes de plus de 18 ans. - La majorité des patients avaient une maladie progressive ou une situation de récurrence, mais huit patients avaient un diagnostic primaire pour lequel aucun traitement standard n'était offert (4 gliomes de haut grade non opérables, 3 sarcomes métastatiques et un patient avec myélome multiple). - Le séquençage de l'ADN a été fait chez les 52 patients et le séquençage de l'ARN chez 48 patients. <p><u>Résultats des analyses moléculaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 80 anomalies génomiques susceptibles d'être ciblées ont été révélées dans 39/52 (75 %) tumeurs.

	<p>réel et la détermination de cibles.</p> <p>- Évaluer les tumeurs pédiatriques récurrentes à risque élevé en relation avec les patrons de cibles potentielles de médicaments.</p> <p>Contexte : 11 groupes d'études du <i>Society for Pediatric Oncology and Hematology</i> (GPOH) et le <i>German Cancer Consortium</i> (DKTK) ont réalisé le projet <i>Individualized Therapy for Relapsed Malignancies in Childhood</i> (INFORM) afin de permettre l'accès au diagnostic moléculaire de fine pointe aux patients pédiatriques en oncologie à risque élevé en Allemagne.</p>	<p>variations de nombre de copies et les fusions ont été relevées à partir des séquences.</p> <p>Les librairies pour le séquençage de l'exome complet et pour le génome complet à basse couverture ont été réalisées avec la trousse Agilent SureSelectXT Human V5. Les librairies ont été séquencées avec la trousse Illumina TruSeq RNA v2. L'identification de fusions géniques a été faite à l'aide du programme deFuse.</p> <p>Échantillons de tissu frais congelés avec un contenu en cellules tumorales supérieur à 40 % en histologie.</p> <p>Un panel d'experts a priorisé les cibles potentielles à transmettre au médecin traitant qui pouvait ensuite utiliser cette information pour la prise de décision clinique individuelle jusqu'au niveau 7, très élevé).</p> <p>Le score de priorisation des patients se basait sur l'existence d'un médicament associé à l'anomalie génomique détectée, la présence d'un changement génétique, l'existence d'un médicament ciblant directement l'anomalie génomique, le niveau de preuves et la spécificité.</p>	<p>- 26 patients (50 %) démontraient une ou plusieurs anomalies avec un potentiel pour un traitement ciblé avec un score de priorisation intermédiaire ou plus élevé (niveau 4 de 7).</p> <p>- 10 patients ont reçu un traitement ciblé basé sur les résultats des analyses moléculaires avec des réponses observées sur des tumeurs préalablement réfractaires au traitement.</p> <p>- Un seul sarcome associé à une translocation a été identifié comme ayant un gène de fusion avec un potentiel pour un traitement ciblé. Il s'agit d'un sarcome d'Ewing extrasquelettique avec la translocation <i>CIC-DUX4</i>. Toutefois, l'intérêt est uniquement biologique puisqu'aucun médicament ne cible cette translocation pour l'instant.</p> <p>- Un patient chez qui l'on a diagnostiqué un sarcome myofibroblastique non opérable avec fusion <i>CARS-ALK</i> a été traité par un inhibiteur d'ALK (<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>, par le biais de l'inclusion dans un essai clinique pour un inhibiteur : LDK378). Un traitement de 6 semaines a permis de réduire la taille de la tumeur de manière importante, permettant une résection complète. La rémission complète a été atteinte 9 mois après la fin du traitement. Il y a eu une récurrence avec métastases 12 mois plus tard, mais le patient a encore une fois bien répondu au traitement à l'inhibiteur d'ALK. Le traitement était toujours en cours 26 mois après l'analyse initiale.</p> <p>Conclusions : L'étude a démontré qu'une analyse moléculaire comprehensive d'échantillons provenant de patients pédiatriques à risque élevé en oncologie est faisable à l'échelle nationale et peut être réalisée en 4 semaines.</p>
--	---	---	--

<p>Harris [2016]</p> <p>États-Unis</p> <p>Étude de cohorte prospective multicentrique</p>	<p>Période de recherche :</p> <p>5 septembre 2012 au 19 novembre 2013 et le suivi clinique a été poursuivi jusqu'en novembre 2014</p> <p>Nombre de patients :</p> <p>100 (89 profils moléculaires)</p> <p>Objectif primaire :</p> <p>Déterminer la faisabilité d'identifier des anomalies génomiques actionnables et offrir des recommandations de traitement personnalisé contre le cancer chez les patients pédiatriques présentant une tumeur solide à risque élevé, réfractaire ou récurrente.</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Âgé de 30 ans ou moins - Diagnostic de tumeur solide à risque élevé (survie globale inférieure à 25 % pour ce groupe de patients avec la même histologie, grade ou stade), ou réfractaire (progression de la tumeur sur le traitement de première intention standard) ou récurrente. - Preuve histologique de malignité au moment du diagnostic ou de la récurrence. - Suffisamment de matériel de la tumeur au moment du diagnostic ou de la récurrence ou d'une chirurgie/biopsie planifiée pour établir un profil. <p>Exclusions :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Matériel insuffisant pour faire le profil moléculaire; - Tumeurs cérébrales. <p>Méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Période de suivi d'un an; - Échantillons archivés ou acquis en clinique; - Détection de mutations par analyse Sequenom (OncoMap, détecte 471 mutations récurrentes dans 41 gènes liés au cancer) on SNG ciblé (OncoPanel de 	<p>Résultats :</p> <p><u>Données démographiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Période de suivi médiane : 6,8 mois (2 à 23,6 mois) - Diagnostic le plus commun : sarcome non rhabdomyosarcome - Échantillons : <ul style="list-style-type: none"> ▪ diagnostic seulement : 31; ▪ récurrence seulement : 40; ▪ diagnostic et récurrence : 18; ▪ chirurgies contrôles : 11 (dont 6 avaient un échantillon au moment du diagnostic ou d'une récurrence aussi). <p><u>Résultats du profil moléculaire :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Une recommandation de traitement personnalisé a été faite dans 31 % des cas (IC95 % : 23 % - 41 %) avec un total de 39 recommandations chez ces 31 patients. Translocation dans 1 % des cas (IC95 % : 0 % – 8 %). - Les anomalies actionnables les plus communes étaient les changements du nombre de copies, suivis de mutations connues ou soupçonnées d'être délétères. - Les analyses moléculaires ont mené à une correction diagnostique chez 3 patients suite à l'identification d'une translocation. L'identification de la translocation <i>EWSR1-CREB2</i> (par séquençage de l'ARN et confirmée par SNG ciblé) a mené au changement d'un diagnostic de syndrome d'Ewing en diagnostic de sarcome myxoïde pulmonaire primaire. L'identification de la translocation <i>EWSR1-ATF1</i> (par séquençage de l'ARN et confirmée par SNG ciblé) a mené au changement d'un diagnostic de mélanome malin de stade III en diagnostic de sarcome à cellules claires cutané. L'identification de la translocation <i>EML4-NTRK3</i> (par hybridation génomique
--	---	---	--

		<p>Agilent SureSelect sur Illumina HiSeq) et détermination du nombre de copies par hybridation génomique comparative sur puce;</p> <ul style="list-style-type: none"> - La liste de fusions identifiées par séquençage de l'ARN a été révisée et les fusions à potentiel d'importance clinique ont été validées par SNG ciblé dans un laboratoire avec une certification CLIA; - Les échantillons ont été révisés par un pathologiste qui a déterminé le pourcentage de noyaux tumoraux viables et a jugé de la conformité des échantillons pour le profilage; - Les résultats des profils moléculaires ont été révisés par un panel d'experts multidisciplinaire dans le but de dégager des résultats cliniquement significatifs. <p>Paramètres :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le terme anomalie actionnable s'appliquait à une anomalie génomique indiquant un potentiel pour un traitement ciblé. - Le terme traitement ciblé s'appliquait à un médicament au mécanisme d'action connu, spécifique et limité pour contrer un processus oncogénique. 	<p>comparative sur puce) a mené au changement d'un diagnostic de sarcome à cellules fusiformes de grade intermédiaire en diagnostic de fibrosarcome infantile. Chez ce dernier patient, un traitement au crizotinib (inhibiteur de tyrosine kinase) a été recommandé, mais il n'a pas reçu ce traitement.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Au total, 43 patients avaient des résultats d'importance clinique potentielle. <p>Conclusions : Une étude génomique clinique multicentrique en oncologie pédiatrique est faisable et une proportion importante de tumeurs solides réfractaires ou récurrentes possède des anomalies génomiques actionnables.</p> <p>Chez les enfants présentant des tumeurs solides à risque élevé, réfractaires ou récurrentes, il y a un potentiel que les résultats du profil moléculaire de la tumeur aient des implications cliniques mais il y a des obstacles à l'accès à un traitement ciblé.</p> <p>Limites :</p> <p>Petite cohorte.</p>
--	--	--	---

		<p>- Une recommandation de traitement personnalisé du cancer était faite en cas d'anomalie actionnable et de traitement ciblé apparié possible par essai clinique ou par médicament approuvé par la FDA, avec une dose et une formulation appropriée pour l'âge, et si le patient n'avait pas été préalablement traité avec l'agent (ou un agent similaire) du traitement ciblé proposé.</p> <p>Niveau de preuves concernant les recommandations :</p> <p>1 et 2 : preuves provenant d'études cliniques;</p> <p>3 et 4 : preuves précliniques;</p> <p>5 : consensus d'experts.</p> <p>Si au moins 14 des 100 participants recevaient une recommandation de traitement personnalisé du cancer, l'approche était considérée comme faisable.</p>	
<p>Pincez [2017]</p> <p>France</p> <p>Étude de cohorte prospective unicentrique</p>	<p>Période de recherche :</p> <p>Octobre 2014 à novembre 2015</p> <p>Nombre de patients :</p> <p>58 patients dont 21 sarcomes</p> <p>But : Évaluer la faisabilité d'un comité de séquençage et de</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <p>- Maladie réfractaire au traitement ou récurrence;</p> <p>- Tumeur de mauvais pronostic au diagnostic;</p> <p>- Taux de survie anticipé de moins de 25 %.</p> <p>Population cible :</p>	<p>Résultats :</p> <p><u>Données démographiques :</u></p> <p>- Durée moyenne du suivi : 7,7 mois ± 3,4 mois.</p> <p>- Âge moyen : 12 ans ± 5,7 ans (0,1 à 21,5 ans).</p> <p><u>Analyses moléculaires :</u></p> <p>- 23 patients sur 58 (40 %) montraient une anomalie génomique actionnable (avec un total de</p>

	<p>biologie moléculaire de tumeurs dans un centre médical.</p>	<p>Patients pédiatriques présentant une tumeur réfractaire/récurrente.</p> <p>Méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le comité d'analyses moléculaires des tumeurs était formé d'oncologues, de généticiens, de biologistes et de pathologistes. - Analyses moléculaires sur tissus congelés : <ul style="list-style-type: none"> ▪ séquençage d'un panel de gènes ciblés (contenu de cellules tumorales minimum de 10 %); ▪ hybridation génomique comparative sur puce (contenu de cellules tumorales minimum de 30 %) - Le comité examinait le potentiel d'inclusion des patients dans des essais de traitement ciblé, selon les résultats des analyses moléculaires. <p>Paramètres :</p> <p>Une anomalie actionnable a été définie comme une anomalie moléculaire dans un gène pouvant être ciblé et connu comme étant pathogénique ou prédit comme étant pathogénique.</p> <p>Les recommandations du comité étaient basées sur les données suivantes :</p>	<p>31 anomalies). Parmi ces 23 patients, 3 avaient plus d'une anomalie actionnable.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 6 patients sur 23 ont reçu un traitement ciblé (5 inclus dans une étude clinique et 1 pour une utilisation non indiquée). - 2 patients présentant un rhabdomyosarcome alvéolaire ont reçu du palbociclib en raison de l'observation d'une amplification du gène <i>CDK4</i>. - Un patient présentant un sarcome pelvien de haut grade a reçu du sirolimus, du fait de l'observation d'une mutation de mTOR. - Une translocation impliquant le gène <i>ALK</i> a été identifiée comme anomalie actionnable chez un patient présentant un ostéosarcome. Le patient s'est vu refusé pour un essai clinique sur un inhibiteur de la kinase <i>ALK</i>, du fait de désordres métaboliques découverts au moment de la sélection. - Raisons pour lesquelles les patients présentant une anomalie à potentiel d'action n'ont pas reçu de traitement ciblé : <ul style="list-style-type: none"> ▪ mauvais état du patient; ▪ poursuite du traitement standard; ▪ absence d'essai clinique pédiatrique; ▪ préférence de la famille. <p>Conclusions :</p> <p>L'étude montre qu'un programme de séquençage pédiatrique formalisé en utilisant le matériel de diagnostic original est faisable.</p> <p>Le SNG par panel de gènes ciblés, combiné à l'hybridation génomique comparative sur puce, permet d'identifier des anomalies moléculaires pouvant être ciblées et permet d'émettre des recommandations pour des actions spécifiques chez certains patients.</p>
--	--	---	--

		<ul style="list-style-type: none"> - Le niveau de preuves associant une pathogénicité ou la prédiction de pathogénicité à une anomalie génétique; - La situation clinique du patient; - L'accessibilité à un essai clinique pertinent. 	
<p>Watson [2018]</p> <p>France</p> <p>Étude rétrospective</p>	<p>Nombre de patients : 94 échantillons</p> <p>But : Évaluer l'efficacité du séquençage du transcriptome pour la classification de tumeurs.</p> <p>Définir des groupes homogènes de tumeurs avec des fusions récurrentes, selon les caractéristiques pathologiques et les analyses de profils d'expression de gènes.</p> <p>Proposer des gènes ou des voies de signalisation exprimés, dans des tumeurs spécifiques, comme biomarqueurs ou cibles thérapeutiques potentielles.</p>	<p>Critères d'inclusion : Tumeur avec diagnostic vague de sarcome non classé ou types de sarcomes pour lesquels aucune anomalie génétique pathogénique n'est connue ou sarcome présumé avec des caractéristiques génétiques et monomorphiques simples.</p> <p>Méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Séquençage du transcriptome sur HiSeq 2500 (bibliothèque avec la trousse TruSeq Stranded mRNA LS). L'analyse des séquences pour la recherche de fusion a été effectuée avec le logiciel deFuse tools et Fusion-Map. - Analyse des profils d'expression par le logiciel Kallisto. - Les fusions ont été validées par RT-PCR et par séquençage de Sanger. 	<p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un gène de fusion a été révélé dans 55 des 94 tumeurs analysées. <p>Le nombre moyen de fusions détectées par échantillon était de 1,8 (en ne tenant pas compte d'un échantillon ayant plusieurs fusions sur le chromosome 1). Une seule fusion a été détectée sur 40 échantillons. De 2 à 9 fusions ont été détectées dans 14 autres échantillons.</p> <p>26 des 55 échantillons positifs exprimaient un gène de fusion rapporté de manière récurrente dans la littérature ou un transcrite de fusion émergent qui n'était pas inclus dans la procédure de RT-PCR de routine utilisée.</p> <p>De nouvelles fusions ou variantes ont été révélées dans 29 échantillons. Onze de celles-ci, qui n'avaient pas été rapportées dans la littérature, ont été considérées comme spécifiques à la tumeur individuelle et 14 d'entre elles n'ont pu être catégorisées comme pathogéniques, du fait de lacunes concernant les connaissances sur ces gènes.</p> <p>Conclusions : Les sarcomes, comme les tumeurs hématologiques, démontrent une forte incidence de gènes de fusion comparativement aux carcinomes.</p>

<p>Oberg [2016]</p> <p>États-Unis</p> <p>Étude rétrospective unicentrique</p>	<p>Période de recherche :</p> <p>Janvier 2014 à avril 2016</p> <p>Nombre de patients :</p> <p>101 patients consécutifs</p> <p>But : Rapporter les résultats de l'intégration clinique du SNG dans la pratique d'hémo-oncologie et décrire leur influence sur la médecine du cancer basée sur l'information génomique.</p>	<p>Population cible :</p> <p>Patients pédiatriques à haut risque (représentant environ 32 % de l'ensemble des patients de cette clinique) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pronostic de survie globale à 5 ans de moins de 50 %; - Phénotype clinique particulier; - Forme rare de cancer sans traitement standard; - Prédilection suspectée; - Récidive (patients ayant reçu un diagnostic avant 18 ans). <p>Méthodes :</p> <p>Implantation d'une plateforme clinique de SNG pour les patients d'oncologie pédiatrique (2014). Le programme PIPseq (<i>Precision in Pediatric Sequencing</i>) utilise le SNG sur des échantillons d'ADN et d'ARN de tumeurs et du tissu normal.</p> <p>Les tissus étaient examinés par un pathologiste.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) SNG d'un panel (n = 467 gènes) de gènes liés au cancer (optimisé pour FFPE); 2) SNG de l'exome complet de la tumeur et du tissu normal (optimisé pour les tissus frais 	<p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le diagnostic le plus commun était un sarcome (n = 17) parmi les tumeurs solides (26 % des tumeurs solides et 17 % des tumeurs totales). - Des anomalies génétiques ont été identifiées chez 92/101 (91 %) patients. - 20 fusions ont été détectées dont 10 ont été identifiées dans des tumeurs solides. - 21 patients sur 65 (32 %) présentant une tumeur solide portaient une anomalie génétique avec un potentiel d'être ciblée. - Une fusion démontrant un potentiel de cible thérapeutique a été identifiée chez 2 des 17 patients atteints de sarcome (11,8 %). Il s'agit d'un cas de fibrosarcome congénital avec une fusion <i>EML4-NTRK3</i> pouvant être ciblée par un inhibiteur de la kinase <i>ALK</i> et d'un cas de tumeur myofibroblastique inflammatoire avec la fusion <i>VCAN-IL23R</i> pouvant être ciblée par un inhibiteur de <i>JAK</i> (ce dernier patient a d'ailleurs reçu un traitement ciblé). - L'identification de fusion a permis de fournir de l'information diagnostique dans 6 des 17 cas de sarcomes (5 confirmations et une correction) en plus de fournir de l'information sur le pronostic pour un de ces 6 cas. <p>Conclusions :</p> <p>Les résultats de l'étude montrent la faisabilité d'intégrer le SNG clinique dans la pratique de l'oncologie pédiatrique. De plus, cette approche peut permettre d'éviter des traitements inefficaces ou inappropriés, de solidifier un diagnostic définitif et d'identifier des cibles génétiques ayant un potentiel clinique.</p>
--	--	--	--

		<p>ou congelés) (variation du nombre de copies);</p> <p>3) Séquençage de l'ARN de la tumeur (optimisé pour les tissus frais ou congelés, trousse <i>TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit</i> sur séquenceur HiSeq2500) (transcrits de fusion, logiciel Tuxedo Suite incluant TopHat2, BOWTIE2 et CUFFLINKS).</p> <p>Les résultats des analyses moléculaires des tumeurs étaient révisés manuellement par un pathologiste avant d'être présentés à un comité multidisciplinaire.</p> <p>Les anomalies génétiques identifiées ont été évaluées en fonction de leur association à la maladie et du niveau de preuves de leur pertinence clinique (actionnabilité).</p> <p>Un rapport a ensuite été transmis à l'oncologiste référent.</p> <p>Les résultats non divulgués incluaient le statut de porteur, les anomalies de pertinence incertaine, les mutations liées à la forme adulte, pour lesquelles le rapport génétique est incertain ou pour lesquelles aucune intervention procurant des bénéfices cliniques n'est connue.</p>	
--	--	---	--

<p>Cote [2018] États-Unis Étude unicentrique rétrospective</p>	<p>Période de recherche : Août 2012 à octobre 2016</p> <p>Nombre de patients : 133</p> <p>But :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Déterminer les patients admissibles à des études cliniques en phases précoces. - Caractériser les sous-types de sarcomes ou les cancers d'origine primaire inconnue. <p>Contexte : Sauf pour les tumeurs du stroma gastro-intestinal et du dermatofibrosarcome protuberans, il n'existe pas de traitement spécifique à des cibles moléculaires approuvés par la FDA pour les sarcomes métastatiques aux États-Unis.</p>	<p>Critères d'inclusion : Patients présentant des tumeurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Métastatiques ou locales avancées ou non résécables; - Sarcomes dont le site primaire est inconnu; - Ou tumeurs du stroma gastro-intestinal, pour lesquelles l'analyse de mutation pourrait influencer le choix ou la dose d'inhibiteur de tyrosine kinase. <p>Population cible : Patients présentant des sarcomes des tissus mous ou osseux.</p> <p>Méthodes : Profilage génomique par SNG avec capture de gènes cibles (exons de 400 gènes liés au cancer et introns sélectionnés pour 31 gènes fréquemment associés à des réarrangements dans les cancers, Foundation Medicine Inc.)</p> <p>Les analyses couvraient les substitutions de bases, les insertions ou délétions, les changements de nombre de copies géniques et les réarrangements.</p> <p>Une anomalie actionnable a été définie comme une anomalie qui permettrait l'admissibilité dans une étude clinique récente ou en cours.</p>	<p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un total de 342 anomalies génomiques ont été détectées chez 133 patients (moyenne = 1, médiane = 2, intervalle = 0 – 14). - Une moyenne de deux anomalies (0 à 14) a été décelée par échantillon de tumeur. - Au moins une mutation a été détectée dans 88 % des échantillons. - 75 mutations ont été détectées dans des gènes pouvant être ciblés avec des médicaments existants et qui permettraient une participation dans des essais cliniques. - En général, le taux de mutations estimé était bas, particulièrement pour les gènes de fusion ou les anomalies génétiques associées aux sarcomes. - Les anomalies les plus communes impliquaient des gènes du cycle cellulaire. - 29 des échantillons provenaient de sarcomes associés à des translocations. Pour deux patients, l'analyse de SNG a mené à un changement du diagnostic. Chez un patient atteint de sarcome d'Ewing (fusion <i>EWSR1-FLI1</i>), la tumeur avait initialement été diagnostiquée comme une tumeur de glande salivaire. La détection de la fusion <i>WWTR1-CAMTA</i> chez un second patient a permis de réviser le diagnostic d'angiosarcome épithélioïde de haut grade pour celui d'un hémangiothéliome épithélioïde. <p>Conclusions :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Des mutations pouvant être testées pour un effet thérapeutique avec des médicaments existants, dans le contexte d'études cliniques, ont été détectées chez 40 % des patients. - Ces résultats indiquent qu'une approche de SNG ciblée constitue un outil utile pour diriger les patients atteints de sarcome vers des essais cliniques spécifiques à certaines mutations.
---	--	--	--

ANNEXE E

Fréquence des transcrits de fusions actionnables dans les sarcomes des tissus mous et osseux

ÉTUDE	POPULATION	TYPES DE TUMEURS	ANALYSE MOLÉCULAIRE	NOMBRE DE FUSIONS ACTIONNABLES*	NOMBRE DE PATIENTS AYANT EU ACCÈS À UN TRAITEMENT PERSONNALISÉ OU À UN ESSAI CLINIQUE†
Lucchesi <i>et al.</i> , 2018	N = 584	Sarcomes des tissus mous	SNG du génome	239/584 dont 2 sarcomes avec fusion	n. d.
Harttrampf <i>et al.</i> , 2017	N = 73 Pédiatrique	Tumeurs solides incurables, réfractaires ou récurrentes (dont 30 sarcomes)	SNG de l'ARN, du génome complet et par capture de gènes cibles HGC	2/30 sarcomes 2/9 sarcomes avec fusion	0
Pincez <i>et al.</i> , 2017	N = 58 Pédiatrique (21 ans ou moins)	Tumeurs solides réfractaires, récurrentes ou à mauvais pronostic (taux de survie anticipé < 25 %) (dont 21 sarcomes)	SNG avec capture de gènes cibles HGC	1/21 sarcomes	0
Cote <i>et al.</i> , 2018	N = 133	Tumeurs métastatiques ou locales avancées/non résécables, sarcomes de site primaire inconnu, ou TSGI pour lequel une analyse de mutation pourrait influencer le choix ou la dose d'inhibiteur de tyrosine kinase	SNG avec capture de gènes cibles	0/29 sarcomes associés à des fusions	0

ÉTUDE	POPULATION	TYPES DE TUMEURS	ANALYSE MOLÉCULAIRE	NOMBRE DE FUSIONS ACTIONNABLES*	NOMBRE DE PATIENTS AYANT EU ACCÈS À UN TRAITEMENT PERSONNALISÉ OU À UN ESSAI CLINIQUE†
Oberg <i>et al.</i> , 2016	N = 101 Pédiatrique	Tumeurs solides et hématologiques chez des patients à haut risque (pronostic de survie globale à 5 ans de moins de 50 %, phénotype clinique particulier, forme rare sans traitement standard, suspicion d'une prédisposition, récurrence) (dont 17 sarcomes)	SNG de l'exome complet Séquençage du transcriptome SNG d'un panel de gènes liés au cancer	2/17 sarcomes	1
Chang <i>et al.</i> , 2016	N = 59 Pédiatrique (25 ans ou moins)	Tumeurs solides réfractaires ou récurrentes (tumeurs du système nerveux central exclues)	SNG de l'exome complet, du transcriptome complet et analyse de polymorphismes mononucléotidique sur biopuce	1/26 sarcomes (avec ou sans fusions)	1
Worst <i>et al.</i> , 2016	N = 52 40 ans ou moins	Tumeurs solides réfractaires, récurrentes ou avec une indication primaire spécifique (aucun traitement standard offert) (dont 25 sarcomes)	SNG de l'exome complet, du génome complet et du transcriptome	2/25 sarcomes 2/17 sarcomes avec fusion	1
Mody <i>et al.</i> , 2015	N = 91 Pédiatrique (25 ans ou moins)	Tumeurs solides et cancers hématologiques rares (ou atypiques), réfractaires ou récurrents	SNG du génome complet, du transcriptome	4/10 sarcomes	2

Abréviations : HGC : Hybridation génomique comparative; n. d. : Non disponible; SNG : Séquençage de nouvelle génération; s. o. : Sans objet; TSGI : Tumeur du stroma gastro-intestinal.

* Un comité multidisciplinaire a participé à la révision des résultats des analyses moléculaires et à l'identification d'aberrations actionnables pour les études d'Oberg, Harttrampf, Pincez, Worst et Mody et leurs collaborateurs [Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015].

† Basé sur l'identification d'une fusion actionnable dans un sarcome.

RÉFÉRENCES

- Al-Zaid T, Wang WL, Somaiah N, Lazar AJ. Molecular profiling of sarcomas: New vistas for precision medicine. *Virchows Arch* 2017;471(2):243-55.
- Bianchi G, Sambri A, Righi A, Dei Tos AP, Picci P, Donati D. Histology and grading are important prognostic factors in synovial sarcoma. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(9):1733-9.
- Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res* 2012;2(1):14.
- Casali PG, Abecassis N, Bauer S, Biagini R, Bielack S, Bonvalot S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4):iv51-iv67.
- Chang W, Brohl AS, Patidar R, Sindiri S, Shern JF, Wei JS, et al. MultiDimensional ClinOmics for precision therapy of children and adolescent young adults with relapsed and refractory cancer: A report from the Center for Cancer Research *Clin Cancer Res* 2016;22(15):3810-20.
- Cote GM, He J, Choy E. Next-generation sequencing for patients with sarcoma: A single center experience. *Oncologist* 2018;23(2):234-42.
- Dangoor A, Seddon B, Gerrand C, Grimer R, Whelan J, Judson I. UK guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Clin Sarcoma Res* 2016;6:20.
- Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvelaere AV, Péoc'h M, Istier L, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS One* 2011;6(8):e20294.
- Dufresne A, Brahmi M, Karanian M, Blay JY. Using biology to guide the treatment of sarcomas and aggressive connective-tissue tumours. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(7):443-58.
- Ellison L et Janz T. Incidence du cancer et mortalité par cancer chez les enfants au Canada. Coup d'oeil sur la santé. Ottawa, ON : Statistique Canada; 2015. Disponible à : <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-624-x/2015001/article/14213-fra.pdf>.
- Garcia del Muro X, de Alava E, Artigas V, Bague S, Braña A, Cubedo R, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of patients with soft tissue sarcoma by the Spanish group for research in sarcomas (GEIS). *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77(1):133-46.
- Gerrand C, Athanasou N, Brennan B, Grimer R, Judson I, Morland B, et al. UK guidelines for the management of bone sarcomas. *Clin Sarcoma Res* 2016;6:7.
- Groisberg R, Hong DS, Roszik J, Janku F, Tsimberidou AM, Javle M, et al. Clinical next-generation sequencing for precision oncology in rare cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;17(7):1595-601.

- Harris MH, DuBois SG, Glade Bender JL, Kim A, Crompton BD, Parker E, et al. Multicenter feasibility study of tumor molecular profiling to inform therapeutic decisions in advanced pediatric solid tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) study. *JAMA Oncol* 2016;2(8):608-15.
- Harttrampf AC, Lacroix L, Deloger M, Deschamps F, Puget S, Auger N, et al. Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization (MOSCATO-01) in pediatric patients: A single institutional prospective molecular stratification trial. *Clin Cancer Res* 2017;23(20):6101-12.
- Italiano A, Di Mauro I, Rapp J, Pierron G, Auger N, Alberti L, et al. Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): A prospective, multicentre, observational study. *Lancet Oncol* 2016;17(4):532-8.
- Italiano A, Mathoulin-Pelissier S, Cesne AL, Terrier P, Bonvalot S, Collin F, et al. Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Cancer* 2011;117(5):1049-54.
- Kubo T, Shimose S, Fujimori J, Furuta T, Ochi M. Prognostic value of PAX3/7-FOXO1 fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: Systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;96(1):46-53.
- Lahat G, Lazar A, Lev D. Sarcoma epidemiology and etiology: Potential environmental and genetic factors. *Surg Clin North Am* 2008;88(3):451-81.
- Lam SW, Cleton-Jansen AM, Cleven AH, Ruano D, van Wezel T, Szuhai K, Bovée JV. Molecular analysis of gene fusions in bone and soft tissue tumors by anchored multiplex PCR-based targeted next-generation sequencing. *J Mol Diagn* 2018;20(5):653-63.
- Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, et al. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: Prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;28(12):1982-8.
- Lucchesi C, Khalifa E, Laizet Y, Soubeyran I, Mathoulin-Pelissier S, Chomienne C, Italiano A. Targetable alterations in adult patients with soft-tissue sarcomas: Insights for personalized therapy. *JAMA Oncol* 2018;4(10):1398-404.
- Mastrangelo G, Coindre JM, Ducimetière F, Dei Tos AP, Fadda E, Blay JY, et al. Incidence of soft tissue sarcoma and beyond: A population-based prospective study in 3 European regions. *Cancer* 2012;118(21):5339-48.
- Mody RJ, Wu YM, Lonigro RJ, Cao X, Roychowdhury S, Vats P, et al. Integrative clinical sequencing in the management of refractory or relapsed cancer in youth. *JAMA* 2015;314(9):913-25.
- Neuville A, Ranchère-Vince D, Dei Tos AP, Montesco MC, Hostein I, Toffolatti L, et al. Impact of molecular analysis on the final sarcoma diagnosis: A study on 763 cases collected during a European epidemiological study. *Am J Surg Pathol* 2013;37(8):1259-68.

- Oberg JA, Glade Bender JL, Sulis ML, Pendrick D, Sireci AN, Hsiao SJ, et al. Implementation of next generation sequencing into pediatric hematology-oncology practice: Moving beyond actionable alterations. *Genome Med* 2016;8(1):133.
- Pincez T, Clément N, Lapouble E, Pierron G, Kamal M, Bieche I, et al. Feasibility and clinical integration of molecular profiling for target identification in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64(6):e26365.
- Riley RD, Burchill SA, Abrams KR, Heney D, Sutton AJ, Jones DR, et al. A systematic review of molecular and biological markers in tumours of the Ewing's sarcoma family. *Eur J Cancer* 2003;39(1):19-30.
- Saiag P, Grob JJ, Lebbe C, Malvey J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of dermatofibrosarcoma protuberans. European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015;51(17):2604-8.
- Schaefer IM, Cote GM, Hornick JL. Contemporary sarcoma diagnosis, genetics, and genomics. *J Clin Oncol* 2018;36(2):101-10.
- Stegmaier S, Leuschner I, Poremba C, Ladenstein R, Kazanowska B, Ljungman G, et al. The prognostic impact of SYT-SSX fusion type and histological grade in pediatric patients with synovial sarcoma treated according to the CWS (Cooperative Weichteilsarkom Studie) trials. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64(1):89-95.
- Urbini M, Astolfi A, Pantaleo MA, Serravalle S, Dei Tos AP, Picci P, et al. HSPA8 as a novel fusion partner of NR4A3 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2017;56(7):582-6.
- Van de Rijn M, Guo X, Sweeney RT, Beck AH, West RB. Molecular pathological analysis of sarcomas using paraffin-embedded tissue: Current limitations and future possibilities. *Histopathology* 2014;64(1):163-70.
- Van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, et al. Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2010;28(12):1989-94.
- Von Mehren M, Randall RL, Benjamin RS, Boles S, Bui MM, Conrad EU 3rd, et al. Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14(6):758-86.
- Watson S, Perrin V, Guillemot D, Reynaud S, Coindre JM, Karanian M, et al. Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. *J Pathol* 2018;245(1):29-40.
- Worst BC, van Tilburg CM, Balasubramanian GP, Fiesel P, Witt R, Freitag A, et al. Nextgeneration personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients – The INFORM pilot study. *Eur J Cancer* 2016;65:91-101.
- Xiao X, Garbutt CC, Hornicek F, Guo Z, Duan Z. Advances in chromosomal translocations and fusion genes in sarcomas and potential therapeutic applications. *Cancer Treat Rev* 2018;63:61-70.

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

Québec 

Siège social

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

Bureau de Montréal

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

inesss.qc.ca

