

[Pathologie](#)

Le séquençage de nouvelle génération en pathologie: l'avenir est en marche

Kirsten D. Mertz, Aino Paasinen Sohns, Gieri Cathomas

Institut für Pathologie, Kantonsspital Baselland, Liestal

La médecine personnalisée ou médecine de précision, avec des approches thérapeutiques élaborées sur mesure pour chaque patient, offre une perspective prometteuse pour la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies. La détection rapide et fiable des altérations génétiques congénitales ou acquises grâce à de nouvelles méthodes de pathologie moléculaire constitue une composante essentielle de la médecine personnalisée.

La mise en évidence d'altérations génétiques joue un rôle décisif dans la pathologie des maladies tumorales car elle permet d'évaluer l'efficacité des traitements ciblés et de contribuer au diagnostic différentiel de maladies difficiles à diagnostiquer. Ainsi, l'analyse moléculaire des altérations génétiques (mutations, amplifications, délétions, fusions) complète le diagnostic morphologique, qui est basé sur des techniques classiques telles que les analyses macro- et microscopiques des tissus et l'immunohistochimie [1]. Le nombre de marqueurs moléculaires pertinents pour le diagnostic et le pronostic de maladies malignes a fortement augmenté au cours des dernières années; aujourd'hui, un nombre croissant d'entités tumorales sont même exclusivement définies par des altérations moléculaires spécifiques. La pathologie moléculaire est donc un domaine qui gagne de l'importance dans l'arsenal thérapeutique du pathologue, car elle contribue à une meilleure compréhension des altérations moléculaires complexes dans les maladies tumorales [2].

La survenue et la croissance incontrôlée de tumeurs solides sont causées par l'activation de voies de signalisation qui favorisent la prolifération ou inhibent l'apoptose. Différentes causes moléculaires peuvent en être à l'origine: des aberrations chromosomiques telles que des amplifications ou translocations de gènes, des mutations ponctuelles ou des modifications épigénétiques du génome. La pathologie moléculaire offre un large spectre de méthodes d'identification des variations génétiques par l'analyse de segments génétiques

individuels au niveau des acides nucléiques. Le séquençage ADN s'effectue traditionnellement avec la méthode de Sanger ou par des méthodes modifiées telles que le pyroséquençage. Pour toutes ces techniques, chaque segment génétique est analysé séparément. L'examen moléculaire des tumeurs s'effectue le plus souvent sur des tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Cette méthode de fixation a un impact sur la qualité des acides nucléiques (ADN, ARN) et permet donc uniquement l'examen de segments relativement courts. L'incorporation de tissus non tumoraux dans un bloc

Les technologies de séquençage de nouvelle génération ont le potentiel pour modifier en profondeur le diagnostic moléculaire en pathologie, ainsi que la prise en charge médicale

tissulaire réduit la sensibilité de la détection. Enfin, le séquençage direct se concentre sur des segments génétiques connus, c.-à-d. que des gènes cibles inattendus ou rares, potentiellement pertinents pour le traitement, sont masqués.

Le nombre en constante augmentation d'altérations nouvellement détectées dans certaines entités tumorales et le développement associé de médicaments ciblés renforcent le rôle du diagnostic de pathologie moléculaire dans la médecine personnalisée. Par exemple, jusqu'à récemment, le seul critère d'exclusion pour le traitement ciblé du cancer colorectal métastatique par anticorps monoclonaux anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*) était la présence d'une mutation KRAS,



Kirsten D. Mertz

car cette mutation rend la tumeur insensible au traitement anti-EGFR. Depuis quelques temps, il est cependant nécessaire de vérifier également le statut mutationnel de l'oncogène NRAS homologue [3]. La pathologie moléculaire permet ici de prédire plus précisément la réponse à une thérapie ciblée et l'évolution de la maladie. Le nombre croissant des gènes à tester, tests réalisés jusqu'à présent le plus souvent dans le cadre d'une démarche diagnostique par étapes, est toutefois associé à un temps et des coûts considérables, et il est difficile de réaliser tous ces tests rapidement avec les méthodes utilisées jusqu'alors. En outre, pour un nombre croissant d'analyses, seule une quantité limitée d'ADN isolé du patient est disponible, par exemple issue de petites biopsies. Afin de faire face à ces contraintes de temps et de ressources croissantes dans le diagnostic tumoral, les technologies de séquençage de nouvelle génération (*next generation sequencing*, NGS) introduites il y a environ 10 ans peuvent constituer une solution. Elles ont le potentiel nécessaire pour modifier en profondeur le diagnostic moléculaire en pathologie, ainsi que la prise en charge médicale. Les techniques de NGS remplacent la technique sérielle du séquençage de Sanger classique par un séquençage parallèle de millions de fragments d'ADN. Cela permet l'augmentation du nombre d'échantillons testés sur une durée réduite. De plus, par rapport

au séquençage de Sanger, les méthodes de NGS offrent l'avantage d'une sensibilité accrue. Ainsi, la technique de NGS permet même de mettre en évidence avec fiabilité des mutations de très basse fréquence. Alors que le déchiffrement du génome humain avec des méthodes sérielles dans le cadre du *Human Genome Project* était

Les techniques de NGS remplacent la technique sérielle du séquençage de Sanger classique par un séquençage parallèle de millions de fragments d'ADN

réalisé dans de véritables unités de séquençage de manière très coûteuse et chronophage, l'analyse des altérations génétiques peut à présent être réalisée en une fraction de temps sur un appareil de table. Cependant, la collecte des données dépend fortement d'une exploitation bioinformatique complexe, contrairement à un séquençage de Sanger. En conséquence, en cas de recours aux techniques de NGS dans le diagnostic de routine, la tendance est aux «panels de gènes». Il s'agit là du séquençage parallèle de plusieurs gènes candidats spécifiques de tumeurs dans un même temps. En se limitant au séquençage de panels, il est possible de maintenir dans des limites acceptables les coûts ainsi que la quantité de données bioinformatiques générées pour chaque patient. Toutefois, de nombreux procédés de mise en évidence génétique peuvent être mis en œuvre simultanément sur un système de NGS, alors que pour les méthodes classiques encore en service actuellement, plusieurs systèmes de détection doivent être lancés parallèlement. En plus de l'avantage évident que représente l'analyse simultanée de nombreuses altérations génétiques, les quantités relativement faibles d'ADN obtenu des tissus fixés au formol et inclus en paraffine ou du matériel cytologique suffisent à la réalisation des analyses. Ainsi, la technologie de NGS est parfaitement adaptée à une utilisation routinière en pathologie.

L'utilisation du NGS dans le diagnostic clinique routinier exige des appareils hautement spécialisés qui utilisent différentes méthodes de séquençage de type NGS. A titre d'exemple, il convient de mentionner les systèmes de Ion Torrent®, tels que Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System et Ion Proton™ System. Il s'agit là de véritables appareils de table, relativement bon marché, qui se passent de nucléotides marqués et de systèmes optiques (fig. 1). Les réactions de séquençage d'ADN se déroulent sur une puce à semi-conducteur, dans des cavités microscopiques, et le séquençage se base sur la reconstitution du brin complémentaire de l'ADN à séquencer. Au cours d'un cycle de séquençage pour une base, chacune des quatre bases complémen-

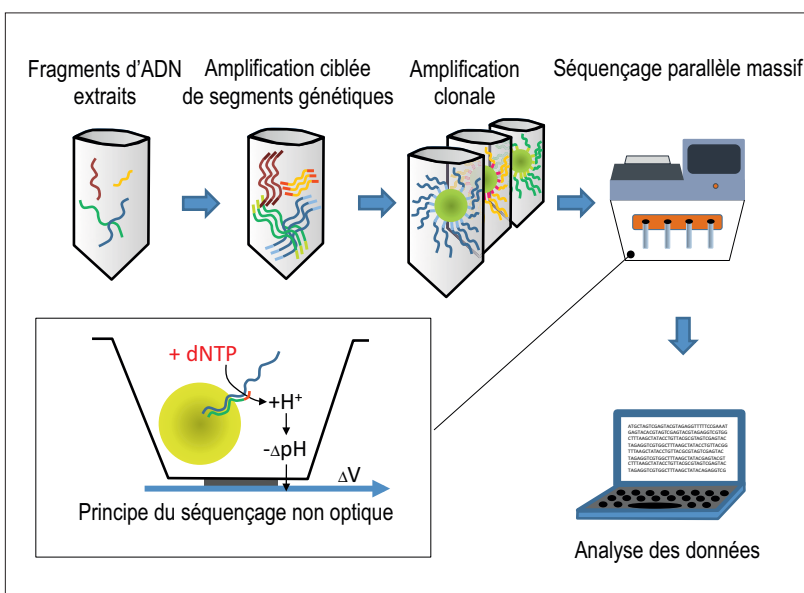


Figure 1: Principe de séquençage profond avec l'exemple de l'appareil Ion Torrent®: l'ADN cellulaire est isolé et des segments génétiques pertinents sont amplifiés de manière ciblée par des amorces spécifiques. Dans une PCR en émulsion, des fragments génétiques individuels sont amplifiés sur de petites billes, qui sont ensuite placées dans les cavités d'une puce à semi-conducteur. Dans chaque cavité, un proton est libéré lors de l'insertion d'un nucléotide, il est capté par le semi-conducteur et transmis à l'ordinateur sous forme d'impulsion électrique pour l'exploitation (Ion Torrent® – «le plus petit pH-mètre du monde»).

taires (adénosine, cytosine, guanosine, thymidine) est testée. Dès que le bon nucléotide est présent et qu'il peut être intégré, des ions H⁺ sont libérés et cela entraîne une légère altération mesurable du pH («le plus petit pH-mètre du monde»). Etant donné que ces réactions émanent d'une seule molécule d'ADN dans les différentes cavités, le rapport ADN muté/ADN non muté peut être calculé. Cela se traduit par une sensibilité élevée et par la possibilité de quantifier les altérations ADN mises en évidence.

Afin de répondre aux exigences qualitatives et quantitatives croissantes en matière de diagnostic de pathologie moléculaire, les pathologues doivent suivre la cadence des progrès rapides de la technologie du NGS. De nos jours, ces derniers jouent un rôle de plus en plus central dans l'établissement de cette nouvelle technologie et ils la rendent utilisable dans le diagnostic de routine. Néanmoins, les pathologues se retrouvent là aussi confrontés à des défis inattendus. Ils génèrent des quantités énormes de données qui leur révèlent des profils tumoraux moléculaires souvent complexes et variables d'un individu à un autre. Afin de proposer des approches thérapeutiques personnalisées à partir de ces données, des réunions de concertation interdisciplinaires («*tumor boards*») regroupant différentes disciplines, telles que la génétique humaine, la biologie

moléculaire, la chimie clinique, l'immunologie et la bioinformatique, devraient être une partie intégrante de la prise en charge clinique du patient [4, 5]. Les pathologues jouent un rôle central car ils peuvent compléter le diagnostic morphologique basé sur les tissus avec les résultats de l'analyse du génome tumoral. La médecine génomique personnalisée représente un défi auquel la médecine toute entière devrait se confronter si l'on souhaite intégrer ces nouvelles stratégies dans la pratique médicale. La pathologie a posé les jalons décisifs pour l'avenir.

Disclosure statement

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts financier ou personnel en rapport avec cet article.

Références

- 1 Moch H, Blank PR, Dietel M, Elmberger G, Kerr KM, Palacios J, Penault-Llorca F, Rossi G, Szucs TD. Personalized cancer medicine and the future of pathology. *Virchows Archive*. 2012;460(1):3–8.
- 2 Gabrielson E, Berg K, Anbazhagan R. Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Mod Pathol*. 2001;14(12):1294–99.
- 3 Dahabreh JJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2011;154(1):37–49.
- 4 Schwaederle M, Parker BA, Schwab RB, Fanta PT, Boles SG, Daniels GA, Bazhenova LA, Subramanian R, Coutinho AC, Ojeda-Fournier H, Datnow B, Webster NJ, Lippman SM, Kurzrock R. Molecular tumor board: the University of California-San Diego Moores Cancer Center experience. *Oncologist*. 2014;19(6):631–6.
- 5 Erdmann J. All aboard: Will molecular tumor boards help cancer patients? *Nat Med*. 2015;21(7):655–6.

Correspondance:

PD Dr Kirsten D. Mertz
Institut für Pathologie
Kantonsspital Baselland
CH-4410 Liestal
kirsten.mertz[at]ksbl.ch
www.ksbl.ch