

Canadian Journal of

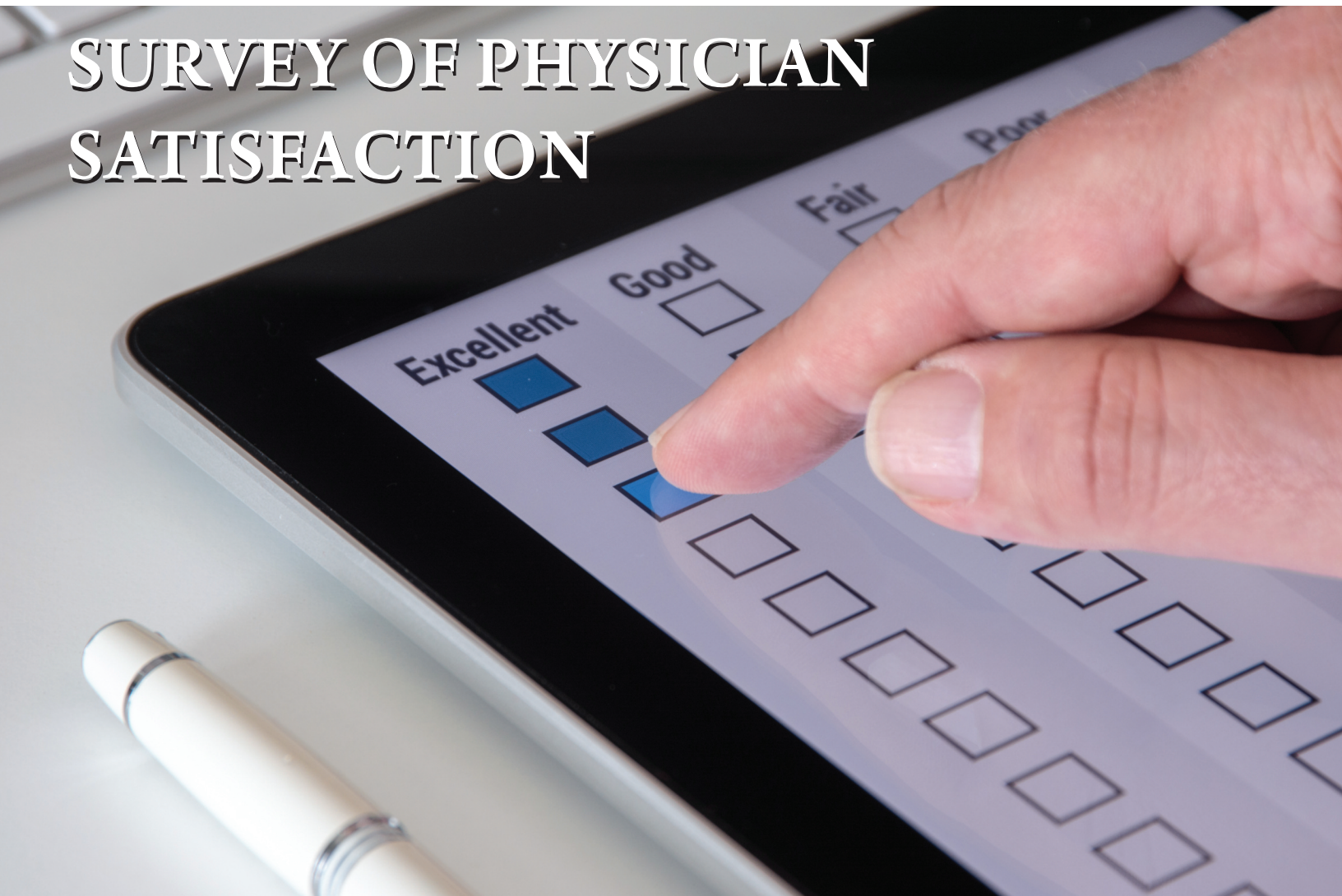
Volume 10 | Issue/numéro 2

PATHOLOGY

PATHOLOGIE

Revue canadienne de

SURVEY OF PHYSICIAN SATISFACTION



PM 43490512



www.cap-acp.org



EDITORIAL BOARD

Irvaym B. Barsoum MD, MSc, PhD; Michael Carter MD, PhD; Hala Faragalla MD FRCPC; Louis Gaboury MD, PhD, FRCPC, FCAP; John Gartner MD CM, FRCPC; Laurette Geldenhuys MBBCH, FFPATH, MMed, FRCPC, MAEd, FIAC; Zeina Ghorab MD, MSc; Nadia Ismiil MBChB, FRCPC; Jason Karamchandani MD; Adriana Krizova MD, MSc, FRCPC; David Munoz, MD, MSc, FRCPC; Christopher Naugler MD, FRCPC; Tony Ng MD, PhD FRCPC; Sharon Nofech-Mozes MD; Maria Pasic PhD, FCACB; Aaron Pollett MD, MSc, FRCPC; Rola Saleeb MD; Harman Sekhon MD, PhD, FCAP; Monalisa Sur MBBS, FCPATH, MMed., MRCPATH, FRCPC; Aducio Thiesen MD, PhD, MSc, FRCPC; Stephen Yip MD, PhD, FRCPC.

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Emma H. Allott PhD, University of North Carolina, USA; Fredrik Bosman MD, PhD, University of Lausanne, Switzerland; Daniel Chan PhD, DABCC, FACB, Johns Hopkins University School of Medicine, USA; Runjan Chetty MB BCh, FRCPA, FFPATH, FRCPath, FRCPC, FCAP, Dphil, University of Toronto, Canada; Kumarasen Cooper MBChB, Dphil, FRCPath, University of Pennsylvania, USA; Brett Delahunt BSc MD, BSc Hons, BMedSc, MB ChB, FRCPA, FFSc, FRCPath, University of Otago, New Zealand; Sunil R Lakhani BSc (Hon), MBBS, MRCPATH, MD, FRCPath, FRCPA, The University of Queensland, Australia; Virginia A. LiVolsi MD, MASCP, University of Pennsylvania, USA; Ricardo Lloyd MD, PhD, University of Wisconsin, USA; Jesse Mckenney MD, Cleveland Clinic, USA; Chris Meijer MD, PhD, VU University, The Netherlands; George Netto MD, PhD, Johns Hopkins University School of Medicine, USA; Isobel Scarisbrick PhD, Mayo Clinic, USA; Manfred Schmitt, Dr. rer. nat., Dr. med. habil. (Ph. D., M.D. sci.), Dipl.-Biologist, Technical University, Munich, Germany; Iris Schrijver MD, Stanford University, USA; Andreas Scorilas PhD, University of Athens, Greece; Ming Tsao, MD FRCPC, University of Toronto, Canada; Mark Wick MD, University of Virginia, USA.

COMITÉ DE RÉDACTION

Irvaym B. Barsoum M. D., M. Sc, Ph.D; Michael Carter M. D., Ph. D; Hala Faragalla M. D., FRCPC; Louis Gaboury M. D., Ph. D., FRCPC, FCAP; John Gartner M. D. CM, FRCPC; Laurette Geldenhuys MBBCH, FFPATH, MMed, FRCPC, MAEd, FIAC; Zeina Ghorab M. D.; Nadia Ismiil MBChB, FRCPC; Jason Karamchandani M. D.; Adriana Krizova M. D., M. Sc, FRCPC; David Munoz M. D., M. Sc, FRCPC; Christopher Naugler M. D., FRCPC; Tony Ng, M. D., Ph. D., FRCPC; Sharon Nofech-Mozes M. D.; Maria Pasic Ph. D., FCACB; Aaron Pollett M. D., M. Sc, FRCPC; Rola Saleeb M. D.; Harman Sekhon M. D., Ph. D, FCAP; Monalisa Sur MBBS, FCPATH, MMed., MRCPATH, FRCPC; Aducio Thiesen M. D., Ph. D, M. Sc, FRCPC; Stephen Yip M. D., Ph. D, FRCPC.

COMITÉ DE RÉDACTION INTERNATIONALE

Emma H. Allott Ph. D, Université de North Carolina, É.-U.; Fredrik Bosman M. D., Ph. D., Université de Lausanne, Suisse; Daniel Chan Ph. D., DABCC, FACB, faculté de médecine de l'Université Johns Hopkins, É.-U.; Kumarasen Cooper MBChB, Dphil, FRCPath, Université de la Pennsylvanie, É.-U.; Brett Delahunt B. Sc Hons BMedSc MB ChB MD FRCPA FFSc FRCPath, Université d'Otago, Nouvelle-Zélande; Sunil R Lakhani M. D. B. Sc (Hon), MBBS, MRCPATH, FRCPath, FRCPA, Université de Queensland, Australie; Virginia A. LiVolsi M. D., MASCP, Université de la Pennsylvanie, É.-U.; Ricardo Lloyd M. D., Ph. D, Université du Wisconsin, É.-U.; Jesse Mckenney M. D., Clinique de Cleveland, É.-U.; Chris Meijer M. D., Ph. D., Université VU, Pays-Bas; George Netto M. D., Ph. D., faculté de médecine de l'Université Johns Hopkins, É.-U.; Isobel Scarisbrick, Ph. D., Clinique Mayo, É.-U.; Manfred Schmitt, Dr. rer. nat., Dr. med. habil. (Ph. D., M.D. sci.), Dipl.-Biologist, Université polytechnique, Munich, Allemagne; Iris Schrijver M. D., Université Stanford, É.-U.; Andreas Scorilas Ph. D., Université d'Athènes, Grèce; Ming Tsao M. D. FRCPC, Université de Toronto, Canada; Mark Wick M. D., Université de la Virginie, É.-U.



Volume 10 | Issue 2

Canadian Journal of PATHOLOGY

Official Publication of the Canadian Association of Pathologists

EDITOR-IN-CHIEF

George M Yousef MD, PhD, FRCPC

EDITOR EMERITUS

J. Godfrey Heathcote MA, MB, BChir, PhD, FRCPC

FOUNDING EDITOR

Jagdish Butany MBBS, MS, FRCPC

ASSOCIATE EDITOR

Martin J. Trotter MD, PhD, FRCPC

PUBLISHING EDITOR

Deborah McNamara

ART DIRECTOR

Sherri Keenan

TRANSLATION

Magali Cloutier Provencher
Éliane Fréchette

PUBLISHING AGENCY

Clockwork Communications Inc.
PO Box 33145, Halifax, NS, B3L 4T6
902.442.3882 / info@ClockworkCanada.com

Canadian Journal of Pathology is a peer-reviewed journal published four times per year, by Clockwork Communications Inc., on behalf of the Canadian Association of Pathologists.

We cannot assume responsibility or commitment for unsolicited material. Any editorial material, including photographs, that are accepted from an unsolicited contributor, will become the property of the *Canadian Association of Pathologists*.

Copyright Canadian Association of Pathologists (CAP-ACP). All rights reserved. Reprinting in part or in whole forbidden without express written consent from CAP-ACP.

We welcome editorial submissions to
www.CanadianJournalOfPathology.ca

Publications Mail Agreement No. 43490512

ISSN 1918-915X (print)

ISSN 1918-9168 (online)

Return undeliverable Canadian addresses to:

Clockwork Communications Inc

PO Box 33145

Halifax, NS B3L 1K3

www.cap-acp.org

TABLE OF CONTENTS

- 4 Letter from the Editor-in-Chief:** Funding your research project: Time to think outside the box?
- 9 Molecular Pathology Corner:** The role of next generation sequencing in current laboratory diagnostics
Authors: Henriett Butz MD, PhD, Attila Patócs MD, MSc, PhD.

PATHOLOGISTS' ASSISTANTS CORNER

- 22 Case of the Month:** Rhabdomyosarcoma
Author: Martin Grealish MLT, MTM, PA(CCCPA).

RESEARCH ARTICLE

- 29 Survey of physician satisfaction with anatomical pathology services in Alberta**
Authors: Denise La Perle MLT, Angela Thompson MD, FRCPC, Allie Moskalyk MLT, Reanne Cunningham MLT, and Máire A. Duggan MD, FRCPC.
- 39 HER2 overexpression and amplification in diffuse gastric cancer in Newfoundland and Labrador**
Authors: Robyn Ndikumana MD, BScN, Altaf Taher MD, FRCPC, FCAP, Polycarp Eriwwo MBBS, FMCPATH, FRCPC, Melanie Seal MD, FRCPC.

CASE REPORT & REVIEWS

- 48 Update on the molecular pathology of diffusely infiltrating gliomas**
Authors: Andrew F. Gao MD and David G. Munoz MD, MSc.
- 57 Primary cardiac angiosarcoma with C-KIT expression: A case report and review of literature**
Authors: Mubarak Al-Shraim MD, FRCPC, Howadah Elhakeem MD, Ahmed Rezk MD, Mahmoud Rezk Abdelwahed Hussein MD, PhD, Jagdish W. Butany MD, FRCPC.
- 62 Appendiceal vasculitis with subsequent macrophage activation syndrome**
Authors: Jolanta Jedrzekiewicz MD, Liane Heale MD, Robert H. Riddell MBBS, William Dubinski MD, Ronald M. Laxer MD, Iram Siddiqui MBBS.
- 68 Spermatic cord paraganglioma: A case report and literature review**
Authors: Ryan DeCoste MD, Jonathan Moore MD, Padraic O'Malley MD, Jennifer Merrimen MD.

KEYWORDS:

next generation sequencing; laboratory diagnostics, genetic testing

THE ROLE OF NEXT GENERATION SEQUENCING IN CURRENT LABORATORY DIAGNOSTICS

Authors: Henriett Butz^{1,2} MD, PhD, Attila Patócs^{1,2} MD, MSc, PhD

Affiliations: ¹MTA-SE, Lendület Hereditary Endocrine Tumours Research Group, Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Hungary.

²Department of Laboratory Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Acknowledgements: This work has been funded by the National Research, Development and Innovation Office – NKFIH PD116093 and by Semmelweis Research-Innovation Fund (STIA-KF-17) to Henriett Butz, and by National Bionics Program to Attila Patócs. Attila Patócs is the recipient of “Lendület” grant from Hungarian Academy of Sciences. Henriett Butz is the recipient of a Bolyai Research Fellowship of Hungarian Academy of Sciences

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

All authors have provided CAP-ACP with non-exclusive rights to publish and otherwise deal with or make use of this article, and any photographs/images contained in it, in Canada and all other countries of the world.

ABSTRACT

In this article, we briefly review the current applications of next generation sequencing (NGS) with an overview of the technical aspects, the potential pitfalls of the methodology and bioinformatics, quality assurance and available guidelines. We summarize the role of NGS in current practice, introducing its advantages and potential drawbacks.

NEXT GENERATION SEQUENCING (cont.)

Next generation sequencing (NGS) allows assessment of multiple genomic alterations at the same time.

Next generation sequencing (NGS) allows assessment of multiple genomic alterations at the same time. Due to its time and cost effectiveness it is being rapidly integrated into laboratory diagnostics. For both identification of germline mutations in inheritable diseases and somatic alterations in sporadic tumours, NGS provides a platform to improve personalized patient care through more precise diagnosis, prognosis and therapy.^{1,2}

Although whole genome sequencing (WGS - sequencing of the entire genome) and whole exome sequencing (WES - sequencing all of the protein-coding genes) are available, the most prevalent applications of NGS are evaluation of specific genes using targeted panels.³ At present, the number of clinically significant genes with diagnostic or prognostic implications or necessary for indication of targeted therapies is low, therefore the majority of variants identified by WGS and WES cannot be easily interpreted from a clinical point of view.³ In targeted panels the interpretation of results is more direct and straightforward. The methodology is based on selection of a set of genes (from a few hundred to thousands depending on platform) by multiple polymerase chain reaction (PCR) or hybridization probes. During library preparation these fragments are tagged and bar-coded with platform specific adapters and sample barcodes. The sequencing libraries then are sequenced by synthesis. The bioinformatics analysis consists of three main steps.⁴ During primary analysis the instrument processes raw signals into nucleotide bases with various length (reads, see glossary) depending on the chemistry used. During the secondary analysis reads are aligned to a reference sequence and variants present in samples are identified (this process is named variant calling). During tertiary bioinformatics analyses the detected variants are annotated using several variant or mutation databases (variant analysis and

interpretation).⁴ The entire process needs verification and validation. As approved NGS-based in vitro diagnostic (IVD) assays are not widely available, each laboratory is required to develop and validate its own protocols including sample and library preparation, bioinformatics analysis and quality assurance. This process of monitoring quality and performance, such as analytical sensitivity, specificity, repeatability, reproducibility, accuracy, robustness, limit of detection, limitations and uncertainty, is extremely challenging.⁵ Therefore, many laboratories choose commercial kits developed for specific-purposes, today most panels are used in oncology. However, even in this case verification is still required to ensure that the sequencing reaches the pre-defined performance specifications.⁵

Pre-analytical factors (e.g. sample handling, storage and nucleic acid extraction) are also important and highly influence NGS performance. For example, in surgical pathology specimens sample sizes can be limited, formalin fixation can impair DNA quality, and there is risk of cross-contamination while cutting. Additionally, morphological assessment is also needed to rule out contamination with normal tissue and the proportion of neoplastic cells in the analysed sample is also needed for correct interpretation.⁵

Currently there is no gold standard freely-available tool or filtering settings for bioinformatics analysis related to clinical NGS applications. Each laboratory, therefore, has to develop its own pipeline, but commercially available software packages designed for NGS data analysis are preferred over homemade bioinformatics solutions.⁵

Quality filtering of read alignment defines sensitivity and specificity of the test. Using very strong filtering could lead to loss of variants present at low

NEXT GENERATION SEQUENCING (cont.)

Quality filtering of read alignment defines sensitivity and specificity of the test.

level which can be problematic for identification of mutations present at low level in somatic tumours due to the heterogeneity and/or low tumour cell ratio. Alternatively, inclusive filters can minimize false negative results but will increase the burden of confirmatory analysis.³ As read error ratio increases with the increase of coverage (read number aligned to the reference sequence) practically 300-500 reads/target has been suggested to be enough for diagnostics in molecular pathology, and variants under 5 reads are usually considered as likely false calls.^{3,5}

During variant calling and analysis it is important to identify false sequence variants and to determine variant allele frequency (VAF, see glossary). In germline testing (diploid zygosity) VAF represents near 0 and 100% for homozygosity and near 50% for heterozygosity. In somatic testing, due to the above-mentioned factors (contamination with normal tissue, neoplastic cell ratio and tumour heterogeneity) VAF can be unpredictable. Also, in case of indels (insertion and/or deletion) it is recommended to confirm the variants by manual visualization of sequencing data using software e.g. Integrative Genomics viewer (IGV)⁶ or Tablet⁷ to reduce the risk of false positive or incorrect calls.⁵

After bioinformatics, in order to maintain technical validity, confirmatory tests are recommended and needed. For validation of germline variants, Sanger sequencing is generally accepted but due to its 10-20% VAF sensitivity in case of somatic tumour mutations it is not the ideal method for confirmation of all variants revealed.³ Some recommend duplicate sequencing of the entire panels using other methodologies or

performing single-locus test for every targeted gene.³ This significantly increases costs. One needs to keep in mind that some alterations are not detectable by NGS methods due to its methodology like repetitive sequences; copy-number variations; long insertion-deletions; structural variants; aneuploidy; or epigenetic alterations.⁸ In summary, handling large data sets generated by high-throughput technologies can result in false-positive and incidental findings.⁹ As a consequence some authors highlight overtesting, overdiagnosis, and overtreatment as major side effects of translational omics.^{10,11}

To achieve clinically relevant results of molecular profiling, validation with large independent data sets is key.⁹ It is important to pay attention to other factors such as tumour type (different mutations can have different impact in different tumours) and clinical questions (diagnosis, prognosis and recommendation for targeted therapy). Both somatic and germline tissues can be assessed at the same time and the tumour tissue-specific variant subtraction can be helpful to find the clinically relevant mutations or variants³. Otherwise VAF can be taken into consideration. Generally, any germline variant presented >1% in the population is usually not relevant for hereditary cancer and various databases containing allele frequency data can help in filtering of relevant variants.^{3,5,12} Tumour specific mutation resources (COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, TCGA – The Cancer Genome Atlas, MCG – My Cancer Genome) and literature mining could add relevant information for variant interpretation. At germline level ClinVar, dbSNP, Exome Variant Server and HGMD (The Human Gene Mutation Database) can help the interpretation. Hence, the continual development of high-quality and freely accessible databases will have a profoundly positive effect on the progress of genomic medicine.⁹

NEXT GENERATION SEQUENCING (cont.)

To estimate the significance of variants of uncertain significance (VUS) is challenging. Multiple source of information (variant frequency, predictions, and subsidiary functional studies) need to be taken into account in order to achieve recommendations of guidelines (e.g. ACMG recommendations) in categorization of a particular variant.¹² Laboratories should also have a clear protocol about reporting secondary findings.¹³ Laboratory reports of NGS results also have special obligatory requirements. The report should focus on the clinically relevant information but a brief description of technical characteristics, bioinformatics pipelines, validation reports, variant annotations and classification should be included while additional, more detailed, data have to be available on request.⁵

RNA sequencing, also called whole transcriptome sequencing (WTS) is available although with less importance in clinical diagnostic testing. Nevertheless, in some rare cases like different splicing defects it can be particularly useful.¹⁴ Splicing is the process of intron removal from the primary transcripts that is an essential step in most mammalian gene expression. Mutations affecting splice sites or in genes involved in the protein complex of spliceosome can perturb this cellular function and lead to a perplexed balance of critical alternative mRNA isoforms.¹⁵ Variants leading to splicing defects have been described in hereditary, rare Mendelian disorders (e.g. Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism type I (MOPD I, or also known as Taybi-Linder Syndrome) with characteristic neurological and skeletal abnormalities and with a life span from a few months to close to 13 years).¹⁵ More recently acquired somatic mutations in splicing factors (SF3B1, ZRSR2, SF1,

PRPF40B, U2AF1, SF3A1) has been also described in hematological malignancies including myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia.¹⁵ In research settings DNA and RNA sequencing are more widely used. Both methodologies have been successfully used in identification of novel pathogenic factors like new disease-causing mutations or on determination of differentially functioning pathways and mechanisms through altered gene expression patterns.^{16,17}

The purpose of a laboratory test can be screening, diagnosis, prediction of prognosis or indication of targeted therapy (so called companion-test).

Next generation sequencing is usually not used in the classical meaning of screening (testing people without symptoms to diagnose a frequent illness). Although the use of cancer susceptibility gene panels is expanding in cancer risk assessment it is hard to estimate the appropriate risk (and management) for people harbouring a particular mutation when there is no evidence of illness especially when disease penetrance is low.¹⁸

The diagnosis of a genetic disease is usually based on clinical manifestation and genetic tests are used for confirmation of the clinical diagnosis. Therefore, genetic testing applied for testing of a special gene or a specific gene set in Mendelian disorders.¹⁹ However in clinical genetics practice of e.g. mental retardation or development disorders exome (or clinical exome: genes having known disease-causing mutations) sequencing can help to reveal the pathogenic variations.

Selected gene panel testing may be particularly useful in situations where there are multiple genes and mutations associated with a specific hereditary syndrome (e.g. dementia panels, epilepsy panels etc.) or hereditary cancer syndromes (breast and ovarian cancer, pheochromocytoma) and it is

Next generation sequencing is usually not used in the classical meaning of screening (testing people without symptoms to diagnose a frequent illness).

NEXT GENERATION SEQUENCING (cont.)

As targeted therapy and molecular diagnostics are growing, a new term “theranostics” has been introduced.

difficult to predict which gene would be mutated due to the lack of phenotype-genotype correlation.¹⁸ In the genetic susceptibility of pheochromocytoma-paraganglioma (PPGL) syndrome there are 16 different genes which together are responsible at least for one-third of all PPGL patients. Therefore germline mutations testing is recommended for all patients having PPGL to establish diagnosis of the hereditary disease. Targeted NGS library preparation kits are also available for sequencing large regions or genes such as mitochondrial genome, BRCA or CF genes that are particularly time and labour intensive and costly if performed by traditional Sanger sequencing.

Prognosis prediction is important in cancer with somatic mutations. For different cancer panels covering oncogenes (e.g. EGFR, MET, RET, PDGFRA etc.) even IVD targeted panels are available. Some mutations are predictors for prognosis (e.g. KRAS mutations in lung cancer) and also estimate response to targeted therapy.^{21,22} This leads to “companion diagnostics” giving information that is essential for the effective use of a corresponding drug. The methods and kits used for companion diagnostics are mostly predetermined and those are criteria for treatment of the particular drug. Therapy related genetic tests are indispensable because most of the targeted therapy drugs are effective only when a certain mutation is present. Also mutations of resistance can serve as contraindications to therapy. For example, for lung cancer patients with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) having a sensitizing EGFR mutations first generation EGFR tyrosine kinase inhibitors are recommended (e.g. erlotinib) while for tumours having ALK or ROS1 gene rearrangements ALK

inhibitor (crizotinib) is recommended.²¹ However, following first-line EGFR targeted therapy if the tumour has T790M mutation that is responsible for resistance first generation EGFR inhibitors has to be changed to newer agents (such as afatinib or osimertinib).²¹ As targeted therapy and molecular diagnostics are growing, a new term “theranostics” has been introduced.

To date in clinical molecular diagnostics, applications of IVD kits are only available for targeted panels mostly related to therapy. In the near future, it is expected, that companies will develop more IVD kits to meet the clinical needs.

Conclusion:

NGS is extremely useful given its very high-throughput and cost-effectiveness. Due, however, to the complexity of the assays, high number of potential pitfalls, lack of standardization of laboratory processes, lack of IVD kits and bioinformatics pipelines its application in clinical diagnostics requires expert team work from both clinical and laboratory fields.⁵ The development of laboratory processes, bioinformatics pipelines and available data for clinical interpretation will pave the road for more guidelines and recommendations that have to be followed in order to give clinically reliable results.

Glossary

Adapter: short oligonucleotide sequence linked to the ends of DNA to be sequenced for allowing the sequencing primers to hybridize

Barcode: individual short oligonucleotide sequences linked to the library fragments of each sample so they can be

distinguished during data analysis. Therefore multiple samples can be sequenced at the same time in the same reaction

Alignment: a process used for aligning short sequence reads to a reference sequence

Companion diagnostics: a diagnostic test used as a companion to a therapeutic drug to determine its applicability

Coverage: coverage is the number of reads that include a given nucleotide in the reconstructed sequence. It can be given as read/base or read/target

Filtering, quality filtering: a process used for filtering sequence reads based on various criteria including read quality scores, library preparation related quality (i.e. primer/adaptor specific sequences), homopolymers (DNA sequences containing several base pairs of the same nucleotide). Not uniquely aligned reads are also eliminated from further processing

Pipeline: a complex workflow with several steps of bioinformatics analysis of NGS data

Raw read: short sequence generated (“read”) by sequencing instrument.

Theranostics: combines specific targeted diagnostic tests with specific targeted therapy based on the result of the former

Variant allele frequency (VAF): the fraction of sequencing reads overlapping a genomic coordinate that support the non-reference (mutant/alternate) allele. (For instance in case of a germline mutation we can detect e.g. 321 wild type and 340 mutant base containing reads then $VAF=340/(321+340)$). This means 51% of the reads are mutant. In germline variations we expect values close to 0, 100 or 50% for homozygote wild type, homozygote mutant or heterozygote variant. In case of somatic mutations these numbers can be more

NEXT GENERATION SEQUENCING (cont.)

variable due to tumour heterogeneity. This can have therapeutic consequence as mutation positivity can usually be established at a low VAF for targeted therapy (depending on the diagnostic kit used)

Variant calling: a process used for identifying nucleotide variants from results of next generation sequencing data.

References

1. Yousef GM. Personalized cancer genomics: the road map to clinical implementation. *Clin Chem.* 2012;58(4):661-3.
2. Pasic MD, Samaan S, Yousef GM. Genomic medicine: new frontiers and new challenges. *Clin Chem.* 2013;59(1):158-67.
3. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* 2016;13:3-11.
4. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem.* 2015;61(1):124-35.
5. Deans ZC, Costa JL, Cree I, Dequeker E, Edsjö A, Henderson S, et al. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. *Virchows Arch.* 2017;470(1):5-20.
6. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-6.
7. Milne I, Bayer M, Stephen G, Cardle L, Marshall D. Tablet: visualizing next-generation sequence assemblies and mappings. *Methods Mol Biol.* 2016;374:253-68.
8. Yousef GM. Personalized medicine in kidney cancer: learning how to walk before we run. *Eur Urol.* 2015;68(6):1021-2.
9. Diamandis EP, Li M. The side effects of translational omics: overtesting, overdiagnosis, overtreatment. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(3):389-396.
10. Ibrahim R, Pasic M, Yousef GM. Omics for personalized medicine: defining the current we swim in. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(7):719-22.
11. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med.* 2014;370(25):2418-25.
12. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
13. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2017;19(2):249-255.
14. Wrighton KH. Genetic testing: The diagnostic power of RNA-seq. *Nat Rev Genet.* 2017;18(7):392-393.
15. Padgett RA. New connections between splicing and human disease. *Trends Genet.* 2012;28(4):147-54.
16. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet.* 2011;43(7):663-7.
17. Butz H, Ding Q, Nofech-Mozes R, Lichner Z, Ni H, Yousef GM. Elucidating mechanisms of sunitinib resistance in renal cancer: an integrated pathological-molecular analysis. *Oncotarget.* 2018;9:4661-4674.
18. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, Domchek SM, Ford JM, Hampel HL, et al. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol.* 2015;33(31):3660-7.
19. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA.* 2014;312(18):1880-7.
20. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, et al.; Endocrine Society. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):1915-42.
21. Mayekar MK, Bivona TG. Current landscape of targeted therapy in lung cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(5):757-64.
22. Marabese M, Ganzinelli M, Garassino MC, Shepherd FA, Piva S, Caiola E, et al. KRAS mutations affect prognosis of non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum containing chemotherapy. *Oncotarget.* 2015;6(32):34014-22.

MOTS-CLÉS :

séquençage de nouvelle génération; diagnostics de laboratoire, dépistage génétique

LE RÔLE DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION DANS LES DIAGNOSTICS DE LABORATOIRE ACTUELS

Auteurs : Henriett Butz M.D., Ph. D.^{1,2}; Attila Patócs M.D., M. Sc., Ph. D.^{1,2}

Affiliations : ¹MTA-SE, Groupe de recherche Lendület sur les tumeurs endocrines héréditaires, Académie hongroise des sciences et Université Semmelweis, Hongrie.

²Département de médecine de laboratoire, Université Semmelweis, Budapest, Hongrie.

Remerciements : Ce travail a été financé par le Bureau national de la recherche, du développement et de l'innovation – NKFIH PD116093 et le Fonds recherche-innovation de Semmelweis (STIA-KF-17) pour Henriett Butz, par le programme national de biomimétisme pour Attila Patócs. Attila Patócs est récipiendaire de la bourse « Lendület » de l'Académie hongroise des sciences. Henriett Butz est récipiendaire de la bourse de recherche Bolyai de l'Académie hongroise des sciences.

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts relativement à la publication de cet article.

Tous les auteurs ont accordé à la CAP-ACP le droit non exclusif de publier et d'utiliser cet article et toute photographie ou image qu'il renferme, ou d'en disposer autrement, au Canada et partout ailleurs dans le monde.

RÉSUMÉ

Dans cet article, nous passons brièvement en revue les applications actuelles du séquençage de nouvelle génération (SNG) et donnons un aperçu de ses aspects techniques, des pièges potentiels de la méthodologie et de la bio-informatique, de l'assurance de la qualité et des lignes directrices disponibles. Nous résumons le rôle du SNG dans la pratique actuelle, et présentons ses avantages et ses inconvénients potentiels.

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (suite)

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) permet d'évaluer de nombreuses altérations génomiques en même temps.

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) permet d'évaluer de nombreuses altérations génomiques en même temps. En raison de sa grande vitesse d'exécution et de son bon rapport coût-efficacité, il est rapidement intégré dans les diagnostics de laboratoire. Que ce soit pour repérer des mutations germinales dans les maladies héréditaires ou des mutations somatiques dans les tumeurs sporadiques, le SNG fournit une plateforme pour l'amélioration des soins personnalisés aux patients grâce à un diagnostic, à un pronostic et à un traitement plus précis^{1,2}.

Même si le séquençage du génome entier (SGE – séquençage du génome complet) et le séquençage de l'exome entier (SEE – séquençage de tous les gènes codant pour des protéines) sont accessibles, le SNG est plus souvent utilisé pour l'analyse de gènes précis au moyen de panels ciblés³. À l'heure actuelle, le nombre de gènes importants sur le plan clinique et ayant des répercussions sur le diagnostic ou le pronostic ou nécessaires à l'indication de traitements ciblés est faible, donc la majorité des variants identifiés par le SGE ou le SEE ne peuvent pas être facilement interprétés d'un point de vue clinique³. Par contre, en ce qui concerne les panels ciblés, l'interprétation des résultats est plus directe et plus simple. La méthodologie se fonde sur la sélection d'un ensemble de gènes (de quelques centaines jusqu'à plusieurs milliers, selon la plateforme) par plusieurs amplifications en chaîne par polymérase (PCR) ou sondes d'ADN. Durant la préparation des bibliothèques, ces fragments d'ADN sont étiquetés et on leur affecte un code à barres aux adaptateurs propres à la plateforme utilisée ainsi qu'un code à barres pour chaque échantillon. On effectue ensuite leur séquençage par synthèse. L'analyse bio-informatique comprend trois étapes principales⁴. Durant l'analyse primaire, l'instrument transforme les signaux bruts en bases nucléotidiques de différentes longueurs (lectures, voir le glossaire) selon le procédé chimique utilisé. Durant l'analyse secondaire, les lectures sont alignées à une séquence de référence et les

variants présents dans les échantillons sont repérés (ce processus se nomme la détection des variants). Durant l'analyse bio-informatique tertiaire, les variants détectés sont identifiés à partir de plusieurs bases de données de variants ou de mutations (analyse et interprétation des variants)⁴. L'ensemble du processus doit être vérifié et validé. Puisque les méthodes diagnostiques in vitro (DIV) fondées sur le SNG ne sont pas largement accessibles, chaque laboratoire doit élaborer et valider ses propres protocoles, incluant la préparation des échantillons et de la bibliothèque, son analyse bio-informatique et son assurance de la qualité. Ce processus de surveillance de la qualité et du rendement, qui comprend la sensibilité analytique, la spécificité, la répétabilité, la reproductibilité, l'exactitude, la robustesse, la limite de détection, les limites et l'incertitude, est extrêmement ardu⁵. Par conséquent, de nombreux laboratoires choisissent des trousseaux commerciaux conçus à des fins précises et, de nos jours, la plupart des panels sont utilisés en oncologie. Cependant, même dans ce cas, la vérification est requise pour s'assurer que le séquençage atteint les caractéristiques de rendement prédéfinies⁵.

Les facteurs préanalytiques (p. ex. la manipulation des échantillons, l'entreposage et l'extraction de l'acide nucléique) sont également importants et influencent grandement le rendement du SNG. Par exemple, en pathologie chirurgicale, la taille des échantillons prélevés peut être limitée, la fixation au formol peut nuire à la qualité de l'ADN, et il y a un risque de contamination croisée pendant la coupe. De plus, une évaluation morphologique est également nécessaire pour écarter la contamination par le tissu sain et la proportion de cellules néoplasiques dans l'échantillon analysé est aussi nécessaire pour bien interpréter les résultats⁵.

Actuellement, il n'y a ni outil de référence accessible gratuitement, ni paramètres de filtration pour l'analyse bio-informatique relativement aux

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (suite)

La filtration selon la qualité de l'alignement des lectures définit la sensibilité et la spécificité de l'analyse.

applications cliniques du SNG. Par conséquent, chaque laboratoire doit élaborer sa propre chaîne de traitement (pipeline), mais les progiciels disponibles sur le marché et conçus pour l'analyse des données du SNG sont préférés aux solutions bio-informatiques maison⁵.

La filtration selon la qualité de l'alignement des lectures définit la sensibilité et la spécificité de l'analyse. L'utilisation de filtres très puissants pourrait entraîner la perte de variants faiblement exprimés, ce qui peut être problématique pour l'identification de mutations présentes en faible quantité dans les tumeurs somatiques en raison de l'hétérogénéité ou de la faible concentration des cellules tumorales. L'utilisation de filtres moins restrictifs peut quant à elle permettre de minimiser les faux négatifs, mais risque d'augmenter le fardeau de l'analyse de confirmation³. Puisque le taux d'erreur de lecture augmente avec l'augmentation de la couverture (nombre de lectures alignées à la séquence de référence), dans la pratique, de 300 à 500 lectures par cible seraient suffisantes pour le diagnostic en pathologie moléculaire, et les variants détectés dans moins de cinq lectures sont habituellement considérés comme étant vraisemblablement de fausses détections^{3,5}.

Durant la détection et l'analyse des variants, il est important d'identifier les faux positifs et de déterminer la fréquence allélique d'un variant (FAV, voir glossaire). Dans les tests germinaux (zygosité diploïde), la FAV est près de 0, et de 100 % pour l'homozygosité et près de 50 % pour l'hétérozygosité. Dans les tests somatiques, en raison des facteurs susmentionnés (contamination par le tissu sain, taux de cellules néoplasiques et hétérogénéité de la tumeur), il peut être difficile de prévoir la FAV. De plus, dans les cas d'indels (insertion ou délétion), il est recommandé de confirmer les variants par analyse manuelle des données de séquençage au moyen d'un logiciel comme Integrative Genomics Viewer (IGV)⁶ ou Tablet⁷ pour réduire le risque de faux positif ou de détection inexacte⁵.

Afin de maintenir la validité technique après l'analyse bio-informatique, des tests de confirmation sont recommandés et nécessaires. Pour la validation des variants germinaux, le séquençage Sanger est généralement accepté, mais en raison de l'incertitude de 10 à 20 % de la FAV en cas de mutations d'une tumeur somatique, ce n'est pas la méthode idéale pour la confirmation de tous les variants détectés³. Certains recommandent de dupliquer le séquençage de l'ensemble des panels au moyen d'autres méthodologies ou de vérifier le locus pour chaque gène ciblé³. Or, cela fait grimper considérablement les coûts. Il faut garder à l'esprit que certaines altérations, comme les séquences répétitives, la variation du nombre de copies, les insertions-délétions longues, les variants structuraux, l'aneuploïdie ou les altérations épigénétiques⁸ ne sont pas détectables par les méthodes de SNG. En résumé, la manipulation de gros ensembles de données générés par des technologies à haut débit peut entraîner des faux positifs et des découvertes fortuites⁹. Par conséquent, certains auteurs soulignent que les tests excessifs, le surdiagnostic et le surtraitement sont des effets secondaires importants des approches « omiques »^{10,11}.

Pour parvenir à des résultats de profilage moléculaire pertinents sur le plan clinique, la validation au moyen de gros ensembles de données indépendants est essentielle⁹. Il est important de porter attention aux autres facteurs, comme le type de tumeur (des mutations différentes peuvent avoir des répercussions différentes sur des tumeurs différentes) et les sujets d'ordre clinique (diagnostic, pronostic et recommandation de traitement ciblé). Les tissus somatiques et germinaux peuvent être analysés en même temps et la soustraction du variant propre au tissu tumoral peut être utile pour trouver les mutations ou les variants pertinents sur le plan clinique³. Autrement, la FAV peut être prise en considération. Généralement, tout variant germinale présent chez moins de 1 % de la population n'est habituellement pas pertinent pour les

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (suite)

cancers héréditaires, et les diverses bases de données sur la fréquence des allèles peuvent aider à filtrer les variants pertinents^{3,5,12}. Les ressources sur les mutations propres aux tumeurs (COSMIC – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, TCGA – The Cancer Genome Atlas, MCG – My Cancer Genome) et une exploration de la littérature pourraient ajouter de l'information utile à l'interprétation des variants. Sur le plan germlinal, ClinVar, dbSNP, Exome Variant Server et HGMD (The Human Gene Mutation Database) peuvent aider à l'interprétation. Ainsi, le développement continu de bases de données de grande qualité et accessibles gratuitement aura un effet positif important sur les avancées de la médecine génomique⁹.

Il est difficile de juger de la pertinence des variants de signification incertaine (VSI). De multiples sources d'information (fréquence des variants, prévisions et études fonctionnelles secondaires) doivent être prises en compte afin de parvenir à respecter les recommandations des lignes directrices (p. ex. les recommandations de l'ACMG) pour la catégorisation d'un variant particulier¹². Les laboratoires devraient également détenir un protocole bien défini sur la déclaration des observations secondaires¹³. Les rapports de laboratoire sur les résultats du SNG doivent aussi se conformer à des exigences particulières. Le rapport devrait présenter principalement l'information pertinente sur le plan clinique, avec une brève description des caractéristiques techniques, des chaînes de traitement bio-informatiques, des rapports de validation, des annotations et de la classification des variants, les données additionnelles, plus détaillées devant être disponibles sur demande⁵.

Le séquençage de l'ARN, aussi appelé séquençage de transcriptome entier (STE), est possible, mais prend une moins grande place dans les tests diagnostiques cliniques. Néanmoins, dans certains cas rares, comme différents défauts d'épissage, il peut être particulièrement utile¹⁴. L'épissage est le processus au cours

duquel les introns sont éliminés des transcrits primaires, une étape essentielle à l'expression de la plupart des gènes chez les mammifères. Les mutations affectant les sites d'épissage ou se retrouvant dans les gènes impliqués dans le complexe protéique du spliceosome peuvent perturber cette fonction cellulaire et mener à un équilibre instable des isoformes d'ARNm alternatifs fondamentaux¹⁵. Les variants menant aux erreurs d'épissage ont été décrits dans des troubles mendéliens rares et héréditaires (p. ex. le nanisme microcéphalique ostéodysplasique primordial type 1 (MOPD type I, aussi connu sous le nom de syndrome de Taybi-Linder) présentant des anomalies squelettiques et neurologiques caractéristiques, l'espérance de vie des personnes atteintes variant de quelques mois à près de 13 ans)¹⁵. Des mutations somatiques plus récemment acquises dans les facteurs d'épissage (SF3B1, ZRSR2, SF1, PRPF40B, U2AF1, SF3A1) ont également été décrites dans des hémopathies malignes, dont le syndrome myélodysplasique, la leucémie myéloïde aiguë, la leucémie lymphoïde chronique et la leucémie myélomonocytaire chronique¹⁵. Dans les milieux de recherche, le séquençage de l'ADN et de l'ARN est plus largement utilisé. Les deux méthodologies ont permis d'identifier de nouveaux facteurs pathogènes, comme de nouvelles mutations à l'origine de maladies, et de déterminer des voies et des mécanismes différents par l'entremise de profils d'expression génique modifiés^{16,17}.

L'objectif d'un examen de laboratoire peut être le dépistage, le diagnostic, la prévision d'un pronostic ou l'indication d'un traitement ciblé (appelé test compagnon).

Le séquençage de nouvelle génération n'est habituellement pas utilisé pour le dépistage dans son sens habituel (effectuer des examens chez des gens sans symptômes pour diagnostiquer une maladie fréquente). Même si l'utilisation de panels de gènes associés à une probabilité de cancer est de plus en plus répandue pour l'évaluation de ce risque, il

est difficile d'estimer le risque et la prise en charge appropriés chez les gens porteurs d'une mutation particulière lorsqu'il n'y a pas de signes de maladie, particulièrement lorsque la pénétrance du gène est faible¹⁸.

Le diagnostic d'une maladie génétique est habituellement fondé sur une manifestation clinique et les analyses génétiques sont utilisées pour confirmer ce diagnostic clinique. Par conséquent, des analyses génétiques sont utilisées pour analyser un gène particulier ou un ensemble de gènes propres à des maladies mendéliennes¹⁹. Cependant, dans la pratique clinique de la génétique, par exemple pour un exome de retard mental ou de trouble du développement (ou un exome clinique : gènes ayant des mutations pathogènes connues), le séquençage peut aider à révéler des mutations pathogènes.

Des analyses de panels de gènes sélectionnés peuvent être particulièrement utiles dans des situations où il y a plusieurs gènes et mutations associés à un syndrome héréditaire précis (p. ex. les panels de démence, de l'épilepsie, etc.) ou à des syndromes de cancers héréditaires (cancer du sein et de l'ovaire, phéochromocytome) et il est difficile de prévoir quel sera le gène muté en raison de l'absence de corrélation phénotype/génotype¹⁸. Dans la prédisposition génétique du syndrome paragangliome / phéochromocytome (PPGL), il existe 16 gènes différents qui, ensemble, sont responsables d'au moins un tiers des cas de PPGL. Par conséquent, une analyse des mutations germinales est recommandée pour tous les patients atteints du PPGL afin d'établir le diagnostic de maladie héréditaire. Les trousse de préparation de la bibliothèque de SNG ciblé sont aussi disponibles pour le séquençage de grandes régions ou de gènes comme le génome mitochondrial, le gène BRCA ou le gène responsable de la fibrose kystique, qui sont particulièrement exigeants sur le plan du temps et de la main-d'œuvre et

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (suite)

coûteux s'ils sont effectués par séquençage Sanger traditionnel.

La prévision du pronostic est importante dans les cas de cancer avec mutations somatiques. Pour différents panels de cancers couvrant les oncogènes (p. ex. EGFR, MET, RET, PDGFRA, etc.) même des panels ciblant les DIV sont disponibles. Certaines mutations constituent des indications de pronostic (p. ex. les mutations KRAS dans le cancer du poumon) et permettent de prévoir la réponse au traitement ciblé^{21,22}. Cela mène au « diagnostic compagnon » qui donne de l'information essentielle à l'utilisation efficace du médicament correspondant. Les méthodes et les trousseuses utilisées pour les diagnostics compagnons sont principalement prédéterminées et il s'agit de critères pour le traitement par un médicament particulier. Les analyses génétiques associées au traitement sont indispensables, car la plupart des médicaments ciblés sont efficaces seulement en présence d'une certaine mutation. De plus, les mutations de résistance peuvent être une contre-indication au traitement. Par exemple, en ce qui concerne les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules de stade IV (CPNPC) présentant des mutations activatrices de l'EGFR, les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR de première génération sont recommandés (p. ex. l'erlotinib), alors que pour les tumeurs présentant des réarrangements d'ALK ou de ROS1, un inhibiteur d'ALK (crizotinib) est recommandé²¹. Cependant, après le traitement de première intention ciblant l'EGFR, si la tumeur présente une mutation T790M qui est responsable d'une résistance, les inhibiteurs de l'EGFR de première génération doivent être remplacés par de nouveaux agents (comme l'afatinib ou l'osimertinib)²¹. Comme les traitements ciblés et les diagnostics moléculaires sont de plus en plus présents, le terme « théranostique » a été inventé.

À ce jour, dans les diagnostics moléculaires cliniques, les applications

des trousseuses de DIV sont seulement accessibles pour les panels ciblés principalement associés à un traitement. Dans un avenir rapproché, on s'attend à ce que les entreprises conçoivent davantage de trousseuses de DIV pour répondre aux besoins cliniques.

Conclusion :

Le SNG est extrêmement utile étant donné son haut débit et son bon rapport coût-efficacité. Cependant, en raison de la complexité des méthodes d'analyse, du grand nombre de pièges potentiels, de l'absence de normalisation des processus de laboratoire, du manque de trousseuses de DIV et de chaînes de traitement bio-informatiques, son application dans les diagnostics cliniques exige le travail d'une équipe d'experts des domaines cliniques et de laboratoire⁵. L'élaboration de procédures de laboratoire et de chaînes de traitement bio-informatiques et la mise à disposition de données pour l'interprétation clinique permettront la création de davantage de lignes directrices et de recommandations qui devront être suivies afin d'obtenir des résultats fiables sur le plan clinique.

Glossaire

Adaptateur : courte séquence d'oligonucléotides liée aux extrémités de l'ADN à séquencer pour permettre à l'amorce de séquençage de s'hybrider.

Code à barres : courtes séquences individuelles d'oligonucléotides liées à la bibliothèque de fragments de chaque échantillon afin qu'ils puissent être différenciés durant l'analyse des données. Par conséquent, de nombreux échantillons peuvent être séquencés en même temps, dans la même réaction.

Alignement : processus utilisé pour aligner des lectures de séquences courtes à une séquence de référence.

Diagnostics compagnons : test diagnostique utilisé de pair avec un

médicament thérapeutique pour déterminer son applicabilité.

Couverture : désigne le nombre de lectures dans lesquelles un nucléotide donné est présent dans la séquence reconstruite. Elle peut être donnée en nombre de lectures par base ou en nombre de lectures par cible.

Filtration, filtration selon la qualité : processus utilisé pour filtrer les lectures de séquence en fonction de divers critères, dont les scores de qualité de la lecture, la qualité de la préparation de la bibliothèque (c.-à-d. les séquences précises amorce/adaptateur), les homopolymères (séquences d'ADN contenant plusieurs paires de bases du même nucléotide). Les lectures qui n'ont pas d'alignement unique sont aussi éliminées du processus.

Chaînes de traitement : flux des travaux complexe comprenant plusieurs étapes d'analyse bio-informatique des données de SNG.

Lecture brute : séquence courte générée (« lecture ») par un instrument de séquençage.

Théranostique : association des tests diagnostiques ciblés particuliers à un traitement ciblé précis en fonction du résultat de ces derniers.

Fréquence allélique du variant (FAV) : fraction des lectures de séquençage chevauchant une coordonnée génomique qui soutient l'allèle mutant/alternatif. (Par exemple, en cas de mutation germinale, nous pouvons détecter 321 lectures comprenant le gène de type sauvage et 340 lectures contenant le gène muté, donc la FAV = $340/(321+340)$). Cela signifie que 51 % des lectures concernent une mutation. En ce qui concerne les variations germinales, nous nous attendons à des valeurs près de 0, 100 % ou 50 % pour le type sauvage homozygote, mutant homozygote ou variant hétérozygote. Dans le cas des mutations somatiques, ces chiffres peuvent être plus variables

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (suite)

en raison de l'hétérogénéité de la tumeur. Cela peut avoir une conséquence sur le plan thérapeutique, puisque la présence de la mutation peut habituellement être détectée à une FAV faible pour le traitement ciblé (selon la trousse de diagnostic utilisée).

Détection des variants : processus utilisé pour détecter les variants de nucléotides des résultats des données de séquençage de nouvelle génération.

Références

1. Yousef GM. Personalized cancer genomics: the road map to clinical implementation. *Clin Chem.* 2012;58(4):661-3.
2. Pasic MD, Samaan S, Yousef GM. Genomic medicine: new frontiers and new challenges. *Clin Chem.* 2013;59(1):158-67.
3. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* 2016;13:3-11.
4. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem.* 2015;61(1):124-35.
5. Deans ZC, Costa JL, Cree I, Dequeker E, Edsjö A, Henderson S, et al. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. *Virchows Arch.* 2017;470(1):5-20.
6. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-6.
7. Milne I, Bayer M, Stephen G, Cardle L, Marshall D. Tablet: visualizing next-generation sequence assemblies and mappings. *Methods Mol Biol.* 2016;374:253-68.
8. Yousef GM. Personalized medicine in kidney cancer: learning how to walk before we run. *Eur Urol.* 2015;68(6):1021-2.
9. Diamandis EP, Li M. The side effects of translational omics: overtesting, overdiagnosis, overtreatment. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(3):389-396.
10. Ibrahim R, Pasic M, Yousef GM. Omics for personalized medicine: defining the current we swim in. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(7):719-22.
11. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med.* 2014;370(25):2418-25.
12. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
13. Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2017;19(2):249-255.
14. Wrighton KH. Genetic testing: The diagnostic power of RNA-seq. *Nat Rev Genet.* 2017;18(7):392-393.
15. Padgett RA. New connections between splicing and human disease. *Trends Genet.* 2012;28(4):147-54.
16. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet.* 2011;43(7):663-7.
17. Butz H, Ding Q, Nofech-Mozes R, Lichner Z, Ni H, Yousef GM. Elucidating mechanisms of sunitinib resistance in renal cancer: an integrated pathological-molecular analysis. *Oncotarget.* 2018;9:4661-4674.
18. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, Domchek SM, Ford JM, Hampel HL, et al. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol.* 2015;33(31):3660-7.
19. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA.* 2014;312(18):1880-7.
20. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, et al.; Endocrine Society. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):1915-42.
21. Mayekar MK, Bivona TG. Current landscape of targeted therapy in lung cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(5):757-64.
22. Marabese M, Ganzinelli M, Garassino MC, Shepherd FA, Piva S, Caiola E, et al. KRAS mutations affect prognosis of non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum containing chemotherapy. *Oncotarget.* 2015;6(32):34014-22.