

Séquençage génétique des cancers

Validité et utilité cliniques des profils moléculaires obtenus à l'aide des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS)

Note informative rédigée par **Guylaine Rouleau**

Avec la collaboration de **Gino Boily**

Faits saillants

La majorité des cancers résulte d'évènements mutationnels de l'ADN somatique et plus rarement d'anomalies constitutionnelles héréditaires. Dans l'un et l'autre cas, les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) peuvent contribuer à une meilleure compréhension de la tumorigénèse. Centrées sur l'approche thérapeutique et balisées par le cadre d'analyse ACCE, la validité et l'utilité cliniques des profils moléculaires obtenus par ces technologies ont fait l'objet de la présente évaluation.

Quelques études portant sur la validité et l'utilité cliniques des technologies de NGS ont été répertoriées. Elles se résument en une revue systématique, deux études descriptives et quelques revues narratives de la littérature ainsi que des résumés de conférences.

Pour faire état de la validité clinique, le paramètre jugé le plus important a trait à la capacité à séquencer des gènes à partir de spécimens archivés, de biopsies ou de pièces de résection chirurgicale qui ont une portée clinique éprouvée. Ainsi, les études répertoriées montrent que les technologies de NGS sont capables de détecter des mutations qui sont associées à la chimiosensibilité ou à la résistance à certains médicaments anticancéreux. Dans ce cas, des paramètres analytiques comme la concordance et les faux positifs viennent appuyer quantitativement la validité clinique.

Actuellement, le nombre de mutations tumorales recherchées pour traiter chaque patient est limité en pratique clinique conventionnelle. Bien que les technologies de séquençage à haut débit soient capables d'identifier ces mutations, leur utilité clinique comparativement aux autres méthodes de séquençage génétique n'apparaît pas évidente en raison du débit requis. Une analyse rigoureuse de l'efficacité serait nécessaire avant leur implantation en clinique.

Par ailleurs, l'approche expérimentale consiste à rechercher plusieurs mutations ciblées à l'aide du séquençage d'un grand panel de gènes, de l'exome ou du génome, et à traiter le patient avec une molécule hors indication reconnue ou en essai clinique. Comme le nombre de mutations potentielles est grand, une technologie de NGS s'avère utile en raison de sa capacité à haut débit. Les résultats sont actuellement fragmentaires et les bénéfices cliniques rapportés ont été modestes.

Par contre, les résultats préliminaires d'études en cours sont prometteurs et à terme, de nouvelles données guideront la prise en charge clinique des cancers.

Note au lecteur

Une note informative est une synthèse des données disponibles concernant certains aspects spécifiques du sujet évalué et ne formule aucune recommandation. La présente note vise à informer et à soutenir la prise de décision sur la validité et l'utilité cliniques des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS). Elle constitue un premier document d'une série de productions scientifiques requises pour répondre à une question complexe.

Le contenu de cette publication a été rédigé et édité par l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS).

Équipe de projet

Auteurs

Guylaine Rouleau, B.Sc. (pharmacie), M.B.A.
Doctorante en pratique pharmaceutique de 1^{re} ligne (Pharm. D.)

Collaborateurs

Gino Boily, Ph. D. (biologie moléculaire)

Coordination scientifique

Khalil Moqadem, M.B.A., Ph.D.

Direction scientifique

Gilles Pineau, M. D.

Recherche d'information scientifique

Caroline Dion, MBSI, *bibl. prof.*

Soutien documentaire

Micheline Paquin, *tech. doc.*

Édition

Responsable

Renée Latulippe, M.A.

Coordination

Véronique Baril

Révision linguistique

Madeleine Fex

Traduction

Mark Wickens

Vérification bibliographique

Denis Santerre

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2015

Bibliothèque et Archives Canada, 2015

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF)

ISBN 978-2-550-73844-2 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2015

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Séquençage génétique des cancers. Validité et utilité cliniques des profils moléculaires obtenus à l'aide des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS). Note informative rédigée par Guylaine Rouleau avec la collaboration de Gino Boily. Québec, Qc : INESSS; 56 p.

L'Institut remercie les membres de son personnel qui ont contribué à l'élaboration du présent document.

Lecteurs externes

La lecture externe est un des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise propre.

Pour ce rapport, les lecteurs externes sont :

Alexandre Montpetit, Ph.D., Assistant Scientific Director, McGill University and Genome Quebec Innovation Centre.

Bartha Maria Knoppers, Ph.D., O.C., O.Q., FCAHS, Canada Research Chair in Law and Medicine, Director, Centre of Genomics and Policy, Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, McGill University.

Daniel Sinnott, Ph.D., Professeur Départements de pédiatrie et de biochimie, Université de Montréal. Titulaire de la Chaire de recherche FKV en oncogénomique pédiatrique, scientifique senior, Centre de recherche CHU Sainte-Justine.

D^r Fabien Calvo, M.D., Ph.D. Biologie humaine, Directeur Scientifique Cancer Care Europe.

D^r Gerald Batist, M.D., CM, FACP, Professor, Departments of Medicine and Oncology, McGill University. Director, Department of Oncology, McGill University. Director, McGill Centre for Translational Research in Cancer Lady Davis Institute for Medical Research, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital

D^r Guy Sauvageau, M.D., Ph.D., FRCP(c), Director, IRIC Université de Montréal. Canada Research Chair in Molecular Genetics of Stem Cells, IRIC, Université de Montréal

Jacques Simard, Ph. D., Chaire de recherche du Canada en Oncogénétique. Professeur titulaire, Département de médecine moléculaire, Université Laval. Directeur adjoint à la recherche fondamentale, Centre de recherche du CHU de Québec, Université Laval.

D^r Lambert Busque, M.D., FRCPC, Professeur agrégé de médecine, Université de Montréal. Directeur médical des laboratoires, Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

Thérèse Gagnon-Kugler, Ph.D., Présidente-directrice générale, Recherche PreThera/Innovation Exactis.

D^r Yves Robert, M.D., M.Sc., Secrétaire, Direction générale, Collège des médecins du Québec.

Remerciements

L'INESSS remercie toutes les personnes qui ont fourni des renseignements aux fins de la présente évaluation, notamment **M^{me} Sonia Cellot**, M.D., Ph.D., Unité de biologie moléculaire, CHU mère-enfant Ste-Justine.

Déclaration de conflit d'intérêts

L'INESSS ne déclare aucun conflit d'intérêts.

Responsabilité

L'INESSS assume l'entière responsabilité de la forme et du contenu définitifs de ce document. Les conclusions ne reflètent pas forcément les opinions des lecteurs externes ou des autres personnes consultées aux fins du présent dossier.

TABLE DES MATIÈRES

SUMMARY.....	i
SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ii
GLOSSAIRE	iii
INTRODUCTION.....	1
1 PRÉCISIONS SUR DES CONCEPTS CLÉS	2
1.1 Anomalies génétiques constitutionnelles et somatiques	2
1.2 Séquençage intégral et séquençage ciblé	3
1.3 Technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS).....	5
1.4 Interventions théranostiques.....	6
2 QUESTIONS D'ÉVALUATION	7
3 MÉTHODES.....	8
3.1 Cadre d'analyse et définition des dimensions étudiées.....	8
3.2 Recherche documentaire	8
4 RÉSULTATS	11
4.1 Études primaires.....	11
4.2 Études de synthèse.....	16
4.3 Résumés de conférences.....	21
4.4 Recherche sur les technologies de NGS	22
DISCUSSION	24
CONCLUSION.....	28
ANNEXE A STRATÉGIE DE RECHERCHE D'INFORMATION SCIENTIFIQUE SUR LE SÉQUENÇAGE GÉNÉTIQUE DES CANCERS.....	29
ANNEXE B DIAGRAMME DE SÉLECTION DES ARTICLES	31
ANNEXE C SITES WEB DES ORGANISMES CONSULTÉS ET DES DOCUMENTS PERTINENTS	32
ANNEXE D GRILLE CASP (CRITICAL APPRAISAL SKILLS PROGRAMME) D'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ MÉTHODOLOGIQUE D'UNE REVUE SYSTEMATIQUE.....	38
SIGNIFICANT MUTATED AND/OR DRIVER GENES AND SOME FUSED GENES FROM WHOLE-GENOME STUDIES IN CANCER [TUNA ET AMOS, 2013]	39
ANNEXE F DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES TECHNOLOGIES DE NGS ET BIOINFORMATIQUES	45
ANNEXE G RECHERCHE EN COURS SUR LE SÉQUENÇAGE GÉNÉTIQUE DES CANCERS À L'AIDE DES TECHNOLOGIES DE NGS	47
RÉFÉRENCES.....	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Résultats obtenus à l'aide des technologies classiques et d'une technologie de NGS	13
Tableau 2	Réponses aux thérapies ciblées associées à des mutations détectées à l'aide des technologies de séquençage génétique.....	15
Tableau 4	Validité analytique et validité clinique de trois panels de gènes de tumeurs solides	17
Tableau 5	Résultats préliminaires de l'utilité clinique des essais IMPACT et MOSCATO.....	20
Tableau C-1	Sites en évaluation des technologies et des médicaments.....	32
Tableau C-2	Sites en oncologie.....	35
Tableau C-3	Autres sites.....	37

SUMMARY

Gene Sequencing of Tumours

Clinical validity and utility of molecular profiles obtained by next-generation sequencing (NGS) technologies

Highlights

Most tumours result from somatic DNA mutation events or, more rarely, from constitutional genetic abnormalities. In both cases, next-generation sequencing (NGS) technologies may contribute to a better understanding of tumorigenesis. The clinical validity and utility of molecular profiles obtained with these technologies form the subject of this assessment, in which these two aspects are centered on a theranostic approach and defined by the ACCE analytical framework.

A few studies on the clinical validity and utility of NGS technologies were identified. They are one systematic review, two descriptive studies and a few narrative literature reviews, as well as some conference abstracts.

The parameter deemed most important for assessing their clinical validity is the ability to sequence genes using archived or biopsy specimens or surgical resection pieces with demonstrated clinical relevance. In this regard, these studies show that NGS technologies are able to detect mutations associated with chemosensitivity or resistance to certain anticancer drugs. Here, certain analytical parameters, such as concordance and false positives, quantitatively support their clinical validity.

Presently, the number of tumour mutations searched for to treat a given patient is limited in conventional clinical practice. Although high-throughput sequencing technologies are able to identify these mutations, their clinical utility, compared to that of the other gene-sequencing methods, is not apparent because of the required throughput. A rigorous efficiency analysis would be necessary before their clinical implementation.

The experimental approach consists in searching for several targetable mutations by sequencing a large gene panel, the exome or the genome, and in treating the patient with a drug off-label or in a clinical trial. Since the number of potential mutations is large, an NGS technology, thanks to its high-throughput capacity, is useful. Presently, the results are fragmentary, and the reported clinical benefits have been modest.

However, the preliminary results of ongoing studies are promising, and eventually, new data will guide the clinical management of tumours.

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AACR	American Association for Cancer Research
ACCE	Analytic validity, Clinical validity, Clinical utility, Ethical, legal and social implications
ACMTS	Agence canadienne des médicaments et des technologies de la santé
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AHRQ	Agency for Healthcare Research and Quality (États-Unis)
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCCA	British Columbia Cancer Agency
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CNV	<i>Copy number variation</i>
COSMIC	Catalogue of somatic mutations in cancer
DQC	Direction québécoise de cancérologie
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed, paraffin-embedded</i>
HAS	Haute Autorité de Santé (France)
INCa	Institut national du cancer (France)
INESSS	Institut national d'excellence en santé et en services sociaux
IOM	Institute of Medicine (États-Unis)
MSAC	Medical Services Advisory Committee (Australie)
MSSS	Ministère de la Santé et des Services sociaux
NCCN	National Comprehensive Cancer Network (États-Unis)
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHS	National Health Services (Royaume-Uni)
NICE	National Institute for Health and Care Excellence (Royaume-Uni)
TGS	<i>Targeted gene sequencing</i>
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WES	<i>Whole exoms sequencing</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>

GLOSSAIRE

Allèle

Chacune des différentes formes d'un même gène à un emplacement donné sur un chromosome.

Biomarqueur diagnostique

Caractéristique biologique qui est objectivement mesurée et évaluée dont la présence ou l'absence est nécessaire chez un individu pour diagnostiquer un état normal ou pathologique.

Chromatine

Substance de base des chromosomes, elle correspond à l'ADN, à l'ARN et aux protéines.

Codon

Unité du code génétique formée par un triplet de nucléotides azotés adjacents contenus dans l'ARN messager.

Couverture de séquençage/*Breadth of coverage*

Correspond au pourcentage du génome (ou de la séquence ciblée) couverte par les fragments séquencés.

Épigénétique

Ensemble des mécanismes moléculaires concernant le génome ainsi que l'expression des gènes, qui peuvent être influencés par l'environnement et les antécédents d'un individu.

Exome

Partie du génome constitué par les exons, c'est-à-dire les parties des gènes qui sont exprimées pour synthétiser les produits fonctionnels sous forme de protéines.

Facteur (marqueur) pharmacodynamique

Caractéristique de la réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique mesurée objectivement.

Facteur (marqueur) prédictif

Facteur influençant, par exemple, l'effet d'un traitement et dont l'aptitude à modifier le pronostic des patients est démontrée.

Facteur (marqueur) pronostique

Facteur de survenue d'un événement chez les sujets malades en l'absence d'un traitement.

FISH *fluorescence in situ hybridization*

Technique de cartographie génétique permettant de repérer une séquence d'ADN ou d'ARN au moyen d'une sonde de séquence spécifique complémentaire à celle qui est recherchée, dans laquelle l'hybridation est révélée par un signal fluorescent.

Génome

Totalité du matériel génétique porté par l'ensemble des chromosomes d'un organisme.

Locus

Emplacement physique précis sur un chromosome occupé par un gène ou une séquence d'ADN.

Insertion-délétion (indel)

Gain ou perte de quelques nucléotides par rapport à une séquence de référence.

Méthode de Sanger

Technique qui utilise la réaction de polymérisation de l'ADN avec une enzyme synthétisée artificiellement et des didésoxyribonucléotides.

Mutation

Changement d'une base dans une séquence de nucléotides.

Mutations germinales

Anomalies génétiques transmises d'un parent à un enfant par les gamètes au moment de la conception.

Mutations somatiques

Anomalies génétiques acquises qui se produisent dans les cellules et se manifestent après la conception.

Profondeur de séquençage/Depth of coverage

Lecture d'une même base à partir de différents fragments; une profondeur de lecture de 30x signifie que chaque base a été séquencée en moyenne 30 fois.

Réarrangement chromosomique

Anomalies génomiques résultant d'un point de cassure dans un chromosome qui introduit des changements structuraux dans les chromosomes.

Séquençage ciblé

Séquençage de régions codantes ou sélectionnées dans un sous-groupe de gènes relativement petit.

Séquençage à haut débit ou de nouvelle génération (NGS)

Ensemble de méthodes produisant des millions de séquences en une seule expérience. Elles se caractérisent par l'utilisation d'approches massivement parallèles, permettant de séquencer des centaines de milliers de fragments simultanément. Elles regroupent le séquençage intégral de génome ou d'exomes, des « panels », de gènes et du transcriptome.

Théranostique

Stratégie thérapeutique qui combine les approches thérapeutique et diagnostique.

Transcriptome

Ensemble des ARN issus de la transcription du génome.

Utilité clinique

Aptitude d'un test ou d'une méthode dont l'utilisation apporte un ou des bénéfices à un individu pour améliorer la prise en charge et optimiser les traitements.

Validité analytique

Aptitude d'un test diagnostique à mesurer le génotype d'intérêt avec exactitude et fiabilité; elle inclut la sensibilité et la spécificité analytiques, la reproductibilité, la robustesse et la satisfaction des contrôles de qualité.

Validité clinique

Aptitude d'un test diagnostique à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt; elle inclut la sensibilité et la spécificité cliniques ainsi que les valeurs prédictives positive et négative.

Variation du nombre de copies

Variations structurelles génomiques qui font augmenter (amplification) ou diminuer (délétion) le nombre de copies d'un gène ou d'une région donnée.

Variant

Changement dans la séquence d'ADN par rapport à un génome de référence qui peut ou non avoir des conséquences fonctionnelles.

Zone ciblée de gènes

Site d'un gène au niveau duquel des mutations se produisent avec une fréquence anormalement élevée (chimères, maladies résiduelles, polymorphismes).

INTRODUCTION

Au Québec, en 2015, le nombre de nouveaux cas de cancer était estimé à 50 100 selon les données de la Société canadienne sur le cancer¹. Ces nouveaux patients et leur famille entretiennent de l'espoir quant à l'évolution des connaissances scientifiques associées au génome humain et au développement de technologies et de médicaments prometteurs, susceptibles de leur offrir une meilleure chance de vaincre le cancer ou de prolonger leur vie et d'en améliorer la qualité.

De fait, l'essor des technologies génomiques et des thérapies ciblées permet, entre autres en oncologie, de repérer les gènes de susceptibilité aux cancers, de préciser un diagnostic ou un pronostic et d'optimiser la pharmacothérapie selon le profil génétique d'un individu. La détection d'anomalies génétiques au sein des cellules cancéreuses à l'aide de différentes technologies a mis en évidence des biomarqueurs dont la signification clinique est connue ou émergente. Le ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) et la Direction québécoise de cancérologie (DQC) entendent faire profiter les Québécois de ces découvertes et de ces avancées technologiques.

La DQC, une direction du MSSS, a demandé la contribution de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) pour déterminer les indications et les modalités d'encadrement optimal du séquençage génétique des cancers afin de se doter, notamment, de politiques et d'orientations en la matière. Dans un premier temps, la DQC demande d'évaluer la pertinence d'inclure le séquençage intégral des tumeurs et le séquençage ciblé dans l'arsenal théranostique en analysant certains aspects des dimensions de la validité et de l'utilité cliniques² dans le contexte du développement du séquençage génétique de nouvelle génération (NGS).

La présente note informative définit des concepts clés ainsi que la question d'évaluation et décrit les méthodes utilisées pour répondre à la requête de la DQC. Les résultats des recherches portant sur les dimensions « validité clinique » et « utilité clinique » sont rapportés puis analysés et font ensuite l'objet d'une conclusion.

¹ Société canadienne du cancer. Le cancer au Québec en bref, d'après les *Statistiques canadiennes sur le cancer* [site Web]. Disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics-publication/?region=qc> (consulté le 15 juin 2015).

² Les notions de validité clinique et d'utilité clinique sont définies dans la section qui porte sur les méthodes.

1 PRÉCISIONS SUR DES CONCEPTS CLÉS

La présente section donne un aperçu des notions générales qui portent sur les anomalies génétiques, le séquençage intégral et le séquençage ciblé des tumeurs, les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) et les interventions théranostiques.

1.1 Anomalies génétiques constitutionnelles et somatiques

Le génome d'un cancer est constitué de mutations constitutionnelles ou germinales et de mutations acquises ou somatiques.

Anomalies génétiques constitutionnelles ou germinales

Les mutations transmises d'un parent à un enfant par les gamètes sont des mutations héréditaires qu'on appelle aussi mutations de la lignée germinale. La transmission d'une mutation germinale peut se faire selon un mode dominant ou récessif. La transmission dominante se produit si un seul allèle muté, qui résulte d'un gène anormal transmis par un seul parent, est suffisant à la manifestation de la maladie. L'hérédité récessive signifie qu'une personne doit hériter des deux copies de la mutation génétique, c'est-à-dire que le gène anormal est transmis par les deux parents, pour être prédisposée au cancer³.

De plus, de nombreux polymorphismes génétiques constitutionnels qui affectent les gènes codants des enzymes, des transporteurs et des récepteurs ont été décrits ainsi que leurs conséquences sur l'effet d'un grand nombre de médicaments. Citons le polymorphisme du gène UGT1A1 et la toxicité accrue de l'irinotécan, dont la validité clinique est jugée acceptable [EGAPP Working Group, 2009], mais dont l'utilité clinique est jugée insuffisamment démontrée pour ce qui est de réduire la morbidité et la mortalité chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique [Palomaki *et al.*, 2009]. Les polymorphismes des gènes DPYD et TPMT (allèles TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3C) exposent les patients à un risque accru de toxicité au 5-fluorouracile et aux médicaments thiopuriques respectivement [INCa, 2014].

Moins de 10 % de l'ensemble des cancers présente une forme héréditaire; ainsi, seule une faible proportion de mutations responsables des cancers est présente dans la lignée germinale. Une littérature abondante fait état des gènes de susceptibilité dans lesquels des mutations et/ou des variations sont associées à un risque accru de développer certains types de cancers. En outre, plusieurs centaines de variations génétiques, dont le polymorphisme nucléotidique (SNP, sigle de l'anglais *single nucleotide polymorphism*) sont associées au développement de plusieurs types de cancers. Toutefois, le champ d'application des polymorphismes constitutionnels et des profils de risques génétiques n'est pas l'objet de la présente évaluation.

³ Société canadienne du cancer. Risque de cancer héréditaire [site Web]. Disponible à : http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/what-is-a-risk-factor/genetic-risk/inherited-cancer-risk/?region=on#Cancers_héréditaires (consulté le 1^{er} décembre 2014).

Mutations somatiques

Les mutations somatiques peuvent être de différents types, soit la substitution d'une base⁴ de l'ADN par une autre, l'insertion ou la délétion (indel) de quelques bases, les réarrangements de la séquence d'ADN, l'augmentation du nombre de copies (parfois plusieurs centaines) à partir des deux séquences présentes sur un génome diploïde normal ou la réduction du nombre de copies, allant jusqu'à l'absence d'une séquence d'ADN dans un génome de cancer. Une cellule cancéreuse peut aussi acquérir de toutes nouvelles séquences d'ADN à partir de sources exogènes, par exemple du génome d'un virus. Le génome d'une cellule cancéreuse peut comporter des modifications dites épigénétiques qui altèrent la structure de la chromatine et l'expression des gènes. Elles se manifestent au niveau de la séquence d'ADN par des changements du statut de méthylation de la cytosine et des modifications des histones. Ces modifications épigénétiques peuvent, dans certaines conditions, être soumises au même processus de sélection naturelle que les événements génétiques⁵. La présente évaluation porte donc principalement sur les mutations somatiques ou acquises qui représentent la majorité des mutations associées au développement des cancers [PHG Foundation, 2011].

Le cancer résulte d'une combinaison d'anomalies génétiques constitutionnelles et somatiques auxquelles s'ajoute une variabilité intra-individuelle et interindividuelle. L'hétérogénéité tumorale chez un même patient et l'évolution clonale des mutations somatiques de la tumeur primitive jusqu'aux lésions métastatiques complexifient la maladie et sa prise en charge [Bedard *et al.*, 2013a; Buettner *et al.*, 2013; Gerlinger *et al.*, 2012]. Dans certains cas, on peut observer une réponse partielle au traitement, l'émergence de résistance aux médicaments et l'apparition de sous-clones de cellules malignes [Aparicio et Caldas, 2013]. Les technologies de NGS offrent de nouvelles possibilités pour comprendre cette maladie complexe et évolutive, entre autres par le séquençage d'exomes, de transcriptomes ou, plus rarement, de tout le génome tumoral (séquençage intégral).

1.2 Séquençage intégral et séquençage ciblé

Le séquençage intégral du génome (*whole-genome sequencing* ou WGS) consiste à déterminer la composition en nucléotides du génome relativement à tout le matériel génétique d'une cellule. Le séquençage intégral d'un exome (*whole-exome sequencing* ou WES) détermine la composition en nucléotides (bases) d'un fragment d'ADN donné dans un exome représentant la totalité des régions de codage de protéines du génome en augmentant la couverture des régions d'intérêt par des technologies à haut débit [Dewey *et al.*, 2014; Frank *et al.*, 2013].

Séquençage intégral du génome des tumeurs

Le séquençage intégral du génome des tumeurs à l'aide des technologies de NGS caractérise les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP), les insertions et les délétions (indels) de quelques bases ainsi que les réarrangements de la séquence d'ADN, l'augmentation du nombre de copies, les variations structurelles et les variants non codants [Tuna et Amos, 2013; Koboldt *et al.*, 2010]. Cette approche permet une meilleure compréhension des variations génétiques dans les populations et du type d'anomalies génétiques et génomiques présentes dans le génome d'un cancer. Plusieurs études ont été publiées sur cette approche pour détecter, entre autres, les

⁴ Les quatre types de bases de l'acide désoxiribonucléique (ADN) sont l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G).

⁵ Programme de l'International Cancer Genome Consortium (ICGC), disponible à : <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Projets-europeens-et-internationaux/ICGC> (consulté le 4 novembre 2014).

mutations dites « conductrices » et les fusions dans des cancers (du poumon, du pancréas, du sein, de la prostate), des mélanomes, des leucémies, des neuroblastomes et des médulloblastomes [Tuna et Amos, 2013] de même que dans les myélomes multiples [Agnelli *et al.*, 2013] et les tumeurs gastriques [Yamamoto *et al.*, 2014] (voir l'annexe E). Les gènes de fusion résultent de translocations interchromosomales et d'aberrations intrachromosomales telles que les inversions, les délétions, les séquences répétées en tandem et l'épissage aberrant.

Toutefois, le séquençage intégral du génome des tumeurs a des limites sur le plan du coût et du temps comparativement au séquençage ciblé ainsi qu'un taux d'erreur plus élevé dans la détection de mutations comparativement au séquençage selon la méthode de Sanger [Tuna et Amos, 2013]. Ce type d'analyse pour investiguer les séquences non codantes d'un génome donne lieu à de longues listes de résultats (gènes, miRNAs, ou aberrations d'allèles) et entraîne des faux positifs [Agnelli *et al.*, 2013; Schrijver *et al.*, 2012]. Pour ces raisons, certains auteurs ont conclu que le reséquençage⁶ intégral du génome des cancers n'est pas rentable dans les études translationnelles et cliniques qui font appel à des échantillons de grande taille ou au séquençage par une lecture en profondeur d'échantillons individuels [Mylykangas et Ji, 2010].

Séquençage des exomes

Contrairement au séquençage intégral des génomes, qui permet de détecter les variants structuraux et non codants, le séquençage intégral des exomes tumoraux se limite à la détection des mutations conductrices ou non de gènes codants connus, soit les régions codantes qui affectent le fonctionnement des protéines.

Séquençage ciblé

Le séquençage ciblé ne vise que certains gènes et présente des avantages, dont la réduction de la charge de séquençage, limitée à une très petite portion du génome, ce qui permet de séquencer un plus grand nombre d'échantillons et une plus grande profondeur de lecture. Toutefois, le séquençage ciblé requiert un captage initial des exons sujet à ses propres biais analytiques [Tuna et Amos, 2013].

Applications du séquençage à haut débit

Les applications disponibles du séquençage à haut débit peuvent globalement se regrouper en quatre catégories : le séquençage (ou assemblage) de novo, le reséquençage, l'analyse du transcriptome (RNA-seq) et les analyses fonctionnelles (ChIP-Seq, MeDIP-Seq).

Le séquençage (ou assemblage) de novo

Le séquençage de novo consiste à fournir la séquence de génomes inconnus. La combinaison de plusieurs techniques d'analyse permet d'obtenir ainsi du matériel génomique de bonne qualité.

Le reséquençage

Le reséquençage est indiqué lorsque la séquence du génome de référence est déjà connue. Pour connaître les variations génomiques, l'échantillon à l'étude est comparé à celui de référence par un séquençage à haut débit. « Cette approche peut remplacer les méthodes traditionnelles d'hybridation génomique comparative (CGH) et permettre de préciser les diagnostics soit de façon préventive, soit de caractériser une pathologie déjà déclarée. Il est ainsi possible, par

⁶ Le reséquençage est décrit plus loin, dans la section portant sur les applications du séquençage à haut débit.

exemple, de typer ou de suivre l'évolution des tumeurs cancéreuses chez les patients » [AFSSAPS, 2011].

L'analyse du transcriptome (RNA-Seq)

Le séquençage du transcriptome (RNA-Seq), qui est de plus en plus utilisé, consiste à séquencer tout l'ARN messager des cellules cancéreuses. Cette approche permet une appréciation des mutations, étant donné que les ARN messagers sont dérivés des exons et donne une idée des profils d'expression des gènes, autant sur l'abondance que sur la composition des gènes transcrits. Il est possible de mettre en évidence des variations structurelles, notamment les produits des fusions exprimés.

Les analyses fonctionnelles (ChIP-Seq, MeDIP-Seq)

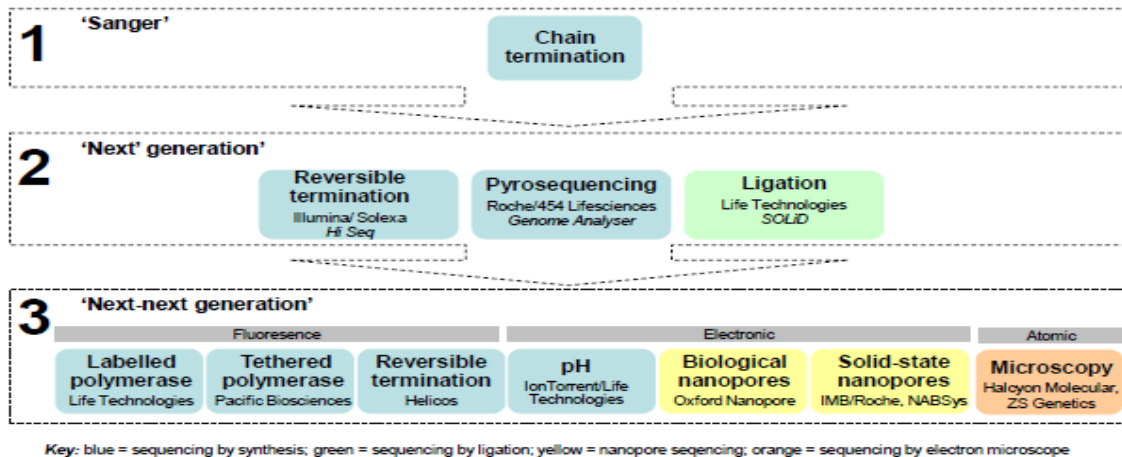
Dans le domaine de la génomique fonctionnelle, on cherche à quantifier le nombre et le type d'éléments biologiques présents au lieu de chercher à connaître la séquence d'ADN des échantillons. « Il est, par exemple, possible de connaître les régions de l'ADN où se fixent les facteurs de transcription (ChIP-Seq) et de déterminer les modifications épigénétiques d'un génome en cartographiant ses sites de méthylation (MeDIP-Seq) » [AFSSAPS, 2011].

1.3 Technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS)

Plusieurs outils technologiques sont commercialisés et permettent le séquençage intégral du génome ou des exomes ou encore de régions ciblées.

Le premier séquençage intégral du génome d'un cancer a été rapporté en 2008 [MacConaill, 2013]. Les technologies de séquençage de nouvelle génération ont émergé à cette période et s'ajoutent en complément de la méthode de séquençage direct de première génération, soit la méthode de Sanger [Meyerson *et al.*, 2010]. Les trois principales technologies à haut débit offertes sur le marché sont le pyroséquençage, le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles et le séquençage par ligature. Les outils simplifiés de NGS, connus sous l'appellation populaire de « séquenceurs de paillasse », sont également commercialisés et d'intérêt pour diminuer les délais de réponse à la suite d'une recherche de mutations somatiques à des fins cliniques [Rodrigues et Gomez-Roca, 2013]. La FDA a approuvé récemment la technologie de séquençage à haut débit Illumina MiSeqDx pour réaliser certains tests diagnostiques [Sheridan, 2014]. Une nouvelle génération de séquenceurs se profile et fait appel, entre autres, à une technologie de séquençage par nanopore, qui permet le séquençage direct de molécules uniques et rend ainsi superflu le marquage fluorescent, étant donné que chaque nucléotide émet un signal électrique spécifique [De Cremoux, 2012; Glenn, 2011; PHG Foundation, 2011].

Figure 3.2: Summary of first, second and third DNA sequencing generations
Sequencing chemistries and some of the leading commercial developers are indicated



Source : PHG Foundation, 2011, p. 20.

Ces technologies de NGS assurent un séquençage massif de millions de fragments d'ADN en parallèle (plusieurs milliards de bases) en un temps réduit. Chaque technologie de NGS présente des caractéristiques fonctionnelles particulières, par exemple une meilleure spécificité lors des mutations ponctuelles (séquençage direct ou *shotgun*), des réarrangements de grande taille (séquençage « en paire » des deux extrémités (*mate-paired*) ou après circularisation de l'ADN) ou lors des répétitions. Les performances techniques, les avantages, les limites et les coûts de ces différentes technologies et leurs aspects techniques sont décrits dans plusieurs publications et ne font pas l'objet de la présente note informative [ACMTS, 2014; MacConaill, 2013; Rodrigues et Gomez-Roca, 2013; Loman *et al.*, 2012; Rizzo et Buck, 2012; Glenn, 2011; Meldrum *et al.*, 2011; Ross et Cronin, 2011; Meyerson *et al.*, 2010].

1.4 Interventions théranostiques

Grâce à la profondeur de lecture du séquençage, les technologies de NGS peuvent révéler des mutations connues ou inédites et de nouvelles cibles thérapeutiques [Woollard *et al.*, 2011]. En complément du diagnostic et des facteurs pronostiques anatomocytopathologiques, ces biomarqueurs précisent, entre autres, le diagnostic, le choix et la surveillance du traitement de tumeurs.

Par exemple, les anticorps monoclonaux anti-récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF, sigle de l'anglais *epidermal growth factor*) ont révolutionné la prise en charge des personnes atteintes de cancer colorectal métastatique. Toutefois, des études ont montré que seuls les patients dont la tumeur ne présentait pas la mutation du gène KRAS pouvaient bénéficier de ce traitement. L'analyse du gène KRAS est recommandée avant de prescrire les antirécepteurs du EGF, dont le cétuximab [IOM, 2012]. Cette stratégie, qui combine les approches diagnostique et thérapeutique, représente un exemple d'intervention théranostique où le séquençage ciblé trouve sa pertinence clinique.

2 QUESTIONS D'ÉVALUATION

Les enjeux décisionnels qui se posent à la Direction québécoise de cancérologie (DQC) ont été décrits en détail dans deux notes de cadrage ainsi que dans un document de réflexion produits précédemment à l'intention de cette direction. Les commentaires reçus ont permis de déterminer les éléments prioritaires de l'évaluation et ceux-ci se résument comme suit :

- Fournir un encadrement scientifique, notamment en ce qui a trait à :
 - la validité clinique des méthodes de séquençage génétique à haut débit, soit le séquençage intégral du génome et des exomes tumoraux ainsi que le séquençage ciblé de groupes de gènes utilisés à des fins thérapeutiques ;
 - l'utilité clinique des méthodes de séquençage génétique à haut débit des cancers en matière d'avantages cliniques.

Plus spécifiquement, la question d'évaluation s'énonce ainsi :

- Population :** Patients adultes atteints de cancers hématologiques ou de tumeurs solides issus de mutations somatiques.
- Interventions :** Technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) à haut débit utilisées en clinique pour le séquençage intégral du génome ou des exomes tumoraux ou le séquençage ciblé de groupes de gènes; interventions à visée thérapeutique.
- Compareurs :** Autres technologies de séquençage génétique et approches thérapeutiques, par exemple une chimiothérapie cytotoxique prescrite d'après la localisation tumorale et le type histologique.
- Résultats :** Sensibilité clinique, spécificité clinique, valeurs prédictives positive et négative, taux de survie globale, taux de survie sans progression, taux de récurrence, modification de l'effet du traitement, chimiosensibilité, réponse complète au traitement, réponse partielle au traitement, chimiorésistance, nombre d'événements évités ou induits et suivi de maladies résiduelles.

3 MÉTHODES

3.1 Cadre d'analyse et définition des dimensions étudiées

Afin de répondre aux questions posées, le cadre conceptuel ACCE⁷ est mis à profit pour guider le choix des dimensions étudiées en priorité, soit la validité clinique et l'utilité clinique des méthodes de séquençage des technologies de NGS. Centrée sur l'approche diagnostique, la validité clinique d'un test correspond à son aptitude à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt. La validité clinique inclut la sensibilité et la spécificité cliniques ainsi que les valeurs prédictives positive et négative. L'utilité clinique d'un test diagnostique concerne son aptitude, évaluée en événements cliniques mesurables, à améliorer le pronostic des patients et à apporter une valeur ajoutée sur le plan de l'optimisation de décision de traitement et en corollaire de stratégies thérapeutiques. Ces définitions sont adoptées aux fins de la présente note informative. Par ailleurs, les données sur la concordance analytique seront considérées lorsqu'elles sont disponibles.

Trois principales sources de données sont mises à contribution : 1) une revue de la littérature scientifique; 2) la consultation de documents complémentaires provenant de la littérature grise; 3) la consultation d'intervenants clés, notamment des spécialistes en hématologie et en génomique.

3.2 Recherche documentaire

Une stratégie de recherche a été construite sur des cycles itératifs utilisant la combinaison simple des mots-clés suivants : *clinical validity*, *clinical utility*, *prospective trials* (voir l'annexe A). La recherche documentaire a été effectuée dans les principales bases de données et couvre la période de janvier 2008 à août 2014 (MEDLINE par l'intermédiaire de PubMed, EBM Reviews (Cochrane et bases CRD), Embase, et Google Scholar) (voir l'annexe B). Seuls les articles publiés en français et en anglais ont été retenus.

La bibliographie des articles retenus a été consultée afin de repérer de nouvelles sources. Des contacts ont été établis et maintenus avec la DQC pour préciser la requête et des articles scientifiques ont été échangés et considérés. Enfin, d'autres documents ont été obtenus à la suite de recherches manuelles (*snowball technique*) et dans la littérature grise disponible dans Internet jusqu'en mai 2015 (voir l'annexe C).

Des critères d'inclusion et d'exclusion rigoureux ont été nécessaires pour circonscrire la recherche documentaire et répertorier les études les plus pertinentes pour répondre à la question posée, à savoir l'examen de la validité et de l'utilité cliniques du séquençage génétique à haut débit des cancers.

⁷ Centers for Disease Control and Prevention. Genomic testing: ACCE model process for evaluating genetic tests [site Web]. Disponible à : <http://www.cdc.gov/genomics/gtesting/ACCE/index.htm> (consulté le 13 mai 2014).
ACCE : Analytic validity, Clinical validity, Clinical utility and associated Ethical, legal and social implications.

Critères d'inclusion

La revue de la littérature se limite aux patients adultes atteints de tumeurs solides ou de néoplasies hématologiques issus d'anomalies de l'ADN nucléaire permettant de détecter les mutations somatiques ou les biomarqueurs assurant une optimisation thérapeutique. Les applications disponibles et d'intérêt pour le séquençage à haut débit sont celles qui sont décrites dans la section 1.2.

La hiérarchie des preuves a été mise à profit pour ne retenir que les études qui adoptent les devis méthodologiques les plus robustes, soient les études cliniques comparatives, les études prospectives et les études de synthèse, telles que les revues systématiques. À moins de fournir des données pertinentes sur les technologies NGS, les essais de stratégies ou les devis d'études de type ciblé n'ont pas été retenus [Simon, 2010].

Les rapports provenant d'agences d'évaluation des technologies et des médicaments et ceux des organismes en oncologie ainsi que quelques résumés de conférences, notamment de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO, 2012 à 2014) ont été consultés et utilisés pour clarifier des notions complexes ou expliquer les applications cliniques futures des technologies NGS.

Critères d'exclusion

À moins de servir d'outils de comparaison, les technologies suivantes ont été exclues, soient celles utilisées pour l'expression génique (biopuces d'ADN ou de transcriptome), pour le génotypage à l'aide d'une technologie autre que NGS (SNP et microsatellites), pour la méthylation de l'ADN (Sequenom), pour la cytogénétique (CGH, TaqMan) et pour la protéomique. Aussi, les études sur les technologies de NGS couplées à des techniques d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP-seq) ou de l'analyse de la méthylation de l'ADN et les analyses du transcriptome (RNA-Seq) n'ont pas été retenues.

Les études portant sur les cancers héréditaires ou sur la susceptibilité de développer un cancer et sur les cancers pédiatriques ou rares sont également exclues de même que celles sur la pharmacogénétique constitutionnelle. Soulignons que l'INESSS a produit des avis sur le séquençage direct de quelques cancers, lesquels ne sont pas inclus mais peuvent être consultés sur Internet⁸.

⁸ Avis sur les mutations du domaine kinase de la protéine de fusion BCR-ABL, disponible à :

https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Decembre_2014/INESSS_Avis_Ministre_analyses_bio_med_dec_2014_4.pdf.

Panel leucémie prédisposition familiale : séquençage des gènes RUNX1 (AML1), PAX5 et TP53, disponible à :

https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Decembre_2014/INESSS_Avis_Ministre_analyses_bio_med_dec_2014_8.pdf.

Panel de mutations des gènes BRCA 1/BRCA 2 – population de l'Europe de l'Est, disponible à :

https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2014/INESSS_Avis_ministre_analyses_biologie_medecale_juin_2014_3.pdf.

Recherche de mutations ciblées dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (K27M et G34V/R dans H3.3, K27M dans H3.1 et V600E dans BRAF), disponible à :

https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Decembre_2014/INESSS_Avis_Ministre_analyses_bio_med_dec_2014_6.pdf.

Cancer du sein et du pancréas – Recherche de l'allèle Q775X du gène PALB2 par RFLP et recherche de mutations du gène PALB2 par HRM et séquençage direct, disponible à :

https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Decembre_2013/INESSS_Cancer_du_sein_et_du_pancreas.pdf.

Bien qu'ils soient nombreux, seuls les webinaires, résumés et rapports de conférence qui contenaient des renseignements spécifiques sur les technologies de NGS⁹ ont été retenus.

Sélection des études

La sélection préliminaire des études primaires et de synthèse a été réalisée par l'auteure à partir des titres et des résumés. Dans plus d'une centaine de cas, il a fallu procéder à la lecture de la publication par deux évaluateurs pour compléter la sélection. Le diagramme de sélection des documents concernant chaque base de données est présenté dans l'annexe B.

Qualité méthodologique

Vu la particularité des interventions théranostiques, la rareté et la variabilité des approches adoptées dans les études qui explorent les liens entre les technologies de NGS et les dimensions « validité clinique » et « utilité clinique », il n'était pas possible d'utiliser une méthode d'évaluation de la qualité méthodologique des études primaires repérées. Toutefois, deux principes méthodologiques ont été respectés pour justifier l'inclusion de ces études dans la présente note informative, soit: 1) la nécessité de traiter de façon précise de l'une ou l'autre des dimensions évaluées relativement aux technologies de NGS et 2) la conformité aux paramètres méthodologiques jugés incontournables, particulièrement ceux relatifs à la robustesse de la validité interne.

Ainsi, le premier principe a permis de réaliser une sélection préalable des études à partir de la lecture des résumés et parfois, du texte intégral de l'article. Quant au deuxième principe, il a servi à déterminer dans quelle mesure les paramètres de réalisation de l'étude ont été respectés, notamment la clarté de la question d'évaluation, la méthodologie adoptée, la pertinence, la précision des résultats obtenus, leur analyse et leur rapport direct avec la question posée. L'objectif de cette démarche méthodologique est de s'assurer de l'adéquation des principes de la validité interne de ces études et de réduire au minimum les biais qui pourraient en découler.

Par ailleurs, la qualité méthodologique des études de synthèse a été évaluée à l'aide des critères de la grille d'évaluation CASP (Critical Appraisal Skills Programme)¹⁰.

⁹ Cisco WebEx, GenomeWebinars. Novel applications of NGS in cancer diagnostics [site Web]. Disponible à : <https://genomeweb.webex.com/genomeweb/lr.php?RCID=6734ae7d73ec59b21a7db3880186879f> (consulté le 19 novembre 2014).

¹⁰ Critical Appraisal Skills Programme (CASP) [site Web], disponible à : <http://www.casp-uk.net/> (consulté le 21 novembre 2014).

4 RÉSULTATS

Parmi les articles repérés, deux études descriptives primaires ont comparé les résultats de tests moléculaires réalisés à l'aide de différents outils technologiques, y compris les technologies de nouvelle génération. Une revue systématique de la littérature, de qualité méthodologique moyenne (voir l'annexe D), fait état de la validité clinique, ainsi que l'ont définie les fournisseurs, relative à trois *panels* de gènes faisant appel aux technologies de NGS; deux revues narratives rapportent des données préliminaires sur les études en cours intégrant les outils technologiques de séquençage à haut débit et, enfin, des résumés et des conférences rapportent des expériences réalisées à l'aide des technologies de NGS.

4.1 Études primaires

Deux études primaires portent entre autres, sur des marqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique déterminant l'accès à une thérapie ciblée en comparant les résultats des analyses moléculaires obtenues à l'aide d'une technologie de NGS [Han *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2012].

Première étude primaire

Les résultats de tests moléculaires classiques de détection des anomalies génétiques ont été comparés à ceux produits à l'aide d'une technologie de NGS [Han *et al.*, 2014]. Les échantillons d'ADN ont été prélevés chez 53 adultes non fumeurs atteints d'un adénocarcinome du poumon. L'étude visait à prédire la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, sigle de l'anglais *epidermal growth factor receptor*). Selon ces auteurs et d'autres publications, près de 90 % des mutations EGFR sont des délétions dans l'exon 19 (19DEL) ou une mutation ponctuelle dans l'exon 21 (L858R) et induisent une sensibilité des cellules tumorales aux ITK-EGFR [Danesi *et al.*, 2008]. D'autres anomalies génétiques (KRAS, BRAF, ALK, RET, ROS1 et PIK3CA) trouvées dans l'adénocarcinome du poumon peuvent aussi modifier la réponse aux ITK-EGFR.

Description des échantillons, des tests et des technologies

Le prélèvement de l'ADN en quantité et en qualité suffisantes a été possible chez 40 femmes et 8 hommes à partir de tissus fixés dans le formaldéhyde et enrobés de paraffine (FFPE, sigle de l'anglais *formalin-fixed, paraffin-embedded*). La concentration moyenne d'ADN était de 382,04 ng/ μ L (10,2 à 2 936,8 ng/ μ L) et la pureté, de 1,7 à 2,1¹¹. Les mutations EGFR (exon 18 à 21) ont été détectées à l'aide d'une technologie classique en amplifiant d'abord la région ciblée par une amplification en chaîne par polymérase (PCR, sigle de l'anglais *polymerase chain reaction*), puis par un séquençage de l'ADN. Les acides peptidonucléiques (APN)¹² ont également été utilisés pour détecter les mutations EGFR, 7 variants KRAS, 1 variant BRAF et 11 variants PIK3CA. Les

¹¹ Rapport de l'absorbance [A] à 260 nm/A 280 nm, estimation de l'enrichissement de l'ADN par rapport à la présence de protéines.

¹² Les APN (en anglais PNA ou *peptide nucleic acids*) sont des molécules de synthèse, analogues des acides nucléiques, dans lesquelles le squelette phosphodiester a été remplacé par une chaîne pseudopeptidique sur laquelle viennent se fixer les bases puriques et pyrimidiques. Du fait de cette structure, les molécules d'APN ne sont pas chargées et s'apparient aux séquences d'acides nucléiques avec une remarquable affinité et une très forte spécificité. De plus, les APN présentent une remarquable stabilité et une excellente résistance aux protéases et aux nucléases. Depuis leur mise au point en 1991, les APN ont été incorporées dans de nombreux protocoles d'études et de diagnostics génétiques relatifs à la recherche de mutations, à la coupure dirigée de l'ADN ou à la thérapie génique.

réarrangements du gène ALK ont été détectés par hybridation in situ en fluorescence (FISH, sigle de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*) tandis que les fusions ROS1 et RET l'ont été à l'aide d'une stratégie combinant une transcription inversée et une PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) avec 13 amorces. Quant à la technologie de NGS, elle couvre 739 mutations de 46 gènes du cancer (Ion AmpliSeq Cancer Panel, Life Technologies).

Résultats des analyses

Chez les 53 patients admissibles ayant reçu le gefitinib ou l'erlotinib après une récurrence de cancer du poumon postchirurgicale, des échantillons d'ADN de 48 patients, prélevés pendant une chirurgie, ont été analysés. Les échantillons prélevés chez 12 patients qui ne répondaient que peu ou pas aux médicaments ont été exclus. Au total, 25 anomalies du gène EGFR ont été détectées à l'aide des méthodes classiques¹³ (19DEL : n = 10; L858R : n = 9; G719X : n = 1; mutation double : n = 4 et 1 variant L858R détecté simultanément avec 1 mutation du gène PIK3CA : n = 1). Des mutations de KRAS (codon 12 : n = 4) et des réarrangements EML4-ALK (n = 3); KIF5B-RET (n = 2) et CD74-ROS1 (n = 2) ont été repérées à l'aide de tests moléculaires classiques. Les 31 échantillons qui présentaient une mutation activatrice de l'EGFR (19 DEL ou L858R) ou ne présentaient aucune des mutations susmentionnées ont été répartis dans 4 groupes et testés à l'aide d'une technologie de NGS (Ion Torrent *deep-amplicon sequencing*, Life Technologies) (voir le tableau 1 ci-dessous et l'annexe F description en anglais).

Données sur la validité clinique et l'utilité clinique

La technologie de NGS servait à prédire la sensibilité des cellules tumorales aux ITK-EGFR de même que la survie sans progression. Trois mutations PIK3CA E542K additionnelles ont été détectées à l'aide de la technologie de NGS, dont deux détectées simultanément avec le variant L858R. Tous les patients qui présentaient une mutation PIK3CA E542K ont développé une résistance primaire aux ITK-EGFR. Deux mutations additionnelles KRAS (codon 12) ont été rapportées dans le groupe 3 résistant primaire aux ITK-EGFR. Le taux de réponse aux ITK-EGFR et la survie médiane sans progression étaient meilleurs en présence des variants du gène EGFR 19DEL et L858R. La survie médiane sans progression était de 9,1 mois dans le groupe répondant au traitement ciblé en présence des mutations du gène EGFR (G1) comparativement à 5,5 mois chez les répondants sans les anomalies susmentionnées (G4). Chez les résistants, la survie médiane était comparable dans les deux groupes (G3 : 1,8 mois comparativement à G2 : 1,6 mois). Ces résultats sont résumés dans le tableau 1.

¹³ Les méthodes classiques sont décrites dans la section *Description des échantillons, des tests et des technologies*.

Tableau 1 Résultats obtenus à l'aide des technologies classiques et d'une technologie de NGS

Groupe	Nombre de tumeurs	Tests classiques ¹⁴ Mutations ou variants	Réponse Tx ciblé #	SSP (mois)	Technologie de NGS	
					Mutations déjà détectées	Mutations additionnelles (n)
G 1	15	EGFR/19DEL ou L858R	Sensible*	9,1	EGFR 19DEL ou L858R toutes confirmées	EGFR (exon 13, 20 et 21) Sous-groupe MLH1 V384D (n = 3) STK11 F354L (n = 3)
G 2	4	EGFR/19DEL ou L858R	Résistance primaire**	1,6	EGFR L858R confirmées sauf une	PIK3CA et EGFR L858R (n = 1)
G 3	8	Aucune§	Résistance Primaire**	1,8	Aucune	KRAS codon 12 (n = 2) PIK3CA E542K (n = 1) PIK3CA et EGFR L858R (n = 1)
G 4	4	Aucune§	Sensible*	5,5	Aucune	EGFR exon 19 (n=1)

gefitinib, erlotinib

§ aucune des anomalies détectées à l'aide des tests classiques relativement aux gènes EGFR (19DEL, L858R, G719X) et PIK3CA, aux mutations KRAS (codon 12) et aux maladies stables

** progression du cancer

Tx : traitement

SSP : survie médiane sans progression du cancer

Données sur la validité analytique

Toutes les mutations du gène EGFR détectées à l'aide des tests classiques ont été confirmées à l'aide de la technologie de NGS dans les groupes 1 et 2 (sauf 1 mutation EGFR L858R). La technologie de NGS a permis de repérer des mutations additionnelles dans les quatre groupes. Les nouvelles mutations des gènes EGFR, KRAS et PIK3CA, qui n'ont pas pu être détectées à l'aide du séquençage selon la méthode de Sanger mais qui l'ont été à l'aide de la technologie de NGS, ont été vérifiées à l'aide d'une autre méthode (séquençage direct de la PCR ou inhibition de la PCR par fixation de l'APN). Toutes les mutations sont confirmées, sauf une mutation PIK3CA, soit le variant E542K (détecté dans 17 % des 2 107 fragments lus). La concordance entre les résultats des tests moléculaires classiques et ceux obtenus à l'aide de la technologie de NGS était respectivement de 90,3 %, 93,5 % et 90,3 % relativement aux mutations EGFR, KRAS et PIK3CA.

Seconde étude primaire

La faisabilité clinique du séquençage génétique des cancers a été évaluée selon cinq critères, soit : 1) le recrutement de plus de 50 % des patients (acceptabilité); 2) l'obtention d'une quantité suffisante d'ADN prélevée chez plus de 90 % des patients (qualité des échantillons); 3) l'analyse moléculaire complète chez plus de 90 % des patients (profil moléculaire produit avec succès dans un laboratoire clinique); 4) la production d'un rapport dans moins de 21 jours de calendrier, y compris les fins de semaine, depuis le consentement du patient, et ce, concernant plus de 90 % des participants (rapidité) et 5) la détection des mutations chez plus de 30 % des patients (utilité) [Tran *et al.*, 2012]. Tous les paramètres ont été probants, sauf l'obtention en moins de 21 jours des résultats de plus de 90 % des participants. La disponibilité des résultats se situait dans un délai de 21 jours dans une proportion de 62 %.

Les profils moléculaires provenaient d'échantillons archivés et de biopsies par aspiration (3 à 6 biopsies par patient) obtenus de tumeurs solides ayant évolué vers des stades avancés chez 50 patients. Deux technologies ont été utilisées, soient le séquençage d'exons au moyen d'une

technologie de NGS (Pacific Biosciences PacBioRS) et le génotypage à l'aide de l'outil Sequenom MassARRAY.

Description des patients, des échantillons prélevés, des analyses et des technologies

Parmi les 50 patients, 92 % présentaient un statut de performance ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0 à 1 et un nombre médian de trois lignes de chimiothérapie. La plupart des biopsies ont été réalisées par guidage radiologique (72 %) sur des tissus mous (30 %) et le foie (28 %). Les tumeurs colorectales ont été prélevées le plus souvent (18 %), suivies de celles du sein (16 %) et des ovaires (16 %), étant donné la participation plus importante des femmes (58 %). L'étude rapporte 6 réactions indésirables à la suite du prélèvement, soit 3 plaintes de douleur, 1 ecchymose, 1 saignement et 1 infection de plaie, de même que 2 complications de grade 2, soit 1 pneumothorax et 1 cellulite.

La quantité médiane d'ADN était plus importante dans les échantillons archivés (9,5 µg (0,6 µg à 103,0 µg)) que dans les biopsies (3,9 µg (0,09 µg à 88,2 µg)) et la cellularité tumorale médiane était de 60 %. La technologie Sequenom MassARRAY et le Panel OncoCarta v1.0 (24 tests multiplex) permettait de détecter 238 mutations dans 19 oncogènes. Au laboratoire de recherche, l'approche technologique de NGS a d'abord été validée sur 30 échantillons sanguins et archivés. De 300 ng à 400 ng d'ADN ont été amplifiés par PCR de manière à produire 63 amplicons de 60 exons contenant les 238 mutations du Panel OncoCarta v 1.0. La taille moyenne des amplicons était de 340 bp (230 bp à 442 bp) et la profondeur de lecture moyenne de séquençage était de 600 X (114 X à 972 X). Les analyses moléculaires ont été effectuées avec succès, sauf le séquençage réalisé à l'aide de la technologie NGS, lequel a échoué par manque d'ADN dans 1 biopsie et la dégradation de l'ADN dans 3 échantillons archivés. D'autres détails sur la technologie de NGS et bioinformatiques sont fournis dans l'annexe F.

Données sur la validité clinique et l'utilité clinique

Toujours dans la seconde étude primaire, 19 mutations ciblables ont été détectées chez 16 patients (32 %), dont 6 ont bénéficié d'une thérapie ciblée. Après un suivi médian de 3 mois, 3 patients ont présenté une réponse partielle (RP) au traitement et dans 1 autre cas, une stabilisation du cancer (CS) a été observée. En revanche, 2 cas de progression du cancer (PC) ont été rapportés (voir le tableau 2).

Tableau 2 Réponses aux thérapies ciblées associées à des mutations détectées à l'aide des technologies de séquençage génétique

Sexe	Age	ECOG	Site primaire	Cancer mét. (mois)	Lignes (n) Tx antérieurs	Chimiothérapies systémiques antérieures	Site de prél. biopsie	Site de prél. tissu archivé	Temps entre biopsie et tissu archivé (mois)	Mutation	Thérapies associées	Meilleure réponse (RECIST) Suivi 3 mois
F ¹	69	0	CCR	33	4	5-FU, Leucovorin Oxaliplatine Irinotécan Bévacicumab	Foie mét.	CCR primaire	33	PIK3CA E542K	Inhibiteurs PIK3+MEK Cetuximab Irinotécan	PC
F	46	1	Sein	9	3	Doxorubicine Cyclophosphamide Paclitaxel Trastuzumab Lapatinib Capécitabine Navelbine	Sein primaire	Sein primaire	31	PIK3CA H1047R	Inhibiteurs PIK3+MEK	PC
F	53	0	Ovaire	21	2	Paclitaxel Carboplatine Inhibiteur Y-synthétase	Sous-cutané mét.	Sous-cutané mét.	21	KRAS G12D	Inhibiteurs PIK3+MEK	RPc
F	48	0	Sein	12	4	5-FU Épirubicine Cyclophosphamide Docétaxel Trastuzumab Tamoxifène Lapatinib Létrozole Capécitabine	Sein primaire	Sein primaire	15	AKT1 E341K ²	Inhibiteurs mTOR+ Paclitaxel + Trastuzumab	CS
M	57	1	CMT	42	2	Inhibiteur MET-VEGFR2, Inhibiteur NOTCH Cédaribine Radiothérapie	Foie mét.	GL mét.	38	RET M918T	Sorafénib	RPnc
M	67	0	CPI	12	1	Docétaxel Cisplatine 5-FU	GL mét	GL mét	12	EGFR Q787L ²	Erlotinib	RP

CCR : cancer colorectal; CMT : cancer médullaire de la thyroïde; CPI : carcinome à cellules épidermoïdes d'origine primaire inconnue; CS : cancer stable; ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group; 5-FU : 5-Fluorouracil; GL : ganglions lymphatiques; mét. : métastatique; PC : progression du cancer; prél. : prélèvement; RECIST : critères d'évaluation de la réponse tumorale (response evaluation criteria in solid tumors); RP : réponse partielle; RPc : réponse partielle confirmée; RPnc : réponse partielle non confirmée; Tx : traitement.

1 Tests moléculaires sur un échantillon d'une biopsie de métastases hépatiques et sur un échantillon de tissu archivé ayant permis de détecter 1 gène KRAS de type sauvage et 1 gène KRAS muté (4 %) sur un échantillon additionnel de tissu archivé.

2 Mutations hors panels de gènes OncoCarta

3 Les critères d'évaluation de la réponse tumorale, ou RECIST, se définissent comme suit :

PC (progressive disease) : progression du cancer équivalant à au moins 20 % de la somme des plus grands diamètres des lésions cibles ou par l'apparition de nouvelles lésions;

RP (partial response) : réponse partielle au traitement équivalant à une diminution d'au moins 30 % de la somme des plus grands diamètres des lésions cibles;

CS (stable disease) : cancer stable en l'absence des critères RP et PC.

Données sur la validité analytique

La concordance entre les deux outils technologiques a été de 100 % (42/42 mutations) concernant les biopsies et de 95 % (35/37 mutations) concernant les échantillons archivés. La technologie de NGS n'a pas permis de détecter 1 mutation (PIK3CA) qui avait été détectée à l'aide de l'outil Sequenom MassARRAY et confirmée par le laboratoire. Dans 1 autre cas, la technologie de NGS a permis de détecter 1 mutation (FGFR3) qui n'avait pas été détectée à l'aide de l'outil Sequenom MassARRAY ni confirmée par le laboratoire. Les résultats relatifs aux échantillons archivés et aux biopsies étaient les mêmes dans 88 % des cas (30/34); 3 mutations somatiques n'avaient pas de fonction connue (PDGFRA R718W, AKT1 E341K, EGFR Q787L).

4.2 Études de synthèse

La stratégie de recherche a permis de repérer trois études de synthèse, soit une revue systématique [Marrone *et al.*, 2014] et deux revues narratives [Hollebecque *et al.*, 2014; Bedard *et al.*, 2013a].

Revue systématique

Une revue systématique a répertorié trois *panels* de gènes de tumeurs solides séquencés à l'aide des technologies de NGS dans le GAPP Knowledge Base (Solid Tumor Mutation Panel (Arup Laboratories); SuraSeq^{MC} (AssuraGen); FoundationOne^{MC} (Foundation Medicine)). La revue a été complétée par une recherche des revues systématiques et des guides dans MEDLINE par Pubmed¹⁴ [Marrone *et al.*, 2014]. Les auteurs de cette revue systématique ont aussi consulté un site Internet sur les études en cours (ClinicalTrials.gov) et les sites Web des fournisseurs pour documenter la validité analytique, la validité clinique et l'utilité clinique; les panels de gènes élaborés dans les laboratoires des centres d'oncologie et de recherche ont été exclus de leur recherche documentaire.

Données sur la validité clinique et l'utilité clinique

Selon la définition donnée par les fournisseurs, la validité clinique correspond à l'aptitude des panels de gènes à détecter des variants ciblables. Cependant, l'utilité clinique n'y est pas spécifiée. Les sites Web ne font pas état de preuves directes d'association entre les variants et la réponse à un traitement. La validité clinique de deux panels de gènes n'est pas spécifiée. Le dernier panel permet de détecter au moins 1 variant ciblable dans 76 % des échantillons. Ces données sont présentées dans le tableau 4.

¹⁴ Mots clés de la stratégie de recherche des auteurs : (((neoplasms/therapy [mh]) OR (neoplasms/genetics [mh]) OR (neoplasms/diagnosis [mh])) AND ((tumor markers, biological/genetics [mh]) OR (molecular targeted therapy/methods [mh]) OR (genetic testing [mh]) OR (DNA mutational analysis [mh]))) AND (humans [mh])

Tableau 4 Validité analytique et validité clinique de trois panels de gènes de tumeurs solides

Nom de la collection	Fournisseurs ¹	Maqueurs	Outils de NGS	Échantillon requis	Validité analytique	Alignement de la séquence	Validité clinique ² Détection de variants; annotation moléculaire	Temps
Solid Tumor Mutation Panel	Arup Laboratories	48 gènes	Non spécifié	FFPE < 10 % Tissu tumoral non accepté	Non spécifiée	Non spécifié	Non spécifiée	12 à 14 jours
Sura Seq	Assura Gen	17 gènes 500 mutations COSMIC	Ion Torrent multiples outils Illumina	FFPE ou FNA	Sensibilité : 94 % à 100 % Spécificité : 95,3 % à 100 % (38 FFPE, CCR)	SuraScore ^{MC}	Non spécifiée	Non spécifié
Foundation One	Foundation Medicine	236 gènes 47 introns de 19 autres gènes	Illumina HiSeq 2000	FFPE ≥ 40 µm et ≥ 20 % tissu tumoral	Sensibilité : 95 % à 99 % VPP > 99 %	Non spécifié	Online Interactive Cancer Explorer ^{MC} Détection d'au moins 1 variant ciblable dans 76 % des échantillons (n = 2 200) soit 1,57 variants/1 échantillon (0 à 16)	14 à 17 jours

¹ Les fournisseurs déclarent être accrédités par le College of American Pathologists et répondre aux exigences CLIA.

² Les fournisseurs définissent la validité clinique des panels de gènes par leur aptitude à détecter des variants ciblables.

FFPE : tissus fixés dans le formaldéhyde et enrobés de paraffine (formalin-fixed paraffin embedded); FNA : biopsies par aspiration (fine needle aspirates); CCR : cancer colorectal; VPP : valeur prédictive positive

Les auteurs de la revue ont également mentionné que deux études font appel aux technologies de NGS de FoundationOne pour sélectionner des participants atteints d'un cancer du sein métastatique (essai IMAGE) ou différents types de tumeurs solides (essai NCT01987726) en vue de leur offrir une thérapie ciblée. Ils ont aussi repéré un essai non aléatoire, l'essai WINTHER (NCT01856296), qui vise à évaluer les résultats individuels de chaque patient en comparant la survie sans progression obtenue à la suite d'un traitement guidé par la biologie à celle observée avec le dernier traitement classique prescrit.

Revue narratives

L'essai WINTHER est cité également dans une revue narrative [Bedard *et al.*, 2013a] qui en précise la portée. Comme il a été mentionné précédemment, l'essai compare la survie sans progression de patients soumis à un traitement ciblé en fonction de leur profil moléculaire à celle observée à la suite du dernier traitement classique. Les auteurs font valoir que la validité de cette approche est discutable étant donné la corrélation incertaine des taux de survie sans progression entre les séquences de traitement.

Description de l'étude WINTHER

D'une durée maximale de deux ans, l'essai WINTHER¹⁵ a débuté en 2013 dans cinq centres (Institut Gustave Roussy (Villejuif, France); M.D. Anderson Cancer Center (Houston, Texas, États-Unis); Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelone, Espagne), le centre médical Chaim Sheba (Israël) et le Centre de cancer Segal de l'Hôpital général juif de Montréal). Il vise à produire une analyse biologique complète (ADN, ARN et micro-ARN) à partir d'une double biopsie de la tumeur (ou des métastases) et du tissu sain de chaque patient. Les patients du groupe A, qui présentent une anomalie génétique connue de l'ADN (mutations, amplifications, translocations), se verront proposer un traitement ciblé adapté (déjà offert sur le marché ou lors d'essai clinique). Les anomalies seront détectées à l'aide d'une technologie de NGS (Foundation Medicine) dans un laboratoire certifié CLIA. Les patients du groupe B, qui ne présentent aucune anomalie génétique connue, recevront un traitement en fonction : 1) des analyses biologiques (ADN, ARN, miRNA) effectuées sur les échantillons de tumeurs et de tissus sains équivalents et 2) d'un outil informatique décisionnel capable de déterminer un score prédictif d'efficacité des différentes thérapies. Cet outil bioinformatique complexe intègre toutes les données connues sur les biomarqueurs, les anomalies moléculaires, les thérapies ciblées ou non et des algorithmes prédictifs d'efficacité.

Une seconde revue narrative a rapporté les résultats préliminaires de trois essais cliniques en cours dans les programmes internationaux sur les profils moléculaires tumoraux faisant appel aux technologies de NGS, soient IMPACT, MOSCATO et SHIVA¹⁶ [Hollebecque *et al.*, 2014]. Deux études sont décrites ci-dessous et un tableau sommaire est présenté à la suite de leur description.

Description de l'étude IMPACT

L'étude IMPACT¹⁷ (Integrated Molecular Profiling in Advanced Cancers Trial) a pour objectif de fournir les profils moléculaires de patients traités au Princess Margaret Cancer Centre (Ontario) afin d'associer des anomalies somatiques à des thérapies ciblées.

Les patients admissibles sont atteints de cancers (du sein avancé, colorectaux, pulmonaires non à petites cellules (CPNPC), de l'ovaire) et d'autres tumeurs solides. L'ADN est extrait d'échantillons archivés (enrobés dans la paraffine) et un génotypage est réalisé au moyen d'un outil Sequenom (23 gènes, 280 mutations) dans un laboratoire certifié CLIA. Les résultats de ces tests sont intégrés au dossier médical électronique. Certains échantillons sont testés à nouveau à l'aide d'une technologie de NGS (Illumina MiSeq TruSeq Amplicon Cancer Panel) comprenant 48 gènes (212 amplicons et une couverture d'au moins 500X). Du 1^{er} mars 2012 au 10 janvier 2013, 485 patients ont été recrutés et un certain nombre a reçu un traitement pour un cancer de stade avancé. Parmi ces cas, on observe des échecs de séquençage (7 %), un manque de tissus tumoraux (5 %) et une détérioration clinique (2 %). La quantité médiane d'ADN a atteint 4 250 ng (15 ng à 32 550 ng) et le délai médian de disponibilité des résultats était de 5 semaines (1 à 23). Des mutations ont été détectées à l'aide de l'outil Sequenom chez 137 patients (39 %), dont 24/79 cancers du sein (30 %), 40/80 cancers colorectaux (50 %), 54/88 CPNPC (61 %), 17/78

¹⁵ Institut Gustave Roussy, protocole de l'essai WINTHER [site Web], disponible à : <http://www.gustaveroussy.fr/fr/content/igr-1946> ; ClinicalTrials.gov, A study to select rational therapeutics based on the analysis of matched tumor and normal biopsies in subjects with advanced malignancies (WINTHER), disponible à : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01856296> (consultés le 27 novembre 2014).

¹⁶ ClinicalTrials.gov, essais en cours IMPACT (NCT01505400), MOSCATO (NCT01566019) et SHIVA (NCT01771458), disponibles à : <https://clinicaltrials.gov/> (consultés le 20 novembre 2014).

¹⁷ Description de l'essai IMPACT [site Web], disponible à : <http://meetinglibrary.asco.org/content/110989-132> (consulté le 20 novembre 2014).

cancers de l'ovaire (22 %) et 2/24 autres types de cancers (8 %). Les mutations détectées (n) ont trait aux gènes KRAS (n = 76), PIK3CA (n = 35), EGFR (n = 22), NRAS (n = 5), ERBB2 (n = 5), CTNNB1 (n = 5), BRAF (n = 4) et AKT1 (n = 1).

Résultats préliminaires de l'utilité clinique de l'étude IMPACT

Après un suivi médian de 5 mois, 31/137 patients (23 %) ont reçu une thérapie ciblée en fonction de leur génotype, dont 14 patients recrutés dans près de 15 essais cliniques. Sur 10 patients évalués, 3 patients ont montré une réponse partielle au traitement, dont une réponse confirmée, et 2 autres patients ont présenté une stabilisation de leur état pendant plus de 24 semaines. Les auteurs ont conclu que les profils moléculaires peuvent être intégrés à la pratique courante dans les cas de cancer évolué. Le génotypage et le séquençage ciblé sont faisables dans les laboratoires cliniques sur des échantillons tumoraux archivés. La technologie de NGS a permis de détecter des mutations ciblables additionnelles, utiles à la prise de décision clinique.

Résultats préliminaires de la validité analytique de l'étude IMPACT

Les résultats obtenus à l'aide de la technologie de NGS concordent avec ceux obtenus au moyen de la technologie Sequenom concernant 112/113 patients (99 %), qui présentaient des mutations détectées dans 94/114 cas (82 %). Le nombre moyen de mutations repérées par la technologie de NGS était de 1,72 par patient (0 à 7) comparativement à 0,49 mutations repérées à l'aide de l'autre technologie (0 à 2).

Description de l'étude MOSCATO

L'essai prospectif MOSCATO 01 (MOlecular Screening for CAncer Treatment Optimization) vise à évaluer les caractéristiques moléculaires de tumeurs afin de choisir un traitement ciblé pour traiter des patients atteints d'un cancer avancé ou métastatique. Les patients recrutés subissent une biopsie d'une métastase et un prélèvement sanguin desquels de l'ADN est extrait. Les tissus sont congelés ou archivés (enrobés de paraffine). Deux technologies sont utilisées pour analyser l'ADN tumoral, soit le séquençage à l'aide d'un séquenceur à haut débit de nouvelle génération (NGS Ion Torrent) et l'hybridation génomique comparative (*CGH array*). Pour s'assurer de la qualité des résultats, les deux technologies ont été utilisées sur des échantillons dont la cellularité tumorale est respectivement de 10 % et 30 %. Dans le cas de la technologie de NGS, un *panel* de 76 gènes comprend 46 gènes liés aux cancers. Le délai de disponibilité des résultats de la biopsie au rapport final varie de 2 à 3 semaines. Les résultats font l'objet de discussions en équipe multidisciplinaire et, dans les cas d'anomalies génétiques activatrices et ciblables, les patients sont inclus dans une étude de phase I ou reçoivent un traitement ciblé offert sur le marché. D'octobre 2011 à septembre 2012, 129 patients ont ainsi été recrutés, dont 112 ont subi une biopsie des tumeurs, notamment des poumons, du sein, urogénitales (vessie, prostate) et colorectales.

Résultats préliminaires de l'utilité clinique de l'étude MOSCATO

Une cible thérapeutique a été mise en évidence chez 53 patients (47 %) parmi lesquels 33 patients (29 %) ont reçu un traitement associé à l'anomalie détectée; 7 réponses partielles ont été observées, soit un taux de réponse de 21 %. Les anomalies moléculaires d'intérêt comprenaient principalement des anomalies des voies P13Kinases, FGF, EGFR, RAS, RAF, MEK et des anomalies du cycle cellulaire.

Synthèse des résultats de l'utilité clinique des essais IMPACT et MOSCATO

Les résultats préliminaires de l'utilité clinique des essais IMPACT et MOSCATO ont été présentés lors de la conférence de l'ASCO en 2013 [Bedard *et al.*, 2013b; Hollebecque *et al.*, 2013]. Dans l'étude IMPACT, 23 % des patients ont reçu une thérapie ciblée et 10 % d'entre eux ont obtenu une réponse objective. Les résultats relatifs à ces mêmes paramètres sont meilleurs dans l'essai MOSCATO, soit 62 % de cas traités et un taux de réponse objective de 21 %. Les résultats de l'étude de synthèse des études IMPACT et MOSCATO sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 5 Résultats préliminaires de l'utilité clinique des essais IMPACT et MOSCATO

Essai en cours	Pays	Type d'échantillons tumoraux	Technologies	Nombre de gènes analysés	Patients dont les échantillons ont été analysés n	Patients dont les échantillons montrent au moins 1 anomalie moléculaire n (%)	Patients traités n (%)	Patients évalués n (%)	Patients montrant une réponse objective n (%)
IMPACT	Canada	Archivés	MiSeq/Sequenom	23	485	137 (39 %)	31/137 (23 %)	10/137 (7,3 %)	1/10 (10 %)
MOSCATO	États-Unis	Biopsies	Ion Torrent PGM/CGH	50	112	53 (47 %)	33/53 (62 %)	-	7/33 (21 %)

Description de l'essai SHIVA

L'objectif de l'essai SHIVA¹⁸ consiste à évaluer l'efficacité d'un traitement basé sur le profil moléculaire d'une tumeur, par rapport à un traitement classique, chez des patients atteints d'un type de cancer réfractaire aux traitements classiques. L'essai se déroule en deux étapes. À la première étape, les patients subissent une biopsie (ou une résection) d'une métastase et un prélèvement sanguin pour déterminer le profil moléculaire du cancer. En présence d'une anomalie génétique ciblable à l'aide d'une thérapie déjà sur le marché mais approuvée seulement pour le traitement d'autres types de cancer, les patients se verront proposer de participer à la deuxième étape, qui consiste à les répartir de façon aléatoire en deux groupes à traiter. Les patients du premier groupe recevront une thérapie ciblée correspondant à l'anomalie moléculaire détectée; ceux du deuxième groupe recevront une chimiothérapie classique, laissée au choix du médecin, soit celle que le médecin leur aurait proposée s'ils n'avaient pas participé à l'essai.

Les patients des deux groupes pourront changer de groupe en cas de rechute, ce qui signifie qu'au final, tous les patients chez lesquels une anomalie moléculaire ciblable aura été détectée recevront la thérapie ciblée correspondante. Cependant, la moitié des patients la recevront d'emblée et l'autre moitié, dans un second temps. Dans le contexte de cet essai, trois études complémentaires seront menées aux fins suivantes :

- déterminer si l'ADN tumoral circulant permet de prédire l'efficacité du traitement;
- repérer des marqueurs biologiques pouvant prédire l'efficacité des traitements et la résistance à ces traitements ;
- estimer le coût des traitements.

¹⁸ Description de l'essai SHIVA [site Web], disponible à : <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Le-registre-des-essais-cliniques/Le-registre-des-essais-cliniques/Etudes-cliniques/SHIVA-Essai-de-phase-2-randomise-comparant-une-therapie-basee-sur-le-profil-tumoral-moleculaire-versus-une-therapie-conventionnelle-chez-des-patients-ayant-un-cancer-refractaire.-essai-clos-aux-inclusions> (consulté le 20 novembre 2014).

4.3 Résumés de conférences

Plusieurs résumés de conférences sur le séquençage génétique des cancers sont accessibles sur les sites Web de différentes organisations. Sans être exhaustifs, quelques résumés sont fournis dans la présente section.

À une conférence de l'American Society of Clinical Oncology, les résultats d'un séquençage complet de tumeurs ont été comparés à ceux d'un séquençage ciblé (AmpliSeq panel) [Lim *et al.*, 2014]. Au total, 56 patients atteints de cancers avancés du sein (n = 18), du poumon (n = 8) et colorectal (n = 4) ont reçu trois lignes de chimiothérapie avant le séquençage. Parmi les 30 patients dont les données cliniques étaient disponibles, 21 patients ont présenté des anomalies ciblables, 3 patients ont obtenu un changement de diagnostic, 9 patients sont décédés avant que les résultats soient disponibles et 8 patients ont reçu un traitement ciblé qui s'est avéré efficace chez 6 de ces patients. Le séquençage intégral du génome était plus informatif que le séquençage ciblé (70 % des cas comparé à 30 % des cas). Les auteurs concluent à la nécessité de nouvelles études pour déterminer l'utilité clinique de ces technologies.

Des patients ont été sélectionnés parmi 6 500 participants à une étude diagnostique prospective multicentrique (MSKK study) sur le cancer colorectal afin de déterminer des profils génétiques pronostiques. Chez 173 participants (stade II UICC), des spécimens d'ADN ont été prélevés de tumeurs primaires colorectales puis séquencés (48 gènes connus) à l'aide d'une technologie de NGS (Illumina MiSeq) [Rosenthal *et al.*, 2013]. La maladie demeurait stable chez 94 participants tandis que 79 patients ont souffert d'une progression du cancer au cours des 3 années suivant la chirurgie (métastases (n = 40), récurrences locales (n = 12), tumeurs malignes secondaires (n = 27)). Au total, 2 221 variants ont été repérés, dont 401 figurent dans le catalogue des mutations somatiques en cancer (COSMIC) et 750 étaient présents dans les tissus normaux. Les 1 471 autres variants ont servi de base au développement de nouvelles signatures sur la progression du cancer. La meilleure signature pour prédire l'évolution métastatique (incidence : 10 % de métastases) contenait des variants dans moins de 15 gènes et affichait une sensibilité et une spécificité analytiques de 0,41 et 0,93 de même que des valeurs prédictives positive (VPP = 0,40) et négative (VPN = 0,93) respectivement. Les auteurs ont conclu qu'une VPP de 40 % surpasse les VPP des tests d'ARN (OncotypeDx : VPP = 0,13), Colon Cancer Assay : VPP = 0,22), ColoPrint : VPP = 0,19), Predictor C : VPP = 0,33) pour la même incidence de maladie métastatique (10 %) 3 ans après le diagnostic. Cette approche technologique a permis de traiter un plus grand nombre de patients, et ce, en obtenant de meilleurs résultats à l'aide d'une thérapie adjuvante.

À la conférence de l'AACR-NCI-EORTC, les résultats du séquençage à haut débit de tumeurs primaires de l'estomac (n = 28), colorectales (n = 20), pulmonaires (n = 12), du sein (n = 11), du foie (n = 9) et d'autres sites (n = 25) ont été rapportés. La technologie de NGS (Ion AmpliSeq Cancer Panel ver 1.0) ciblait 739 mutations du catalogue COSMIC de 46 oncogènes [Takahashi *et al.*, 2013]. La plupart des patients (74,3 %) ont été recrutés avant de recevoir une première ligne de chimiothérapie. Plus de 100 ng d'ADN double brin ont été retrouvés dans 92 des 93 échantillons fixés dans la paraffine et admissibles à l'analyse. Le nombre moyen de mutations par patient était de 1,6 et 1 mutation ciblable a été détectée dans 44 % des échantillons. La fréquence des mutations variait de 1,1 % à 15 % (PIK3CA (15 %), KRAS (15 %), CTNNB1 (7,5 %), EGFR (3,2 %), GNAS (3,2 %), BRAF (2,1 %), ERBB2 (2,1 %), KIT (1,1 %), NRAS (1,1 %)). La proportion de patients chez lesquels ces mutations ont été détectées passait de 29 % à 77 % selon le siège tumoral : sein (77 %), colorectal (66 %), foie (63 %), poumon (45 %) et estomac (29 %); 2 patients atteints d'un cancer du côlon ont reçu, dans un cas, le trastuzumab (mutation

et amplification ERBB2) et dans l'autre cas (mutations KRAS p.Q61P ou p.A146T), d'autres alternatives de traitement, y compris les antiEGFR. Aucune donnée clinique relative à ces patients n'a été rapportée.

Un essai clinique (UNCseq study) sur les profils moléculaires obtenus à l'aide d'une technologie de NGS (Illumina HiSeq) a permis de repérer 61 anomalies génétiques ciblables [Patel *et al.*, 2013]. De même, 12 variations du nombre de copies ont été confirmées par immunofluorescence (11 patients) et 46 mutations ont été détectées par séquençage par la méthode de Sanger (43 patients). La fréquence d'allèles mutants a été observée dans 12 % à 92 % des anomalies. Parmi les mutations non confirmées, la fréquence des allèles de 4 mutations s'est avérée sous la limite de détection du séquençage selon la méthode de Sanger (10 % à 15 %). Les données obtenues à l'aide de la technologie de NGS ont été revues afin d'éliminer les erreurs de mappage ou d'alignement (faux positifs). Les auteurs ont conclu à une concordance élevée entre les données obtenues à l'aide des technologies de NGS et de la méthode de Sanger relativement à une variété d'anomalies génétiques. Les causes les plus probables d'échec dans la confirmation des données issues des technologies de NGS sont associées à une faible fréquence des allèles et à l'hétérogénéité tumorale.

Lors de la conférence de l'ACR, des données ont été présentées sur la détection de variants de nucléotides simples ou des petits indels par un génotypage (Sequenom) et un séquençage à haut débit (technologie non spécifiée) à partir de 71 échantillons de tumeurs archivés, fixés dans la paraffine [Yelensky *et al.*, 2012]. Les deux technologies ont repéré respectivement 62 et 65 mutations, dont 60 mutations communes dans les échantillons testés simultanément. De plus, la technologie de NGS a permis de détecter 73 autres variants de mutations somatiques récurrentes et 30 variants dans des gènes suppresseurs de tumeurs que la technologie Sequenom n'avait pas repérés. Les auteurs ont conclu à une concordance élevée entre les deux outils technologiques. Selon les auteurs, les variants additionnels détectés à l'aide de la technologie de NGS offrent un potentiel de sélection ou d'expérimentation de traitements ciblés.

4.4 Recherche sur les technologies de NGS

La consultation de la base de données ClinicalTrials.gov¹⁹ a permis de recenser 12 recherches en oncologie portant sur les technologies de NGS, dont la plupart sont en cours de recrutement et portent sur les cancers du sein (n = 3), de l'ovaire (n = 1), du poumon (n = 1) et multisièges (n = 1), le mélanome (n = 1), le sarcome (n = 1) et divers sujets (n = 4). Plus de la moitié de ces recherches correspondent à des devis expérimentaux non aléatoires et des études observationnelles prospectives ayant pour objectif de comparer les résultats obtenus à l'aide de technologies de NGS à ceux obtenus au moyen d'autres outils technologiques ou de rechercher des biomarqueurs. Ces recherches sont brièvement décrites dans l'annexe G.

En somme, un certain nombre d'approches sur les applications des technologies de NGS fait l'objet de recherches. L'une de ces approches consiste à recueillir de l'information génétique de cancers à l'aide du séquençage, de détecter des mutations ciblables par une ou plusieurs thérapies ciblées et d'administrer ces traitements ou d'examiner la possibilité d'instaurer un traitement autorisé pour une autre indication thérapeutique ou de participer à une étude clinique visant une indication particulière (IMPACT, MOSCATO, SHIVA, ALCAPONE (NCT02281214), NCT01987726, NCT01904916). La technologie de NGS est aussi utilisée en

¹⁹ Recherches en cours inscrites dans la base de données ClinicalTrials.gov, disponible à : <https://clinicaltrials.gov/> (consulté le 20 novembre 2014).

recherche pour déterminer des profils génétiques qui auraient une valeur pronostique clinique [Rosenthal *et al.*, 2013]. Une autre approche, celle utilisée dans l'étude WINTHER, consiste à traiter des patients atteints d'un cancer qui présente une mutation qui, a première vue, n'est pas ciblable à partir d'une prédiction bioinformatique de susceptibilité à un traitement, obtenue à l'aide de plusieurs sources d'information biologique (ADN, ARN, microARN). Des études s'intéressent également à mesurer la capacité comparative des technologies de NGS à détecter de l'ADN tumoral en circulation dans le sang de patients atteints de cancer (NCT01350908, NCT01334008).

Par ailleurs, l'Agence du cancer de la Colombie-Britannique mène un programme d'oncogénomique personnalisée (POG) en vue de détecter des mutations et des traitements correspondants à l'aide du séquençage du génome des tumeurs²⁰. Des projets de recherche sont également en cours d'élaboration au Québec, entre autres à l'Hôpital Sainte-Justine – CHU mère-enfant (oncopédiatrique), à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (immuno-oncologie), au CUSM (projet WINTHER) et dans certains instituts de recherche (projet Leucégène). Cette énumération ne constitue toutefois pas une liste exhaustive des initiatives québécoises.

²⁰ Une recherche en cours de ce programme est inscrite dans la base de données ClinicalTrials.gov (NCT02155621), disponible à : <https://clinicaltrials.gov/> (consulté le 1^{er} juin 2015).

DISCUSSION

La majorité des cancers résulte de phénomènes mutationnels de l'ADN somatique et, plus rarement, d'anomalies constitutionnelles héréditaires. Dans les deux cas, les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) peuvent contribuer à une meilleure compréhension de la tumorigénèse et mener à des décisions cliniques sur les traitements à prescrire.

Centrées sur l'approche théranostique et guidées par le cadre d'analyse ACCE [Sanderson *et al.*, 2005], la validité et l'utilité cliniques des profils moléculaires obtenus à l'aide des technologies de NGS ont fait l'objet de la présente évaluation. Les questions du demandeur ne portaient pas spécifiquement sur la validité analytique des tests moléculaires, celle-ci étant requise à leur mise en marché au Canada. De plus, les tests conçus en laboratoire clinique doivent être conformes aux exigences de certification CLIA [Schrijver *et al.*, 2012]. Les normes de bonnes pratiques de laboratoire sortent également du cadre de la présente évaluation.

Une centaine d'articles scientifiques sur la validité et l'utilité cliniques du séquençage génétique des cancers a été examinée et jugée de faible qualité méthodologique. Deux études descriptives portant spécifiquement sur les technologies de NGS font état de résultats sur la validité et l'utilité cliniques. S'y sont ajoutés une revue systématique de la littérature sur la validité clinique de trois « panels » de gènes, accessibles sur les sites Web des fournisseurs, deux revues narratives traitant de certaines études en cours à l'échelle internationale et un certain nombre de résumés de conférences qui ont été présentées lors de congrès organisés par des sociétés reconnues dans le domaine de l'oncologie. Plusieurs projets de recherche clinique, inscrits dans la base de données ClinicalTrials.gov, ont également été répertoriés.

Validité clinique

Pour faire état de la validité clinique du séquençage génétique des cancers à l'aide d'une technologie de NGS, le paramètre qui a été jugé le plus important a trait à la capacité de séquencer des gènes à partir d'échantillons archivés, de biopsies ou de tissus de résection chirurgicale dont la portée clinique est éprouvée. Ainsi, les études répertoriées montrent que les technologies de NGS permettent de détecter des mutations qui sont actuellement associées à la chimiosensibilité ou à la résistance à certains médicaments anticancéreux. Des mutations dans les gènes EGFR, KRAS, AKT et RET sont des exemples d'anomalies génétiques repérées et pour le traitement desquelles des thérapies ciblées sont disponibles (géfitinib, erlotinib, cétuximab, sorafénib) [Han *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2012]. Dans ce cas, des paramètres analytiques, tels que la concordance et les faux positifs, viennent appuyer quantitativement la validité clinique. La concordance des résultats obtenus à l'aide de la technologie de NGS et ceux venant de méthodes classiques a varié de 90 % à 93,5 % dans une étude réalisée à partir de 30 échantillons archivés [Han *et al.*, 2014] et a atteint 100 % dans une étude réalisée sur des biopsies [Tran *et al.*, 2012].

Toujours dans le contexte clinique, la capacité de limiter les résultats faux positifs ou faux négatifs est aussi un facteur déterminant. La probabilité d'obtenir des faux positifs et des faux négatifs croît avec l'augmentation du nombre de fragments à séquencer, une faible profondeur de lecture de séquençage et la dégradation de l'ADN observée après la fixation et le stockage. Selon un rapport du Centre fédéral d'expertise des soins de santé (KCE) de Belgique, le risque de faux positif est plus important dans le cas du séquençage du génome ou de l'exome que dans le cas du séquençage par un panel de gènes, parce que le nombre de gènes testés est très élevé et

la couverture²¹, généralement plus faible. À moins que toutes les altérations de l'ADN actionnables détectées à l'aide de la technologie de NGS soient confirmées au moyen d'un test orthogonal, l'emploi de petits panels de gènes réduit le risque de rapporter des altérations génétiques actionnables faussement positives en raison de la couverture plus étendue » [Van den Bulcke *et al.*, 2015]²².

Dans les études répertoriées, peu de données ont été rapportées sur les résultats faussement positifs ou négatifs. En plus des 77 mutations détectées à l'aide de la technologie de NGS et confirmées au moyen de l'outil technologique Sequenom, la technologie de NGS a détecté une mutation additionnelle, que 2 méthodes de validation n'ont pas repéré [Tran *et al.*, 2012]. Une validation des données obtenues à l'aide de la technologie de NGS pourrait donc être nécessaire lorsque la profondeur de lecture du séquençage est faible.

En somme, la technologie de NGS permet de détecter, dans des échantillons de tumeurs, les mutations qui pourraient être repérées à l'aide d'une autre méthode d'analyse classique en obtenant un taux de concordance appréciable. Ces résultats laissent supposer que la technologie de NGS est valide cliniquement en oncologie. Plusieurs études en cours d'élaboration permettront une meilleure évaluation de la validité clinique des technologies NGS.

Utilité clinique

L'utilité clinique peut être examinée selon deux perspectives, soit l'utilité thérapeutique classique et l'utilité expérimentale. Dans la perspective thérapeutique classique, des mutations actionnables détectées à l'aide de la technologie de NGS ou d'autres technologies concourent à une intervention thérapeutique acceptée et dont l'utilité clinique a été démontrée dans des études cliniques prospectives. Citons, à titre indicatif, le recours au trastuzumab dans le traitement du cancer du sein avec amplification du gène HER2, le recours au imatinib dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales digestives (GIST, sigle de l'anglais *gastro intestinal stroma tumors*), le recours au cétuximab et au panitumumab dans le traitement du carcinome colorectal sans mutation des gènes RAS ou le recours au vémurafenib et au dabrafénib dans le traitement du mélanome avec mutation du gène BRAF. Actuellement, le nombre de mutations tumorales recherchées pour traiter chaque patient est très limité. Dans ce contexte, bien que les technologies de séquençage à haut débit permettent de détecter ces mutations, leur valeur ajoutée en clinique, comparativement aux autres méthodes de séquençage génétique, n'apparaît pas évidente en raison du débit requis. En considérant les besoins globaux des laboratoires diagnostiques et les demandes de différentes disciplines médicales, il n'est pas exclu que l'implantation d'une technologie de NGS puisse devenir pertinente et qu'elle permette éventuellement des gains d'efficacité pour répondre, par exemple, à des besoins de classification moléculaire, de stratification pronostique et d'optimisation de traitements. Toutefois, une analyse rigoureuse de l'efficacité des technologies de NGS serait nécessaire pour confirmer leur utilité clinique et les implanter dans une perspective thérapeutique classique.

L'approche thérapeutique expérimentale consiste à rechercher une ou plusieurs mutations ciblables à l'aide du séquençage au moyen de panels de gènes de grande taille, de l'exome ou du génome, et à traiter le patient avec une molécule qui peut cibler la ou les mutations en présence, mais pour une indication non reconnue ou en essai clinique. Dans cette approche, la présence

²¹ Le terme « couverture » est utilisé dans le sens de « profondeur de lecture du séquençage », suivant la définition donnée dans le glossaire du présent document.

²² Rapport du Centre fédéral d'expertise des soins de santé (KCE) de Belgique, recommandé par un lecteur externe.

d'une mutation ciblable constitue le principal facteur qui détermine le choix du traitement, alors que le type de cancer a moins d'importance. Comme le nombre de mutations potentielles est grand, une technologie de NGS s'avère utile en raison de sa capacité de séquençage à haut débit. Cette approche a été explorée dans plusieurs des études consultées, mais les résultats sont fragmentaires et les avantages cliniques rapportés jusqu'à maintenant sont modestes.

Par ailleurs, la technologie de NGS a détecté des mutations PIK3CA, KRAS, EGFR que les technologies de type Sanger n'avaient pas repérées, et de mieux comprendre l'évolution clinique de 31 cas d'adénocarcinome du poumon [Han *et al.*, 2014]. Les patients qui présentaient les mutations de PIK3CA seules ou associées aux variants EGFR L858R ont développé une résistance primaire aux ITK-EGFR. Les mutations PIK3CA ont aussi été associées à une réponse faible aux anti-EGFR dans le traitement du cancer colorectal et aux anti-HER2 dans le traitement du cancer du sein. De plus, la technologie de NGS a repéré 19 mutations ciblables dans divers types de cancer chez 50 patients, dont 6 ont été traités en fonction de ces mutations [Tran *et al.*, 2012]; 2 patients ont présenté une réponse partielle au traitement ciblé et 1 patient a présenté une réponse complète; une stabilisation du cancer a été confirmée chez 1 patient après un suivi médian de 3 mois. Précisons que la durée du suivi, le stade relativement avancé des cancers et le nombre de lignes de chimiothérapie antérieures peuvent expliquer, en partie, le faible taux de réponse. Des recherches en cours proposent également des traitements en fonction de la détection de mutations ciblables à l'aide d'une technologie de NGS. Les résultats préliminaires ont montré des taux de réponse modestes chez un nombre limité de patients, soit 1 patient sur 10 (10 %) dans l'étude IMPACT et 7 patients sur 33 (21 %) dans l'étude MOSCATO. Il faut toutefois préciser que les patients recrutés souffraient de cancers à un stade avancé ou métastatique.

Étant donné le nombre limité de cas et la diversité des cancers, il est difficile de tirer des conclusions définitives sur l'utilité clinique en matière de gains significatifs pour les patients, mais certains de ces patients pourraient bénéficier de traitements en essais cliniques ou hors indication. Plusieurs initiatives de recherche en cours permettront d'étayer l'utilité clinique de ces stratégies expérimentales.

Défis à relever

Certains paramètres entrent en jeu lorsqu'on traite de la faisabilité du séquençage génétique des cancers à l'aide d'une technologie de NGS dans un contexte clinique. Parmi ceux évalués par Tran et ses collaborateurs [2012], le délai d'obtention d'un profil moléculaire n'a pas été concluant. Les résultats étaient disponibles dans un délai de 21 jours pour 62 % des patients. Les données préliminaires de l'étude IMPACT et de l'étude MOSCATO font état d'un délai de 2 à 3 semaines et d'un délai médian de 5 semaines pour obtenir les résultats. Un résumé de conférence a rapporté le décès de 9 patients avant l'obtention des profils moléculaires et souligne l'importance d'obtenir les résultats dans un délai raisonnable [Lim *et al.*, 2014].

Les technologies de NGS partagent également, avec les autres méthodes de séquençage génétique, des difficultés relatives notamment à l'instabilité génomique tumorale, à l'obtention d'ADN et d'ARN en quantité et en qualité suffisantes et aux risques associés aux biopsies [Aparicio et Caldas, 2013]. Dans certains cas, la tumeur primaire pourrait nécessiter plusieurs prélèvements et une réévaluation, par les anatomopathologistes, des échantillons chirurgicaux et des biopsies initiales dans un contexte de ressources limitées.

Le séquençage génétique réalisé à l'aide d'une technologie de NGS comporte également ses propres défis, entre autres l'étendue des données génétiques utiles à transmettre aux cliniciens

(algorithmes décisionnels), l'interprétation d'une quantité grandissante d'information génétique, l'accès dans un délai raisonnable aux profils moléculaires, le traitement et l'archivage des données génomiques et la standardisation des méthodes d'analyses bioinformatiques et statistiques [Taber Johansen *et al.*, 2013; Van Allen *et al.*, 2013]. En outre, au Québec, la Commission de l'éthique en science et en technologie a proposé une réflexion sur les aspects sociétaux, éthiques et juridiques des soins de santé personnalisés, notamment sur la discrimination génétique, l'assurabilité et l'employabilité des personnes qui présentent un phénotype clinique particulier [CEST, 2014].

CONCLUSION

Le séquençage des ADN tumoraux à l'aide d'une technologie à haut débit ou de nouvelle génération (NGS) constitue une avancée majeure en cancérologie. La validité et l'utilité cliniques du séquençage à haut débit, soit le séquençage ciblé d'un groupe de gènes et le séquençage intégral de l'exome ou du génome des tumeurs, font l'objet de la présente évaluation. La littérature examinée fournit peu de données probantes sur l'utilisation en clinique des technologies de séquençage à haut débit.

Les études repérées ont montré l'aptitude des technologies de NGS à détecter des mutations dont la validité clinique est reconnue et pour lesquelles une thérapie ciblée est offerte sur le marché. Dans ce contexte thérapeutique classique, les technologies de NGS ont une utilité sur le plan des avantages cliniques, mais leur valeur ajoutée, lorsqu'on les compare aux autres méthodes de séquençage, n'est pas démontrée. Par ailleurs, les technologies de NGS s'avèrent indiquées dans une perspective expérimentale lorsqu'il est nécessaire d'examiner un grand nombre de mutations dans une tumeur afin de détecter des mutations ciblables pour choisir un traitement, par exemple un traitement autorisé pour une autre indication thérapeutique. Une réponse partielle à ces traitements, des taux de survie sans progression ou de stabilisation du cancer et certaines formes de résistance aux traitements ont été observés chez un nombre limité de patients. Actuellement, les données disponibles sont insuffisantes pour confirmer l'utilité de cette approche. Les résultats préliminaires de quelques études en cours sont prometteurs et, à terme, de nouvelles données issues de devis de recherche de bonne qualité méthodologique pourraient appuyer l'utilisation des technologies de NGS dans la prise en charge clinique des cancers.

Bien que certains défis techniques propres aux technologies de NGS soient pris en compte dans les bonnes pratiques de laboratoire dans un environnement CLIA, des défis inhérents au séquençage génétique des cancers, en particulier, doivent être relevés avant que le déploiement en clinique puisse être envisagé. L'implantation du séquençage génétique des cancers à l'aide des technologies de NGS nécessite un processus de validation analytique et clinique important.

Toutefois, les technologies de NGS offrent des avenues prometteuses de découverte de signatures moléculaires dont l'utilité semble se limiter pour l'instant au domaine de la recherche. Ainsi, plusieurs initiatives de recherche, en cours au Québec et ailleurs, permettront de mieux établir la validité et l'utilité cliniques du séquençage génétique des cancers à l'aide des technologies de NGS. La veille stratégique instaurée permettra de bonifier les connaissances dans ce domaine émergent.

ANNEXE A

Stratégie de recherche d'information scientifique sur le séquençage génétique des cancers

Bases de données

Dates de la recherche : 19 au 25 août 2014

Dates de publication : 2008-2014

Langues : anglais et français

Limites : humains

MEDLINE (PubMed)

- #1 neoplasms/therapy OR neoplasms/genetics OR neoplasms/diagnosis
- #2 tumor markers, biological/genetics OR molecular targeted therapy/methods OR genetic testing[mh] OR DNA mutational analysis[mh]
- #3 #1 AND #2
- #4 neoplasms/genetics
- #5 neoplasm*[tiab] OR neoplasia[tiab] OR cancer[tiab] OR tumor[tiab] OR tumors[tiab] OR tumour[tiab] OR tumours[tiab] OR oncology[tiab]
- #6 #4 OR #5
- #7 genomics[mh] OR genes[mh] OR genome, human[mh] OR genome-wide association study[mh] OR exome[mh]
- #8 genomic*[tiab] OR genetic[tiab] OR genetics[tiab] OR gene[tiab] OR genes[tiab] OR genome[tiab] OR genomes[tiab] OR exome[tiab] OR geneomic[tiab]
- #9 #7 OR #8
- #10 sequenc*[tiab] OR technology[tiab] OR technologies[tiab] OR testing[tiab] OR coding[tiab] OR profiling[tiab]
- #11 sequencing cancer
- #12 whole genome sequencing OR whole exome sequencing OR gene panel sequencing
- #13 #6 AND #9 AND #10
- #14 #6 AND #12
- #15 #3 OR #11 OR #13 OR #14
- #16 "prospective trials" OR "clinical utility" OR "clinical validity"
- #17 #15 AND #16

Embase (OvidSP)

- #1 neoplasm/

- #2 (neoplasm* OR neoplasia OR cancer OR tumor OR tumors OR tumour OR tumours OR oncology).ti,ab.
- #3 #1 OR #2
- #4 genomics/ OR genome/ OR exome/ OR genetic association OR genetics/ OR gene
- #5 (genomic* OR genome OR exome OR exomes OR genetic OR genetics OR gene OR genes OR genomes OR geneomic).ti,ab.
- #6 #4 OR #5
- #7 (sequenc* OR technology OR technologies OR testing OR coding OR profiling).mp.
- #8 #3 AND #6 AND #7
- #9 sequencing cancer
- #10 #8 OR #9
- #11 whole genome sequencing OR whole exome sequencing
- #12 #3 AND #11
- #13 #10 OR #12
- #14 "prospective trials" OR "clinical utility" OR "clinical validity"
- #15 #13 AND #14

EBM Reviews (OvidSP)

Cochrane Central Register of Controlled Trials

Cochrane Database of Systematic Reviews

Cochrane Methodology Register

Database of Abstracts of Reviews of Effects

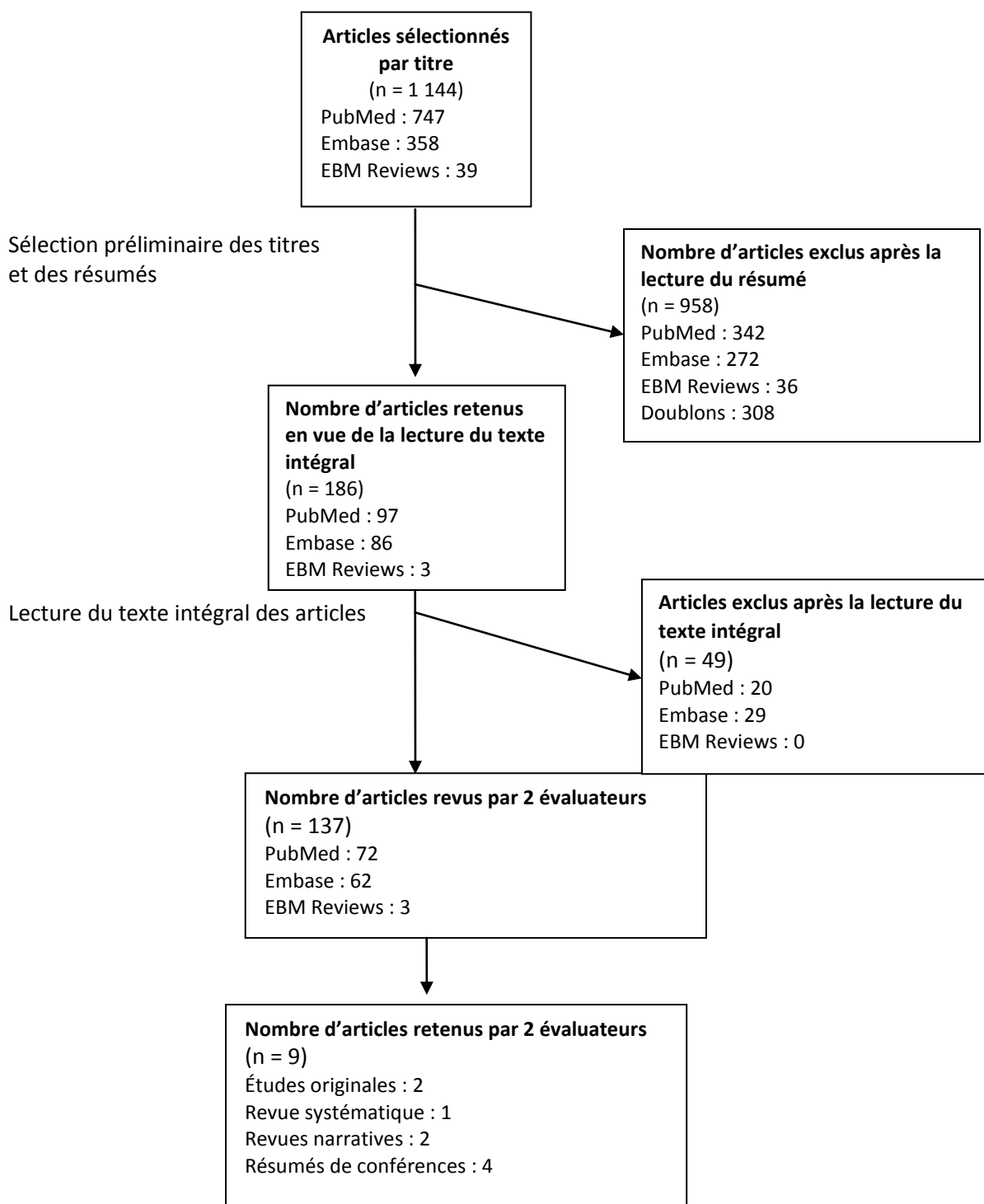
Health Technology Assessment

NHS Economic Evaluation Database

- #1 (neoplasm* OR neoplasia OR cancer OR tumor OR tumors OR tumour OR tumours OR oncology).mp.
- #2 (genomic* OR genome OR exome OR genetic OR genetics OR gene OR genes OR genomes OR geneomic).mp.
- #3 (sequenc* OR technology OR technologies OR testing OR coding OR profiling).mp.
- #4 #1 AND #2 AND #3
- #5 whole genome sequencing OR whole exome sequencing
- #6 #1 AND #5
- #7 "prospective trials" OR "clinical utility" OR "clinical validity"
- #8 #4 AND #7
- #9 #6 OR #8

ANNEXE B

Diagramme de sélection des articles



ANNEXE C

Sites Web des organismes consultés et des documents pertinents

Tableau C-1 Sites en évaluation des technologies et des médicaments

Organisme, pays	URL et dates de consultation	Documents
<p>Agence canadienne des médicaments et des technologies de la santé (ACMTS/CADTH), Canada</p>	<p>https://www.cadth.ca/fr 16-09-2014</p>	<p>Next Generation DNA Sequencing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines</p> <p>Cancer du sein et du pancréas – recherche de l'allèle Q775X du gène PALB2 par RFLP et recherche de mutations du gène PALB2 par HRM et séquençage direct</p> <p>Analyse de la codéletion des chromosomes 1p et 19q par FISH <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> (del (1p/19q))</p> <p>Analyse de l'amplification du gène du récepteur de croissance épidermique (<i>EGFR</i>) relativement au nombre de copies du chromosome 7 (CEP7) par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).</p> <p>The "CellSearch" System for Detecting Circulating Tumour Cells in Advanced Ovarian Cancer: Clinical Benefit and Cost-Effectiveness</p> <p>L'analyse du gène KRAS dans le cancer colorectal métastatique au moyen de therascreen KRAS RGQ PCR</p> <p>Oncotype DX chez les femmes et les hommes atteints d'un cancer du sein précoce ER positif et HER2 négatif sans envahissement ganglionnaire : examen de l'efficacité et des lignes directrices cliniques</p> <p>Oncotype DX chez les hommes et les femmes atteints de cancer du sein précoce ER-positif et HER2-négatif qui présentent un envahissement ganglionnaire : examen de l'efficacité clinique et des lignes directrices</p> <p>Oncotype DX-Guided Treatment in Early Stage Breast Cancer: Cost-Effectiveness</p>
<p>Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ), y compris National Guideline Clearinghouse (NGC), États-Unis</p>	<p>http://www.ahrq.gov/ 16-09-2014</p>	<p>Technology Assessment of Molecular Pathology Testing for the Estimation of Prognosis for Common Cancers</p> <p>Update on Emerging Genetic Tests Currently Available</p>

Organisme, pays	URL et dates de consultation	Documents
		<p>for Clinical Use in Common Cancers</p> <p>Reviews of selected pharmacogenetic tests for non cancer and cancer conditions</p> <p>Quality, regulation, and clinical utility of laboratory-developed molecular tests</p> <p>Systematic reviews on selected pharmacogenetic tests for cancer treatment : CYP2D6 for tamoxifen in breast cancer, KRAS for anti-EGFR antibodies in colorectal cancer, and BCR-ABL1 for tyrosine kinase Inhibitors in chronic myeloid leukemia</p> <p>Technology Assessment on Genetic Testing or Molecular Pathology Testing of Cancers with Unknown Primary Site to Determine Origin</p>
Centre fédéral d'expertise des soins de santé (KCE), Belgique	https://kce.fgov.be/fr 16-09-2014 30-04-2015	<p>Organisation and financing of genetic testing in Belgium</p> <p>Oncogenetic testing for Lynch syndrome and familial adenomatous polyposis</p> <p>Next Generation Sequencing Gene Panels for Targeted Therapy in Oncology and Haemato-oncology</p>
European Medicines Agency (EMA)	http://www.ema.europa.eu/ema/ 18-09-2014	<p>Présentation PowerPoint</p> <p>Frédérique Nowak</p> <p>Genomics in science and clinical care</p>
Medical Services Advisory Committee (MSAC), Australie	http://www.msac.gov.au/ 18-09-2014	<p>Application No. 1173 – Testing for epidermal growth factor receptor (EGFR) status in patients with locally advanced (stage IIIB) or metastatic (stage IV) non-small cell lung cancer (NSCLC) for access to erlotinib</p> <p>Consultation Protocol to guide the assessment of gene expression profiling of 70 genes in breast cancer assay to quantify the risk of disease recurrence and predict adjuvant chemotherapy benefit</p> <p>1207 Final Decision Analytical Protocol (DAP) to guide the assessment of BRAF V600 mutation testing in patients with locally advanced or metastatic melanoma for eligibility for dabrafenib treatment</p> <p>Consultation Decision Analytical Protocol (DAP) to guide the assessment of BRAF genetic testing in patients with melanoma for access to proposed PBS-funded GSK2118436 treatment</p>

Organisme, pays	URL et dates de consultation	Documents
National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Royaume-Uni	http://www.nice.org.uk/ 18-09-2014	EGFR-TK mutation testing in adults with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer
National Health and Medical Research Council (NHMRC), Australie	https://www.nhmrc.gov.au/ 18-09-2014	Aucun
NHS Evidence, Royaume-Uni	http://www.evidence.nhs.uk/ 22-09-2014	<p>Next steps in the sequence – The implications of whole genome sequencing for health in the UK</p> <p>Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors</p> <p>Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TK) mutation testing in adults with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer: A systematic review and cost-effectiveness analysis</p> <p>Realising the potential of stratified medicine</p> <p>Technology Assessment on Genetic Testing or Molecular Pathology Testing of Cancers with Unknown Primary Site to Determine Origin</p> <p>Systematic Reviews on Selected Pharmacogenetic Tests for Cancer Treatment: CYP2D6 for Tamoxifen in Breast Cancer KRAS for anti-EGFR antibodies in Colorectal Cancer, and BCR-ABL1 for Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia</p> <p>Reviews of Selected Pharmacogenetic Tests for Non-Cancer and Cancer Conditions</p>
Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN), Royaume-Uni	http://www.sign.ac.uk/ 22-09-14	Aucun

Tableau C-2 Sites en cancérologie

Organisme, pays	URL	Documents
<p>American Society of Clinical Oncology (ASCO), États-Unis</p>	<p>http://www.asco.org/ 22-09-2014</p>	<p>Whole-exome and targeted sequencing of angiosarcomas: Target identification and treatment implications</p> <p>The use of whole-genome sequencing in therapeutic for decision making in patients with advanced malignancies</p> <p>Use of whole genome sequencing to identify novel mutations in distinct subgroups of medulloblastoma</p> <p>Whole genome sequencing to characterize luminal-type breast cancer</p> <p>Whole-genome DNA and RNA sequencing in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC)</p> <p>Whole-genome Sequencing: A Primer for the Clinicians</p> <p>An exhaustive algorithm for detecting copy number aberrations and large structural variants in whole-genome, mate-pair sequencing data</p> <p>Defining the genetic basis of everolimus sensitivity in metastatic bladder cancer (MBC) by whole-genome sequencing (WGS)</p> <p>Identification of independent primary tumors and intra-pulmonary metastasis using DNA rearrangements in non-small cell lung cancer</p> <p>The driver landscape of angiosarcoma</p> <p>Multiplex testing of potentially ‘actionable’ alterations in small cell lung cancer (SCLC)</p> <p>Identification of novel mutations of EGFR genome in lung adenocarcinoma</p> <p>Exploring therapeutic targets in pulmonary sarcomatoid carcinoma by comprehensive genomic profiling</p> <p>Molecular underpinning of melanoma histologic subtypes in the metastatic setting</p> <p>Comprehensive molecular profiling of urothelial bladder cancer at the DNA, RNA, and protein levels: A TCGA project</p>
<p>BC Cancer Agency, Canada (Colombie-Britannique)</p>	<p>http://www.bccancer.bc.ca/news-</p>	<p>World-first project brings BC one step closer to personalized cancer treatment</p>

Organisme, pays	URL	Documents
	site/Documents/2014/20141103_NR_POG_FINALdraftOctober31.pdf 19-04-2015	Personalized Oncogenomics (POG) Program of British Columbia (Identifiant ClinicalTrials.gov NCT02155621)
Cancer Care Ontario, Canada	https://www.cancercare.on.ca/ 30-10-2014	Next Generation Sequencing Current State Assessment
Institut national du cancer (INCa), France	http://www.e-cancer.fr/ 7-10-2014	<p>Synthèse de l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers en 2012, en vue d'optimiser leur évolution</p> <p>Une équipe française identifie quatre nouveaux gènes impliqués dans le cancer du foie grâce aux techniques de génomique et de séquençage à haut débit</p> <p>Le grand programme de séquençage des génomes tumoraux produit ses premiers résultats</p> <p>Prise en charge personnalisée des patients : l'INCa publie deux nouveaux rapports sur les tests de génétique moléculaire des cancers</p>
International Agency for Research on Cancer	http://www.iarc.fr/ 30-10-2014	Aucun résultat
National Comprehensive Cancer Network (NCCN) – Clinical Practice Guidelines in Oncology, États-Unis	http://www.nccn.org/ 30-10-2014	Aucun résultat
National Cancer Institute, États-Unis	http://www.cancer.gov/ 30-10-2014	Whole genome sequencing not informative for all, Johns Hopkins study shows

Tableau C-3 Autres sites

Organismes, pays	URL	Documents
Food and Drug Administration (FDA), États-Unis	http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm255327.htm 4-05-2015	Ultra High Throughput Sequencing for Clinical Diagnostic Applications – Approches to Assess Analytical Validity
Association for Clinical Genetic Science (ACGS), Royaume-Uni	http://www.acgs.uk.com/media/774807/bpg_for_targeted_next_generation_sequencing_may_2014_final.pdf 6-05-2015	Practice Guidelines for Targeted Next Generation Sequencing Analysis and Interpretation
New York Department of Health, États-Unis	http://www.wadsworth.org/labcert/TestApproval/for/NextGenSeq_ONCO_Guidelines.pdf 8-05-2015	“Next Generation” Sequencing (NGS) guidelines for somatic genetic variant detection

ANNEXE D

Grille CASP (Critical Appraisal Skills Programme) d'évaluation de la qualité méthodologique d'une revue systématique

Évaluateur	GR
N° de l'étude	1
Titre de l'étude	Multi-marker solid tumor panels using next-generation sequencing to direct molecularly targeted therapies
Auteurs	Marrone <i>et al.</i> , 2014

Item	Questions	Réponse (oui, non ou incertain)
QUESTIONS GÉNÉRALES		
1	La question d'évaluation est-elle claire?	Oui
2	La revue a-t-elle retenu les bons types d'études?	Incertain
	Doit-on continuer à évaluer cette revue systématique?	Oui
QUESTIONS SPÉCIFIQUES		
3	Les auteurs de la revue ont-ils tenté de répertorier toutes les études pertinentes?	Incertain
4	Les auteurs de la revue ont-ils évalué la qualité des études retenues?	Non
5	Si les résultats des études ont été combinés, était-il pertinent de le faire?	Non applicable
6	Les résultats, dont le résultat principal, sont-ils présentés clairement?	Oui
7	Les résultats sont-ils précis?	Oui
8	Les résultats peuvent-ils être appliqués à la population locale?	Non
9	Les résultats importants ont-ils tous été pris en considération?	Oui
10	La pratique d'intervention ou la politique publique devrait-elle être modifiée à la lumière des données issues de cette revue?	Non

ANNEXE E

Significant mutated and/or driver genes and some fused genes from whole-genome studies in cancer [Tuna et Amos, 2013]

Tumor type/year	Sample size	Identified aberrations	Significant mutated genes	Fused genes##
Lung cancer# (2008)	2	Deletions, inversions, duplications, amplifications, translocations		<i>CACNA2D4-WDR43</i> <i>PVT1-CHD7</i>
AML* (2008)	1	Point mutations, insertions, deletions		
AML (2009)	1	Point mutations, insertions, deletions		
Breast cancer* (2009)	1	Point mutations, insertions, deletions, inversions, copy number alterations		
Breast cancer§ (2009)	24	Deletions, amplifications, tandem duplications, inversions, translocations		<i>NFIA-EHF</i> <i>RAF1-DAZL</i> <i>ETV6-ITPR2</i> <i>NTRK2-ACAP2</i> <i>SNX13-IGF2BP3</i> <i>CCDC46-TMEM104</i> <i>NF1-ACCN1</i> <i>EIF3K-CYP39A1</i> <i>IL6R-ATP8B2</i> <i>ITPR2-ETV6</i> <i>GRB7-PERLD1</i> <i>HDAC11-FBLN2</i> <i>FGFR1-ZNF703</i> <i>SSH2-SUZ12</i> <i>MTA1-INF2</i> <i>OTOP2-MYO18A</i> <i>SLC26A6-PRKAR2A</i> <i>IGF1R-AC007964.3</i>
Pancreatic adenocarcinoma (2010)	13	Deletions, insertions, translocations, insertions, amplifications		<i>GSK3A-NRXN3</i> <i>SYNE1-MTHFD1</i> <i>KIAA1671-XBP1</i> <i>SPECC1-ZNF532</i> <i>EID2B-IL29</i> <i>C6orf138-SLC1A6</i> <i>USP48-RAP1GAP</i> <i>ANK2-KCNK10</i>
Basal-like breast cancer (2010)	1	Point mutations, insertions, deletions, translocations, inversions, amplifications		<i>ZNF496-FAM164B</i> <i>KIAA0319L-ACBG2</i> <i>HSP90AB3P-HSP90AB1</i> <i>TECPR1-SLC35E1</i> <i>LAMB4-CDH4</i> <i>RAB11FIP3-CAMKK1</i> <i>HYDIN-KPNB1</i>
Lung cancer (2010)	1	Point mutations, insertions, deletions, translocations, inversions, amplifications		<i>B2M-TCF12</i>
AML (2010)	1	Point mutations		
Melanoma	1	Point mutations, insertions,		

Tumor type/year	Sample size	Identified aberrations	Significant mutated genes		Fused genes##	
(2010)		deletions, structural rearrangements amplifications				
Small-cell lung cancer (2010)	1	Point mutations, insertions, deletions, translocations, amplifications			<i>PTV1-CHD7</i> <i>CREBBP-BTBD12</i>	
Colorectal adenocarcinoma (2011)	9	Point mutations, deletions, insertions, inversions, translocations	<i>KRAS</i> <i>APC</i> <i>TP53</i> <i>NRAS</i>	<i>SMAD4</i> <i>PIK3CA</i> <i>FBXW7</i>	<i>VTI1A-TCF7L2</i> <i>MED20-PKHD1</i> <i>FBXW11-CAST</i> <i>PDE6D-MIR1305</i> <i>MIR30D-VCY1B</i> <i>C5orf54-HRASLS5</i> <i>SORBS1-JAG1</i> <i>PDE3A-WWOX</i>	<i>FSTL4-MIR1289-2</i> <i>CTNNA2-MIR1305</i> <i>CROCC-WNT6</i> <i>ZPLD1-NOS1</i> <i>ATG7-CCNF</i> <i>PUS7L-WWOX</i> <i>MAK-C12orf63</i> <i>MAP7-GPHN</i>
Prostate cancer (2011)	7	Point mutations, deletions, insertions, inversions, translocations, complex rearrangements	<i>CHD1</i> <i>CHD5</i> <i>HDAC9</i> <i>PTEN</i> <i>HSPA2</i>	<i>HSPA5</i> <i>HSP90AB1</i> <i>SPTA1</i> <i>SPOP</i>	<i>TMRPSS2-ERG</i> <i>RSRC2-MIER2</i> <i>SCIN-PTPRZ1</i> <i>SLTM-CA5B</i> <i>KIAA1539-C14orf145</i>	<i>ULK4-CUX1</i> <i>CRIP2-CLK3</i> <i>CTNNA2-MINPP1</i> <i>ARHGAP15-PTPRR</i> <i>CACNA1D-JAZF1</i>
Multiple myeloma (2011)	23	Point mutations, insertions, deletions, translocations, inversions, amplifications	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>TP53</i> <i>CCND1</i> <i>DIS3</i> <i>FAM46C</i>	<i>PNRC1</i> <i>ALOX12B</i> <i>HLA-A</i> <i>MAGED1</i> <i>BCL7A</i>	<i>DAPK1-FAM70B</i> <i>MAP2K4-DSCAM</i> <i>NFIB-C12orf42</i> <i>NOTCH2NL-LCLAT1</i> <i>RUNDC3B-RB1</i> <i>SLC9A5-MAP3K3</i>	<i>ERC1-WNT5B</i> <i>PRR4-ETV6</i> <i>PFAS-MAP2K4</i> <i>NTN1-MAP2K4</i> <i>NFIA-VAV3</i> <i>MAP2K4-DSCAM</i>
Therapy related AML (2011)	1	Point mutations, deletions, insertions, translocations, amplifications			<i>DGKG-BST1</i> <i>BST1-DGKG</i> <i>DMXL1-ETV6</i>	
CLL (2011)	4	Point mutations, deletions, insertions, inversions, amplifications	<i>NOTCH1</i> <i>XPO1</i>	<i>MYD88</i> <i>KLHL6</i>		
Hepatocellular carcinoma (2011)	1	Point mutations, deletions, insertions, translocations, amplifications, inversions			<i>BCORL1-ELF4</i> <i>CTNND1-STX5</i> <i>CABP2-LOC645332</i>	<i>VCL-ADK</i>
CLL (2011)	3	Point mutations, deletions, insertions	<i>TP53</i> <i>ATM</i> <i>MYD88</i> <i>NOTCH1</i> <i>SF3B1</i>	<i>ZMYM3</i> <i>MAPK1</i> <i>FBXW7</i> <i>DDX3X</i>		
APL (2011)	1	Translocations			<i>PML-RARA</i>	<i>RARA-LOXL1</i>

Tumor type/year	Sample size	Identified aberrations	Significant mutated genes		Fused genes##	
					<i>LOXL1-PML</i>	
Breast cancer (2012)	23	Point mutations, translocations, insertions, deletions	<i>PIK3CA</i> <i>TP53</i> <i>AKT1</i> <i>GATA3</i> <i>MAP3K1</i> <i>CBFB</i>		<i>TNFRSF21-SAPS3</i> <i>CASZ1-CNTNAP2</i> <i>TMED6-MAPK7</i> <i>ARID5A-TRPS1</i> <i>DNM2-CDK12</i> <i>TAOK1-ELL</i>	<i>KNTC1-MAP4</i> <i>IGF2R-PHF13</i> <i>GDA-IKZF3</i> <i>ZNF420-ST18</i> <i>DOCK2-CTNNBIP1</i>
Metastatic melanoma (2012)	25	Point mutations, deletions, insertions, translocations, inversions, amplifications	<i>BRAF</i> <i>NRAS</i> <i>KIT</i> <i>MUC4</i> <i>PREX2</i> <i>GOLGA6L6</i>	<i>VCX3B</i> <i>POTEH</i> <i>OR2T33</i> <i>C1orf127</i> <i>PRG4</i> <i>MST1</i>	<i>PREX2-C11orf30</i> <i>PREX-DCAF5</i> <i>PREX2-KCNMB4</i> <i>CARD11-PREX2</i> <i>SDK1-PREX2</i> <i>ICA1-PREX2</i> <i>ETV1-PREX2</i> <i>ETV1-SUSD1</i> <i>ETV1-BAGE3</i> <i>PIP5K1P1-PIK3C3</i> <i>HULC-CDH2</i> <i>TFAP2A-PIK3C3</i> <i>HULC-MAPK4</i> <i>TERT-ENTHD1</i> <i>EFR3B-TP53</i>	<i>MIR548A1-SOCS6</i> <i>MIR548A1-SETBP1</i> <i>CPNE5-CDH7</i> <i>CD2AP-PIK3C3</i> <i>SMAD2-MAPK4</i> <i>ETV3-C1orf53</i> <i>RFWD2-AKT3</i> <i>KIT-PTEN</i> <i>CFLP1-PTEN</i> <i>CAPSL-MIR2052</i> <i>NFIA-TNNI3K</i> <i>BCL2-KDSR</i> <i>RUNX1-CRYZL1</i> <i>ETV1-RASGRP1</i> <i>FHIT-NDUFA10</i>
Colorectal cancer (2012)	97	Point mutations, deletions, insertions, inversions, translocations, amplifications	<i>APC</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> <i>PIK3CA</i> <i>KRAS</i> <i>FBXW7</i> <i>SMAD4</i> <i>TCF7L2</i>	<i>NRAS</i> <i>ARID1A</i> <i>SOX9</i> <i>FAM123B</i> <i>CTNNB1</i> <i>SMAD2</i> <i>SOX9</i>	<i>NAV2-TCF7L2</i> <i>LOH12CR1-ERBB4</i> <i>SGCZ-CTNNA3</i> <i>NEDD4-STK31</i> <i>ACOT11-CTNNA2</i>	<i>PCYOX1-EIF3A</i> <i>GRID1-CD38</i> <i>MAGI3-RSPRY1</i> <i>VPS45-SEMA3E</i>
Relapsed AML (2012)	8	Point mutations, deletions, insertions, inversions, translocations	<i>DNMT3A</i> ¶¶ <i>NPM1</i> ¶¶ <i>FLT3</i> ¶¶ <i>TTN</i> ¶¶ <i>SMC3</i> ¶¶	<i>PTPRT</i> ¶¶ <i>ETV6</i> §§ <i>MYO18B</i> §§ <i>WAC</i> §§ <i>STK4</i> §§	<i>WNK1-WAC</i> §§	
Luminal breast cancer (2012)	46	Point mutations, deletions, insertions, inversions, translocations	<i>PIK3CA</i> <i>TP53</i> <i>GATA3</i> <i>CDH1</i>	<i>RUNX1</i> <i>LDLRAP1</i> <i>STNM2</i> <i>MYH9</i>	<i>MAP2K5-WRB</i> <i>GLI3-ITPR2</i> <i>BCAS3-ATP8B4</i> <i>LIMK2-TGIF2</i>	

Tumor type/year	Sample size	Identified aberrations	Significant mutated genes		Fused genes##	
			<i>RB1</i> <i>MLL3</i> <i>MAP3K1</i> <i>CDKN1B</i> <i>TBX3</i>	<i>AGTR2</i> <i>STMN2</i> <i>SF3B1</i> <i>CBFB</i>	<i>EXOC6-MAG1</i> <i>EXOSC1-C6orf97</i> <i>ZMAT4-SS18L1</i>	
Hepatocellular carcinoma (2012)	27	Point mutations, deletions, insertions, amplifications, translocations, inversions	<i>TP53</i> <i>ERRFI1</i> <i>ZIC3</i> <i>CTNNB1</i> <i>GXYLT1</i> <i>OTOP1</i> <i>ALB</i> <i>ATM</i> <i>ZNF226</i> <i>USP25</i>	<i>WWP1</i> <i>IGSF10</i> <i>ARID1A</i> <i>UBR3</i> <i>BAZ2B</i> <i>ARID1A</i> <i>ARID1B</i> <i>ARID2</i> <i>MLL</i> <i>MLL3</i>	<i>CSMD3-ZHX2</i> <i>TMX2-CTNND1</i> <i>APBA2-TCF12</i> <i>C17orf103-MAP2K3</i>	
Medulloblastoma (2012)	39	Point mutations, deletions, insertions, translocations			<i>LCLAT1-ERBB4</i> <i>MLLT6-MRPL45</i>	
Breast cancer <i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i> positive tumors (2012)	21	Point mutations, deletions, insertions, inversions, amplifications, structural rearrangements	<i>TP53</i> <i>GATA3</i> <i>PIK3CA</i> <i>MAP2K4</i>	<i>SMAD4</i> <i>MLL2</i> <i>MLL3</i> <i>NCOR1</i>		
Medulloblastoma (2012)	37	Point mutations, deletions, insertions, inversions, amplifications, translocations	<i>DDX3X</i> <i>PIK3CA</i> <i>CTNNB1</i> <i>KDM6A</i> <i>WDFY3</i> <i>SMARCA4</i> <i>CREBBP</i>	<i>CDH1</i> <i>CDH7</i> <i>MLL2</i> <i>KDM4C</i> <i>PFKP</i> <i>TP53</i> <i>SF3B1</i>	<i>UNC119-MYO18A</i> <i>CCDC132-CDK14</i> <i>PHC1-ING4</i> <i>AKD1-NFIA</i> <i>CNTN1-PRL</i> <i>STAT5B-MYO16</i>	
Colon cancer (2012)	9	Point mutations, deletions, insertions, inversions, translocations	<i>KRAS</i> <i>APC</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i>	<i>FBXW7</i> <i>PIK3CA</i> <i>ATM</i>	<i>ETV6-NTRK3</i> <i>CDC42SE2-KIAA0146</i> <i>TADA2A-MEF2B</i>	
Secondary AML (2012)	7	Point mutations	<i>CDH23</i> <i>NPM1</i> <i>PTPN11</i> <i>RUNX1</i> <i>SMC3</i> <i>STAG2</i>	<i>TP53</i> <i>U2AF1</i> <i>UMODL1</i> <i>WT1</i> <i>ZSWIM4</i>		
Metastatic olfactory	1	Point mutations, deletions,				

Tumor type/year	Sample size	Identified aberrations	Significant mutated genes		Fused genes##	
neuroblastoma¶ (2012)		insertions, amplifications				
ET-ALL (2012)	12	Point mutations, deletions, insertions, amplifications, translocations, inversions	<i>NRAS</i> <i>KRAS</i> <i>FLT3</i> <i>IL7R</i> <i>JAK3</i> <i>JAK1</i> <i>SH2B3</i> <i>BRAF</i> <i>GATA3</i> <i>ETV6</i>	<i>RUNX1</i> <i>IKZF1</i> <i>EP300</i> <i>EZH2</i> <i>EED</i> <i>SUZ12</i> <i>ECT2L</i> <i>RELN</i> <i>PHF6</i> <i>DNM2</i>	<i>ETV6-INO80D</i> <i>BG201338-ETV6</i> <i>NUP214-SQSTM1</i> <i>SQSTM1-NUP214</i> <i>NAP1L1-MLLT10</i> <i>MLLT10-NAP1L1</i> <i>RUNX1-EVX1</i> <i>CTNNA3-ARHGAP21</i> <i>NDST2-RUNX1</i>	
NSCLC (2012)	17	Point mutations, deletions, insertions, translocations, inversions, amplifications	<i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>BRAF</i> <i>JAK2</i> <i>JAK3</i> <i>EGFR</i> <i>EPHA3</i> <i>EPHA4</i>	<i>STK11</i> <i>LTK</i> <i>MET</i> <i>ITK</i> <i>DACH1</i> <i>RELN</i> <i>ABCB5</i>	<i>KDEL2-ROS1</i> <i>EML4-ALK</i> <i>FZR1-NFIC</i>	
Lung adenocarcinoma (2012)	24	Point mutations, deletions, insertions, translocations, inversions	<i>TP53</i> <i>KRAS</i> <i>EGFR</i> <i>STK11</i> <i>SMARCA4</i> <i>KEAP1</i> <i>NF1</i> <i>RB1</i> <i>BRAF</i> <i>SMAD4</i> <i>RBM10</i> <i>SETD2</i> <i>PPP2R1A</i>	<i>CTNNB1</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>ATM</i> <i>FGFR3</i> <i>CBL</i> <i>FBXW7</i> <i>ARID1A</i> <i>BRD3</i> <i>U2AF1</i> <i>KIAA0427</i> <i>GOPC</i>	<i>C9orf53-CDKN2A</i> <i>ROS1-CD74</i>	
Small-cell lung cancer (2012)	2	Point mutations, deletions, insertions, translocations, inversions	<i>TP53</i> <i>RB1</i> <i>PTEN</i> <i>CREBBP</i> <i>EP300</i>	<i>SLIT2</i> <i>MLL</i> <i>COBL</i> <i>EPHA7</i>	<i>MPRIP-TP53</i> <i>CREBBP-RHBDF1</i> <i>NCEH1-GPR160</i>	

Tumor type/year	Sample size	Identified aberrations	Significant mutated genes		Fused genes##	
Neuroblastoma (2012)	40	Point mutations, deletions, insertions	<i>ATR</i>			
Hereditary pancreatic cancer (2012)	3	Point mutations	<i>ATM</i>			
Triple-negative breast cancer (2012)	15	Point mutations, deletions, insertions, translocations	<i>TP53</i> <i>PIK3CA</i> <i>USH2A</i> <i>MYO3A</i> <i>PTEN</i>	<i>RB1</i> <i>ATR</i> <i>UBR5</i> <i>EDD1</i> <i>COL6A3</i>	<i>GPT-RB1</i> <i>KLF7-IDH1</i> <i>LPIN2-KRAS</i> <i>ETV6-PPP2R5E</i> <i>TGFB1-LMNB1</i>	

ALL: acute myeloid leukemia, AML: acute myeloid leukemia; CLL: chronic lymphocytic leukemia; HCC: hepatocellular carcinoma; MM: multiple myeloma; ET-ALL: early precursor T-cell acute lymphocytic leukemia

* Mutated genes were found in one primary and relapsed AML patients.

Two lung cancer cell lines

§ Breast tumor samples (15) and 9 breast cancer cell lines

** Mutated only in metastasis

¶ Genes that related with disease progression and/or as a result of post-treatment effects

¶¶ Recurrent mutated genes in primary tumor

§§ Recurrent mutated genes in relapsed tumor

Some of fusion genes

ANNEXE F

Description détaillée des technologies de NGS et bioinformatiques

Première étude primaire [Han *et al.*, 2014]

Technologie de NGS

Ten nanograms of DNA was used for multiplex PCR of a panel covering 739 mutations in the following 46 key cancer genes: ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, and VHL (Ion AmpliSeq Cancer Panel, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Fragment libraries were constructed using DNA fragmentation, barcode and adaptor ligation, and library amplification, according to the manufacturer's instructions as stipulated in the Ion DNA Barcoding kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The size distribution of the DNA fragments was analyzed on the Agilent Bioanalyzer using the High Sensitivity Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Template preparation, emulsion PCR, and Ion Sphere Particle (ISP) enrichment was performed using the Ion Xpress Template kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. The ISPs were loaded onto a 318 chip and sequenced using an Ion PGM 100 sequencing kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Bioinformatique

After a successful sequencing reaction, the raw signal data were analyzed using Torrent Suite v3.4.2. The pipeline includes signaling processing, base calling, quality score assignment, adapter trimming, PCR duplicate removal, read alignment to human genome 19 reference, mapping quality QC, coverage analysis and variant calling. After completion of the primary data analysis, lists of detected sequence variants (SNVs and INDELS) were compiled in a VCF (Variant call file) format. For downstream analysis, variants with minimum coverage of 500 reads containing at least 5 of the mutant reads were selected. The selected variants by Torrent Suite and above mentioned criteria were cross compared with variants called by Genome Analysis Tool Kit-2.1.4 (GATK) using same raw data. Variant calls were further analyzed using an internally developed software that allows variant filtering and annotation using refGene in UCSC, COSMIC v.64, dbSNP build 135, PolyPhen-2, SIFT, phastCons scores for multiple alignments in UCSC. In silico prediction algorithms SIFT and PolyPhen-2 to predict potential deleterious effect on protein function. To minimize false positive, variants were filtered with in-house normal population variant database KPGP (<http://opengenome.net/>), followed by selecting variants with minor allele frequency between 0.05 and 0.4.

Seconde étude primaire [Tran *et al.*, 2012]

Technologie de NGS

PacBio RS-targeted exon sequencing

The PacBio RS instrument was selected as the NGS platform for this study based on its rapidity of analysis and following validation using a set of 30 blood and FFPE samples (27 with known cancer mutations). In the initial testing, 26/27 mutations were called correctly and led to improvements in assay design, sequencing protocol and analysis pipeline utilized for the clinical trial. When possible,

300–400 ng of DNA was used to PCR amplify 63 amplicons corresponding to the 60 exons containing all 238 mutations on the OncoCarta Panel v1.0. The average size of amplicons is 340 bp (range: 230–442 bp) in length (PCR primers are described in Supporting Information Table 2). There were 23 reactions (five 5-plex, seven 4-plex and 11 single-plex). PCR products were pooled using 6 μ l for each multiplex and 1.5 μ l for each single-plex (total 82.5 μ l per sample). Purified pools were quantified using Qubit Fluorometric Quantitation (Invitrogen). Library preparation used 500 ng of each pool. Further details regarding targeted exome sequencing performed by PacBio RS is described in Supporting Information Methods 4.

Bioinformatique

Three interconnected components to assist with logistics of sample handling, validation of the pipeline and reporting mechanisms were developed. First, a web-enabled variant mutation knowledge base to manage data reporting on each mutation was designed. This combines expert annotated literature with statistical data on mutation frequencies within cancer types from COSMIC data. Prior to sending to clinicians, reports were reviewed and updated following expert panel deliberations. The second component was a collaborative web-based spreadsheet for patient and sample tracking through the study workflow, sending reminders when required, and making the elapsed time and status immediately visible. The third component managed the genotyping and sequencing results. It was used to record and integrate observed mutations from the different genomics technologies, and associate these genomics results with the samples, the patients, and the knowledge base. These components were integrated into a single uniform interface that provides an effective bridge between clinical and genomic information, creating personalized reports for treating physicians

ANNEXE G

Recherche en cours sur le séquençage génétique des cancers à l'aide des technologies de NGS

Numéro d'identification	Type d'étude	Statut	Titre	Paramètres principaux et secondaires
Sein				
NCT02151747	Étude prospective par observation	En cours	Pilot Study of Validation of Testing BRCA 1/2 Mutation Using Next Generation Sequencing	<i>Paramètre principal</i> Overall accuracy after enrollment, comparison between Sanger and NGS method
NCT02266420	Devis expérimental prospectif, non aléatoire, ouverte (sans groupe témoin)	Recrutement	Comparison of Biological Features Between pN0 Triple Negative Breast Tumours With Size < or = 10 mm (pT1a/b) Versus pT1c T2 < or = 30 mm	<i>Paramètre principal</i> Biomarker signature for pT1a/b pN0 triple-negative breast cancers versus pN0 triple-negative breast cancers with size > or = 11 mm and < or = 30 mm. <i>Paramètres secondaires</i> <ul style="list-style-type: none"> •Disease free survival •Metastasis Free Survival •Overall survival •Description and comparison of gene copy number (array-CGH) and gene mutation (targeted NGS) between pT1a/b pN0 triple-negative breast cancer versus pN0 triple-negative breast cancer with size ≥ 11 mm and ≤ 30 mm
NCT02299635	Devis expérimental Phase 2 ouvert (sans groupe témoin)	Pas encore en recrutement	Phase 2 Study Of Single-agent Pf-03084014 In Patients With Advanced Triple-negative Breast Cancer With Or Without Genomic Alterations In Notch Receptors	<i>Paramètre principal</i> Objective response (OR) in Patients With NA+ mTNBC <i>Paramètres secondaires</i> <ul style="list-style-type: none"> • OR in Patients With NA- mTNBC • Progression-Free Survival • Duration of Response • One-year survival probability • Overall Survival • Type and number of Notch genomic alterations identified by NGS assay in patients with NA+ mTNBC • PF-03084014 serum Ctough levels • Pharmacodynamic effects of PF 03084014 in tumor specimens and peripheral blood

Numéro d'identification	Type d'étude	Statut	Titre	Paramètres principaux et secondaires
				<ul style="list-style-type: none"> Alterations in genes, proteins, and RNAs relevant to the Notch signaling pathway, to TNBC biology, and to sensitivity/resistance to PF 03084014 in tumor specimens and peripheral blood
Mélanome				
NCT01334008	Devis expérimental ouvert (sans groupe témoin), groupe unique	Inconnu	Development and Validation of a Circulating Tumor DNA Detection Technique in Patients With Metastatic Choroidal Melanoma	<p><i>Paramètre principal</i> Assessment and development of circulating tumor DNA detection techniques</p> <p><i>Paramètres secondaires</i> Comparison of the detection techniques (PAP (pyrophosphorolysis activated polymerisation), BEAMing, NGS (next sequencing generation)) in terms of feasibility, robustness, sensitivity, and cost</p>
Ovaire				
NCT01350908	Devis expérimental ouvert (sans groupe témoin) groupe unique	Inconnu	Development and Validation of a Circulating Tumor DNA Detection Technique in Patients With Ovarian Cancer	<p><i>Paramètre principal</i> Assessment and development of circulating tumor DNA detection techniques</p> <p><i>Paramètre secondaire</i> Comparison of the detection techniques (PAP (pyrophosphorolysis activated polymerisation), BEAMing, NGS (Next sequencing generation) with regards to feasibility, robustness, sensitivity, and cost</p>
Poumon				
NCT02281214 ALCAPONE	Devis expérimental ouvert (sans groupe témoin), groupe unique	Recrutement	Genome Analysis by Next Generation Sequencing in Personalisation of Lung Cancer Treatment	<p><i>Paramètre principal</i> Search EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2, ERBB2, AKT1, mutations et ALK, ROS rearrangements by NGS methods before treatment and when tumor progression in patients with first line metastatic lung cancer therapy (chimiothérapie, thérapie ciblée)</p> <p><i>Paramètres secondaires</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Comparison of genome profiles (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2, ERBB2, AKT1, ...mutations and ALK, ROS rearrangements) between targeted therapy for EGFR mutation and chemotherapy for non EGFR

Numéro d'identification	Type d'étude	Statut	Titre	Paramètres principaux et secondaires
				<p>mutation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Compare tumor genetic profile (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2, ERBB2, AKT1, APC, ... mutations and ALK, ROS rearrangements) with circulating DNA genetic profile (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2, ERBB2, ... mutations and rearrangements using NGS methods
Multisièges				
NCT01987726	Devis expérimental ouvert (sans groupe témoin), groupe unique	Recrutement	Decision Analysis Foundation Medicine's Next Generation Sequencing Test in Advanced Tumor Malignancies	<p>Impact of Next Solid</p> <p><i>Paramètres principaux</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Feasibility of NGS on metastatic solid tumor tissue, in terms of number of patients screened, FMI test attempted, FMI test successful, and FMI tests results released to physicians • Feasibility of NGS result-based non-FDA-approved treatment plan, measured by reasons for ability or inability to receive an anti-cancer agent • Availability of recommended experimental regimens via clinical trials • Proportion of patients who have one recommended therapy • Proportion of patients who have multiple options recommended <p><i>Paramètre secondaire</i></p> <p>Presence of any oncogene or tumor suppressor gene mutations or amplifications identified by NGS on tumor tissue in each cohort</p>
Sarcome				
NCT01596374	Étude prospective Étude rétrospective par observation	Recrutement	Clinical Relevance of ROS (V-ros UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog) Aberrations in Solid Tumours	<p><i>Paramètre principal</i></p> <p>Characterize the frequency of ROS gene fusion, ROS protein overexpression and ROS gene mutations in cell lines and tumors</p> <p><i>Paramètres secondaires</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Identify novel ROS gene variants in human solid tumors harboring ROS aberrations using next generation sequencing (NGS) • Determine the functional relevance of novel ROS gene variants identified with NGS <p>Characterize the sensitivity of cells with</p>

Numéro d'identification	Type d'étude	Statut	Titre	Paramètres principaux et secondaires
				functionally relevant ROS aberrations using ROS tyrosine kinase inhibitors
Autres				
NCT01851213	Étude prospective par observation	Recrutement	A Prospective Observational Study to Examine, in Routine Clinical Practice in the US, Practice Patterns and Impact on Clinical Decision Making Associated with the FoundationOne™ Next Generation Sequencing (NGS) Test	<p><i>Paramètres principaux</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Composite characterization of current real-world practice patterns in the use of the FoundationOne™ test and the effect of the FoundationOne™ test on clinical decision making across the US •Characterization of practice patterns for the use of the test described by: <ul style="list-style-type: none"> ◦Provider and site characteristics of patients receiving the FoundationOne test ◦Socio-demographic and clinical characteristics of patients receiving the FoundationOne test •Examination of the effect of the test on clinical decision making by describing: <ul style="list-style-type: none"> ◦Subsequent treatment patterns for patients after receipt of test results ◦Clinician report outcomes regarding how test results guided clinical decision making <p><i>Paramètre secondaire</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Exploratory endpoints describing clinical outcomes in the study population: <ul style="list-style-type: none"> ◦Overall survival ◦1-year survival ◦Overall progression-free survival
NCT01855477	Devis expérimental, groupe unique	Recrutement	Development of a Platform for Next-generation DNA Sequencing Based Personalized Treatment for Cancer Patients: Protocol to Obtain Biopsies from Patients with Locally Advanced (Incurable) or Metastatic Cancer (CPCT - 02 Biopsy	<p><i>Paramètre principal</i></p> <p>Percentage of patients enrolled in clinical intervention trials based on the mutational profile of their cancer genome</p> <p><i>Paramètres secondaires</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Percentage of samples with sufficient DNA for sequencing analysis •Percentage of samples with an adequate mutational profile to allow enrollment in trials •Differences in mutational profile pre, post and during treatment •Number and nature of (serious)

Numéro d'identification	Type d'étude	Statut	Titre	Paramètres principaux et secondaires
			Protocol)	adverse events of the performed histological biopsies
NCT02140463	Étude prospective par observation N of 1	Recrutement	Next Generation Personalized Tx (Therapy) With Plasma DNA Trial-2 in Refractory Solid Tumors (The NEXT-2 Trial)	<p><i>Paramètre principal</i> The feasibility of the use of plasma cell free DNA molecular profiling to direct targeted therapies in the treatment of refractory solid tumors</p> <p><i>Paramètres secondaires</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Progression free survival • Molecular profile with cell-free DNA • Serial cfDNA samples • Duration of response • Overall survival • Response rate
NCT01904916	Devis expérimental, groupe unique	Recrutement	Protocol to Obtain Tumor Biopsies From Patients with Locally Advanced (Incurable) or Metastatic Cancer to Improve Selection for Clinical Trials (CPCT - 05 Biopsy Protocol Patient Selection)	<p><i>Paramètre principal</i> Percentage of screened patients allocated to trials based upon outcome of genetic screening effort</p> <p><i>Paramètres secondaires</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Number and nature of (serious) adverse events of the performed histological biopsies • Number of samples stored for future related research • Number of samples with an adequate microRNA, (phospho) proteomic profiles, and organoid cultures that allows biomarker discovery efforts

RÉFÉRENCES

- Agence canadienne des médicaments et des technologies de la santé (ACMTS). Next generation DNA sequencing: A review of the cost effectiveness and guidelines. Ottawa, ON : ACMTS; 2014. Disponible à : <https://www.cadth.ca/sites/default/files/pdf/htis/apr-2014/RC0519%20-%20Next%20Generation%20Sequencing%20Final.pdf>.
- Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Le séquençage à haut débit : méthodes et enjeux en médecine, pharmacologie et toxicologie. Saint-Denis, France : AFSSAPS; 2011. Disponible à : http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/0edd877424b6f7301df42c2aff2a9a5a.pdf.
- Agnelli L, Tassone P, Neri A. Molecular profiling of multiple myeloma: From gene expression analysis to next-generation sequencing. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13(Suppl 1):S55-68.
- Aparicio S et Caldas C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *N Engl J Med* 2013;368(9):842-51.
- Bedard P, Hansen A, Ratain M, Siu L. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013a;501(7467):355-64.
- Bedard PL, Oza AM, Tsao MS, Leighl NB, Shepherd FA, Chen EX, et al. Princess Margaret Cancer Centre (PMCC) Integrated Molecular Profiling in Advanced Cancers Trial (IMPACT) using genotyping and targeted next-generation sequencing (NGS). *J Clin Oncol* 2013b;31(15 Suppl):abstract 11002.
- Buettner R, Wolf J, Thomas RK. Lessons learned from lung cancer genomics: The emerging concept of individualized diagnostics and treatment. *J Clin Oncol* 2013;31(15):1858-65.
- Commission de l'éthique en science et en technologie (CEST). Les soins de santé « personnalisés » : prudence et balises. Québec, Qc : CEST; 2014. Disponible à : http://www.ethique.gouv.qc.ca/fr/assets/documents/SSP/CEST_SSP_Avis.pdf.
- Danesi R, Di Paolo A, Bocci G, Crea F, Del Tacca M. Pharmacogenetics in oncology. *EJC Suppl* 2008;6(14):74-8.
- De Cremoux P. Signatures moléculaires des cancers. Paris, France : J. Libbey Eurotext ; Société française du cancer; 2012.
- Dewey FE, Grove ME, Pan C, Goldstein BA, Bernstein JA, Chaib H, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. *JAMA* 2014;311(10):1035-44.
- Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: Genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009;11(1):35-41.

- Frank M, Prenzler A, Eils R, Graf von der Schulenburg JM. Genome sequencing: A systematic review of health economic evidence. *Health Econ Rev* 2013;3(1):29.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumour heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883-92.
- Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* 2011;11(5):759-69.
- Han JY, Kim SH, Lee YS, Lee SY, Hwang JA, Kim JY, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing with conventional sequencing for predicting the responsiveness to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) therapy in never-smokers with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2014;85(2):161-7.
- Hollebecque A, Massard C, Soria JC. Implementing precision medicine initiatives in the clinic: A new paradigm in drug development. *Curr Opin Oncol* 2014;26(3):340-6.
- Hollebecque A, Massard C, De Baere T, Auger N, Lacroix L, Koubi-Pick V, et al. Molecular screening for cancer treatment optimization (MOSCATO 01): A prospective molecular triage trial—Interim results. *J Clin Oncol* 2013;31(15 Suppl):abstract 2512.
- Institut national du cancer (INCa). Synthèse de l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers en 2012, en vue d'optimiser leur évolution. Collection Bilans d'activité et d'évaluation. Boulogne-Billancourt, France : INCa; 2014. Disponible à : <http://www.e-cancer.fr/content/download/63494/571261/file/Synthese-activite-plateformes-hospitalieres-genetique-moleculaire-en-2012-2014.pdf>.
- Institute of Medicine (IOM). Evolution of translational omics: Lessons learned and the path forward. Washington, DC : National Academies Press; 2012.
- Koboldt DC, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. Challenges of sequencing human genomes. *Brief Bioinform* 2010;11(5):484-98.
- Lim HJ, Shen Y, Laskin JJ, Gelmon KA, Renouf DJ, Sun S, et al. The use of whole-genome sequencing in therapeutic for decision making in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2014;32(15 Suppl):abstract 11026.
- Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012;30(5):434-9.
- MacConaill LE. Existing and emerging technologies for tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2013;31(15):1815-24.
- Marrone M, Filipinski KK, Gillanders EM, Schully SD, Freedman AN. Multi-marker solid tumor panels using next-generation sequencing to direct molecularly targeted therapies. *PLoS Curr* 2014;6.

- Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: A practical perspective. *Clin Biochem Rev* 2011;32(4):177-95.
- Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 2010;11(10):685-96.
- Myllykangas S et Ji HP. Targeted deep resequencing of the human cancer genome using next-generation technologies. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2010;27:135-58.
- Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, Kolor K, Dotson WD. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med* 2009;11(1):21-34.
- Patel NM, Eberhard DA, Trembath DG, Kaiser-Rogers KA, Rao KW, Gulley ML, et al. Verification and reporting of somatic mutation results from massively parallel sequencing in a clinical setting: The UNCseq experience. *J Mol Diagn* 2013;15(6):903 [abstract ST03].
- PHG Foundation. Next steps in the sequence. The implications of whole genome sequencing for health in the UK. Cambridge, Royaume-Uni : PHG Foundation; 2011. Disponible à : <http://www.phgfoundation.org/file/10363/>.
- Rizzo JM et Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5(7):887-900.
- Rodrigues MJ et Gomez-Roca C. Place des technologies de séquençage haut débit en oncologie. *Bull Cancer* 2013;100(3):295-301.
- Rosenthal A, Stecker K, Pechanska P, Hinzmann B, Klasen S, Adams HP, et al. ONCO-Predict-II: A deep sequencing test predicting outcome in patients with colorectal cancer of stage II based on mutations signatures in driver genes. *EJC* 2013;49(Suppl 2):S491 [abstract 2179].
- Ross JS et Cronin M. Whole cancer genome sequencing by next-generation methods. *Am J Clin Pathol* 2011;136(4):527-39.
- Sanderson S, Zimmern R, Kroese M, Higgins J, Patch C, Emery J. How can the evaluation of genetics tests be enhanced? Lessons learned from the ACCE framework and evaluating genetic tests in the United Kingdom. *Genet Med* 2005;7(7):495-500.
- Schrijver I, Aziz N, Farkas DH, Furtado M, Gonzalez AF, Greiner TC, et al. Opportunities and challenges associated with clinical diagnostic genome sequencing: A report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2012;14(6):525-40.
- Sheridan C. Milestone approval lifts Illumina's NGS from research into clinic. *Nat Biotechnol* 2014;32(2):111-2.
- Simon R. Clinical trial designs for evaluating the medical utility of prognostic and predictive biomarkers in oncology. *Per Med* 2010;7(1):33-47.

- Taber Johansen KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Intern Med* 2013;174(2):275-80.
- Takahashi H, Shitara K, Kuwata T, Naito Y, Matsumoto S, Okamoto W, et al. Feasibility of amplicon sequencing using a pan-cancer gene panel with pre-treatment biopsy samples of (Japanese) patients with advanced solid tumors: Analyses of Biopsy Samples for Cancer Genomics (ABC) study. *Mol Cancer Ther* 2013;12(11 Suppl):abstract B29.
- Tran B, Brown AM, Bedard PL, Winquist E, Goss GD, Hotte SJ, et al. Feasibility of real time next generation sequencing of cancer genes linked to drug response: Results from a clinical trial. *Int J Cancer* 2012;132(7):1547-55.
- Tuna M et Amos CI. Genomic sequencing in cancer. *Cancer Lett* 2013;340(2):161-70.
- Van Allen EM, Wagle N, Levy MA. Clinical analysis and interpretation of cancer genome data. *J Clin Oncol* 2013;31(15):1825-33.
- Van den Bulcke M, San Miguel L, Salgado R, De Quecker E, De Schutter H, Waeytens A, et al. Next generation sequencing gene panels for targeted therapy in oncology and haemato-oncology. KCE Report 240. Bruxelles, Belgique : Centre fédéral d'expertise des soins de santé (KCE); 2015. Disponible à : <https://kce.fgov.be/fr/publication/report/tests-de-panels-de-g%C3%A8nes-par-next-generation-sequencing-pour-un-traitement-cibl%C3%A9->.
- Woollard PM, Mehta NA, Vamathevan JJ, Van Horn S, Bonde BK, Dow DJ. The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2011;16(11/12):512-19.
- Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, et al. An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: Insights from bench to bedside and vice versa. *World J Gastroenterol* 2014;20(14):3927-37.
- Yelensky R, Dogan S, Borsu L, Frampton G, Lipson D, Bastian BC, et al. Massively parallel sequencing of cancer FFPE specimens matches diagnostic accuracy of methods in current clinical use and reveals additional actionable mutations. *Cancer Res* 2012;72(8 Suppl):abstract 965.