

Année 2023

Thèse N° 045

# Séquençage NGS en anatomie pathologique : Interêt – technique – recommandations en 2022

---

## THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 28/02/2023

PAR

**Mlle. Salama KABBAJ**

Née Le Août 1997 à Marrakech

**POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE**

## MOTS-CLÉS

NGS – Pathologie moléculaire – Biomarqueur – Médecine de précision

---

## JURY

**Mme H.RAIS**

Professeur d'Anatomie pathologique

**PRESIDENTE**

**Mr A.BELBACHIR**

Professeur agrégé d'Anatomie pathologique .

**RAPPORTEUR**

**Mme R.BELBARAKA**

Professeur d'Oncologie médicale

**Mr M.A.LAKMICH**

Professeur d'Urologie

**Mr A.FAKHRI**

Professeur d'Histologie-embryologie- cytogénétique

**JUGES**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدِيَ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ ﴾

(سورة الأعراف الآية: 43)

## **Serment d'Hippocrate**

*Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.*

*Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*

*Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*

*Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*

*Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*

*Les médecins seront mes frères.*

*Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale, ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*

*Je maintiendrai strictement le respect de la vie humaine dès sa conception.*

*Même sous la menace, je n'userai pas mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*

*Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

**Déclaration Genève, 1948**



# LISTE DES PROFESSEURS



**UNIVERSITE CADI AYYAD**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**  
**MARRAKECH**

Doyens Honoraires

: Pr. Badie Azzaman MEHADJI

: Pr. Abdelhaq ALAOUI YAZIDI

**ADMINISTRATION**

Doyen

: Pr. Mohammed BOUSKRAOUI

Vice doyen à la Recherche et la Coopération

: Pr. Mohamed AMINE

Vice doyen aux Affaires Pédagogiques

: Pr. Redouane EL FEZZAZI

doyen chargé de la pharmacie

: Pr. Said ZOUHAIR

Secrétaire Générale

: Mr. Azzeddine EL HOUDAIGUI

**Professeurs de l'enseignement supérieur**

Nom et Prénom	Spécialité	Nom et Prénom	Spécialité
ABKARI Imad	Traumato- orthopédie	FADILI Wafaa	Néphrologie
ABOU EL HASSAN Taoufik	Anesthésie- réanimation	FAKHIR Bouchra	Gynécologie- obstétrique
ABOUCHADI Abdeljalil	Stomatologie et chir maxillofaciale	FAKHRI Anass	Histologie- embryologie cytogénétique
ABOULFALAH Abderrahim	Gynécologie- obstétrique	FOURAJI Karima	Chirurgie pédiatrique
ABOUSSAIR Nisrine	Génétique	GHANNANE Houssine	Neurochirurgie
ADALI Imane	Psychiatrie	GHOUNDALE Omar	Urologie
ADMOU Brahim	Immunologie	HACHIMI Abdelhamid	Réanimation médicale
AGHOUTANE El Mouhtadi	Chirurgie pédiatrique	HAJJI Ibtissam	Ophtalmologie
AISSAOUI Younes	Anesthésie - réanimation	HAROU Karam	Gynécologie- obstétrique
AIT AMEUR Mustapha	Hématologie Biologique	HOCAR Ouafa	Dermatologie
AIT BENALI Said	Neurochirurgie	JALAL Hicham	Radiologie
AIT BENKADDOUR Yassir	Gynécologie- obstétrique	KADDOURI Said	Médecine interne
AIT-SAB Imane	Pédiatrie	KAMILI El Ouafi El Aouni	Chirurgie pédiatrique

ALJ Soumaya	Radiologie	KHALLOUKI Mohammed	Anesthésie- réanimation
AMAL Said	Dermatologie	KHATOURI Ali	Cardiologie
AMINE Mohamed	Epidémiologie- clinique	KHOUCANI Mouna	Radiothérapie
AMMAR Haddou	Oto-rhino-laryngologie	KISSANI Najib	Neurologie
AMRO Lamyae	Pneumo- phtisiologie	KRATI Khadija	Gastro- entérologie
ANIBA Khalid	Neurochirurgie	KRIET Mohamed	Ophtalmologie
ARSALANE Lamiae	Microbiologie -Virologie	LAGHMARI Mehdi	Neurochirurgie
ASMOUKI Hamid	Gynécologie- obstétrique	LAKMICH MohamedAmine	Urologie
ATMANE El Mehdi	Radiologie	LAKOUICHMI Mohammed	Stomatologie et Chirurgie maxillo faciale
BAIZRI Hicham	Endocrinologie et maladiesmétaboliques	LAOUAD Inass	Néphrologie
BASRAOUI Dounia	Radiologie	LOUHAB Nisrine	Neurologie
BASSIR Ahlam	Gynécologie- obstétrique	LOUZI Abdelouahed	Chirurgie - générale
BELBARAKA Rhizlane	Oncologie médicale	MADHAR Si Mohamed	Traumato- orthopédie
BELKHOU Ahlam	Rhumatologie	MANOUDI Fatiha	Psychiatrie

BEN DRISS Laila	Cardiologie	MANSOURI Nadia	Stomatologie et chiru maxillo faciale
BENALI Abdeslam	Psychiatrie	MAOULAININE Fadl mrabih rabou	Pédiatrie (Neonatalogie)
BENCHAMKHA Yassine	Chirurgie réparatrice etplastique	MARGAD Omar	Traumatologie -orthopédie
BENELKHAIAT BENOMAR Ridouan	Chirurgie – générale	MATRANE Aboubakr	Médecine nucléaire
BENHIMA Mohamed Amine	Traumatologie - orthopédie	MLIHA TOUATI Mohammed	Oto-Rhino - Laryngologie
BENJELLOUN HARZIMI Amine	Pneumo- phtisiologie	MOUAFFAK Youssef	Anesthésie - réanimation
BENJILALI Laila	Médecine interne	MOUDOUNI Said Mohammed	Urologie
BOUCHENTOUF Rachid	Pneumo- phtisiologie	MOUFID Kamal	Urologie
BOUKHANNI Lahcen	Gynécologie- obstétrique	MOUTAJ Redouane	Parasitologie
BOUKHIRA Abderrahman	Biochimie – chimie	MOUTAOUAKIL Abdeljalil	Ophtalmologie
BOUMZEBRA Drissi	Chirurgie Cardio-Vasculaire	MSOUGGAR Yassine	Chirurgie thoracique
BOURRAHOUEAT Aicha	Pédiatrie	NAJEB Youssef	Traumato- orthopédie
BOURROUS Monir	Pédiatrie	NARJIS Youssef	Chirurgie générale
BOUSKRAOUI Mohammed	Pédiatrie	NEJMI Hicham	Anesthésie- réanimation
BSISS Mohamed Aziz	Biophysique	NIAMANE Radouane	Rhumatologie

CHAFIK Rachid	Traumato- orthopédie	OUALI IDRISSE Mariem	Radiologie
CHAKOUR Mohamed	Hématologie Biologique	OUBAHA Sofia	Physiologie
CHELLAK Saliha	Biochimie- chimie	OULAD SAIAD Mohamed	Chirurgie pédiatrique
CHERIF IDRISSE EL GANOUNI Najat	Radiologie	QACIF Hassan	Médecine interne
CHOULLI Mohamed Khaled	Neuro pharmacologie	QAMOUSS Youssef	Anésthésie- réanimation
DAHAMI Zakaria	Urologie	RABBANI Khalid	Chirurgie générale
DAROUASSI Youssef	Oto-Rhino - Laryngologie	RADA Nouredine	Pédiatrie
DRAISS Ghizlane	Pédiatrie	RAIS Hanane	Anatomie pathologique
EL ADIB Ahmed Rhassane	Anesthésie- réanimation	RAJI Abdelaziz	Oto-rhino-laryngologie
EL AMRANI Moulay Driss	Anatomie	ROCHDI Youssef	Oto-rhino- laryngologie
EL ANSARI Nawal	Endocrinologie et maladies métaboliques	SAMKAOUI Mohamed Abdenasser	Anesthésie- réanimation
EL BARNI Rachid	Chirurgie- générale	SAMLANI Zouhour	Gastro- entérologie
EL BOUCHTI Imane	Rhumatologie	SARF Ismail	Urologie
EL BOUIHI Mohamed	Stomatologie et chir maxillofaciale	SORAA Nabila	Microbiologie – Virologie
EL FEZZAZI Redouane	Chirurgie pédiatrique	SOUMMANI Abderraouf	Gynécologie- obstétrique
EL HAOURY Hanane	Traumato- orthopédie	TASSI Noura	Maladies infectieuses
EL HATTAOUI Mustapha	Cardiologie	TAZI Mohamed Ilias	Hématologie- clinique
EL HOUDZI Jamila	Pédiatrie	YOUNOUS Said	Anesthésie- réanimation
EL IDRISSE SLITINE Nadia	Pédiatrie	ZAHLANE Kawtar	Microbiologie - virologie
EL KARIMI Saloua	Cardiologie	ZAHLANE Mouna	Médecine interne
EL KHADER Ahmed	Chirurgie générale	ZAOUI Sanaa	Pharmacologie
EL KHAYARI Mina	Réanimation médicale	ZEMRAOUI Nadir	Néphrologie
EL MGHARI TABIB Ghizlane	Endocrinologie et maladiesmétaboliques	ZIADI Amra	Anesthésie – réanimation
EL OMRANI Abdelhamid	Radiothérapie	ZOUHAIR Said	Microbiologie
ELFIKRI Abdelghani	Radiologie	ZYANI Mohammed	Médecine interne
ESSAADOUNI Lamiaa	Médecine interne		

### Professeurs Agrégés

Nom et Prénom	Spécialité	Nom et Prénom	Spécialité
ABDOU Abdessamad	Chiru Cardio vasculaire	SEBBANI Majda	Médecine Communautaire (médecine préventive, santé publique et hygiène)
ABIR Badreddine	Stomatologie et Chirurgie maxillo faciale	HAZMIRI Fatima Ezzahra	Histologie- embyologie cytogénétique
ADARMOUCH Latifa	Médecine Communautaire (médecine préventive,santé publique et hygiène)	JANAH Hicham	Pneumo- phtisiologie
AIT BATAHAR Salma	Pneumo- phtisiologie	LAFFINTI Mahmoud Amine	Psychiatrie
ALAOUI Hassan	Anesthésie -Réanimation	LAHKIM Mohammed	Chirurgie générale
ALJALIL Abdelfattah	Oto- rhino- laryngologie	MESSAOUDI Redouane	Ophtalmologie
ARABI Hafid	Médecine physique et réadaptation fonctionnelle	MOUHSINE Abdelilah	Radiologie
ARSALANE Adil	Chirurgie Thoracique	NADER Youssef	Traumatologie - orthopédie
ASSERRAJI Mohammed	Néphrologie	NASSIM SABAH Taoufik	Chirurgie Réparatrice etPlastique
BELBACHIR Anass	Anatomie- pathologique	RHARRASSI Isam	Anatomie-patologique
BELHADJ Ayoub	Anesthésie -Réanimation	SALAMA Tarik	Chirurgie pédiatrique
BOUZERDA Abdelmajid	Cardiologie	SEDDIKI Rachid	Anesthésie - Réanimation
CHRAA Mohamed	Physiologie	SERGHINI Issam	Anesthésie - Réanimation
EL HAOUATI Rachid	Chirurgie Cardio-vasculaire	TOURABI Khalid	Chirurgie réparatrice etplastique
EL KAMOUNI Youssef	Microbiologie Virologie	ZARROUKI Youssef	Anesthésie - Réanimation
EL MEZOUARI El Moustafa	Parasitologie Mycologie	ZIDANE Moulay Abdelfettah	Chirurgie Thoracique
ESSADI Ismail	Oncologie Médicale	BELGHMAIDI Sarah	OPhtalmologie
GHAZI Mirieme	Rhumatologie	BENNAOUI Fatiha	Pédiatrie
Hammoune Nabil	Radiologie	FENNANE Hicham	Chirurgie Thoracique
ABDELFETTAH Youness	Rééducation etRéhabilitation Fonctionnelle	REBAHI Houssam	Anesthésie - Réanimation
ELBAZ Meriem	Pédiatrie	ZOUIZRA Zahira	Chirurgie Cardio- vasculaire
FDIL Naima	Chimie de CoordinationBio-organique		

### Professeurs Assistants

Nom et Prénom	Spécialité	Nom et Prénom	Spécialité
AABBASSI Bouchra	PédoPsychiatrie	ELJAMILI Mohammed	Cardiologie
ABALLA Najoua	Chirurgie pédiatrique	ELOUARDI Youssef	Anesthésie réanimation
ABOUDOURIB Maryem	Dermatologie	EL-QADIRY Raby	Pédiatrie
ABOULMAKARIM Siham	Biochimie	FASSI Fihri Mohamed jawad	Chirurgie générale
ACHKOUN Abdessalam	Anatomie	GEBRATI Lhoucine	Chimie physique
AHBALA Tariq	Chirurgie générale	HAJHOUI Farouk	Neurochirurgie
AIT ERRAMI Adil	Gastro-entérologie	HAJJI Fouad	Urologie
AKKA Rachid	Gastro - entérologie	HAMRI Asma	Chirurgie Générale
AMINE Abdellah	cardiologie	HAZIME Raja	Immunologie
ARROB Adil	Chirurgie réparatrice et plastique	IDALENE Malika	Maladies infectieuses
AZAMI Mohamed Amine	Anatomie pathologique	JALLAL Hamid	Cardiologie
AZIZ Zakaria	Stomatologie et chir maxillo faciale	KHALLIKANE Said	Anesthésie-réanimation

AZIZI Mounia	Néphrologie	LACHHAB Zineb	Pharmacognosie
BAALLAL Hassan	Neurochirurgie	LAHLIMI Fatima Ezzahra	Hématologie clinique
BABA Hicham	Chirurgie générale	LAHMINE Widad	Pédiatrie
BELARBI Marouane	Néphrologie	LAMRANI HANCI Asmae	Microbiologie-virologie
BELFQUIH Hatim	Neurochirurgie	LOQMAN Souad	Microbiologie et toxicologie environnementale
BELLASRI Salah	Radiologie	MAOUJOUR Omar	Néphrologie
BENAMEUR Yassir	Médecine nucléaire	MEFTAH Azzelarab	Endocrinologie et maladies métaboliques
BENANTAR Lamia	Neurochirurgie	MILOUDI Mohcine	Microbiologie - Virologie
BENCHAFAI Ilias	Oto- rhino- laryngologie	MOUGUI Ahmed	Rhumatologie
BENYASS Youssef	Traumatologie- orthopédie	MOULINE Souhail	Microbiologie-virologie
BENZALIM Meriam	Radiologie	NASSIH Houda	Pédiatrie
BOUHAMIDI Ahmed	Dermatologie	OUEIRAGLI NABIH Fadoua	Psychiatrie
BOUTAKIOUTE Badr	Radiologie	OUMERZOUK Jawad	Neurologie
CHAHBI Zakaria	Maladies infectieuses	RAGGABI Amine	Neurologie
CHEGGOUR Mouna	Biochimie	RAISSI Abderrahim	Hématologie clinique
CHETOUI Abdelkhalek	Cardiologie	RHEZALI Manal	Anesthésie-réanimation
CHETTATI Mariam	Néphrologie	ROUKHSI Redouane	Radiologie
DAMI Abdallah	Médecine Légale	SAHRAOUI Houssam Eddine	Anesthésie-réanimation
DARFAOUI Mouna	Radiothérapie	SALLAHI Hicham	Traumatologie-orthopédie

DOUIREK Fouzia	Anesthésie- réanimation	SAYAGH Sanae	Hématologie
DOULHOUSNE Hassan	Radiologie	SBAAI Mohammed	Parasitologie-mycologie
EL- AKHIRI Mohammed	Oto- rhino- laryngologie	SBAI Asma	Informatique
EL AMIRI My Ahmed	Chimie de Coordinationbio- organique	SIRBOU Rachid	Médecine d'urgence et decatastrophe
EL FADLI Mohammed	Oncologie médicale	SLIOUI Badr	Radiologie
EL FAKIRI Karima	Pédiatrie	WARDA Karima	Microbiologie
EL GAMRANI Younes	Gastro-entérologie	YAHYAOUI Hicham	Hématologie
EL HAKKOUNI Awatif	Parasitologie mycologie	YANISSE Siham	Pharmacie galénique
EL JADI Hamza	Endocrinologie et maladies métaboliques	ZBITOU Mohamed Anas	Cardiologie
EL KHASSOUI Amine	Chirurgie pédiatrique	ZIRAOUI Oualid	Chimie thérapeutique
ELATIQUI Oumkeltoum	Chirurgie réparatrice et plastique	ZOUIA Btissam	Radiologie

**LISTE ARRÊTÉE LE 26/09/2022**





# DEDICACES





*Je dédie cette Thèse...*



*Tout d'abord à Allah,*

اللهم لك الحمد حمداً كثيراً طيباً مباركاً فيه حمد خلقك ورضى نفسك ووزنة  
عرشك ومداد كلماتك اللهم لك الحمد ولك الشكر حتى ترضى ولك الحمد ولك  
الشكر عند الرضى ولك الحمد ولك الشكر دائماً وأبداً على نعمتك

## *À la mémoire de mon père Alhaj ABDELJALIL KABBADJ*

*Je dédie ce travail de thèse à mon père qui nous a quitté il y a quatre mois, j'aurais tellement aimé que tu sois là, que je puisse voir cette fierté dans tes yeux, comme je l'ai toujours vu au moindre succès.*

*Je n'ai jamais imaginé que je passerai ce jour sans toi, mais je suis sûre que tu m'assistes de là haut, et j'espère que tu es fier en regardant le résultat de ton dévouement pour ta famille, et sache que je te serai reconnaissante à vie pour ton éducation et ton énorme soutien au cours de toutes les étapes de ma vie. Tu étais l'épaule sur laquelle je pouvais me reposer et l'oreille à laquelle je pouvais me confier, tu as tout fait pour moi et tu m'as toujours donné l'amour et le courage dont j'avais besoin, tu m'as appris le sens de responsabilité, et tu m'as surtout toujours dit que je n'ai rien à craindre car Dieu est là pour moi. Comblée est le mot, quand je repense à l'amour que tu me portais, ce qui m'a permis de devenir ce que je suis aujourd'hui et j'en suis fière.*

*Tu as toujours été mon idole, et les mots ne suffiront jamais pour décrire le grand homme que tu étais, tu étais mon ami avant d'être mon père, notre relation était assez spéciale, au point que pour moi, tu es toujours vivant, je ressens ton aura partout où je vais et je sais que tu es fière de moi aujourd'hui, le jour où je réalise NOTRE rêve.*

*Et sache que je suivrai dans mon travail les principes que tu suivais, et que tu m'as toujours appris, que j'aiderai toujours l'impuissant avant le puissant et que je serai là pour toute personne qui aurait besoin de moi, toute personne que je connais et que je ne connais pas, que je serai correcte dans mon travail devant Dieu pour vivre avec une conscience tranquille comme celle que tu avais pendant 44 ans de service.*

*Je suis très fière et honorée de porter la moitié de ce précieux patrimoine génétique venant d'un si grand homme.*

*Je sais, tout le monde croit avoir le meilleur père, mais vous vous trompez, le mien était le MEILLEUR.*

*اللهم ان أبي قد أحسن إلي منذ يوم ولادتي حتى يوم فراقه ،  
اللهم بحق هذا الإحسان رحمه واغفر له وأدخله الجنة برحمتك  
يا أرحم الراحمين*

**À ma mère SOUAD ESSARGHI :**

*A cette grande femme, qui a sacrifié toute sa vie pour ses enfants, à toi maman, tu as toujours fais l'impossible pour moi, tu m'as encouragé et tu as toujours été cette lueur d'espoir au bout du tunnel pour moi.*

*Tu as guetté mes pas, et tu m'a couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Tu es un exemple à suivre, et je ne peux que t'admirer et espérer qu'un jour j'aurais ne serait-ce qu'un peu de ta force, ton courage, ta patience, ta bienveillance et surtout ton fameux sourire.*

*Aucune expression ne serait suffisante pour te remercier assez, pour ce que tu as fais pour moi, pour ton soutien pendant mes années d'études, ainsi que pour ton soutien durant la plus dure période de ma vie quand on a perdu ALHaj.*

*Aujourd'hui je réalise ce succès, grâce à Dieu et à toi, j'espère que tu seras fière de moi, et que tu retrouveras ALhaj en moi, ne serait-ce qu'on faisant un minimum du bien qu'il faisait de son vivant.*

*Tu es et tu resteras à jamais, le soleil qui illumine ma vie. Que Dieu te garde pour moi et pour toute la famille.*

*Je t'aime maman.*

**À mon frère Ilyas Kabbadj et ma belle soeur Sandra Christ :**

*Aucune dédicace ne serait suffisante pour décrire l'estime et le respect que j'ai pour vous. Ilyas, tu es tous simplement le meilleur frère qu'une fille aurait aimé avoir dans cette vie, tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dédie ce travail en reconnaissance à la grande affection que tu me témoignes et pour t'exprimer toute la gratitude et l'amour que je te porte, j'espère que ce modeste travail te rendra fier.*

*Sandra, tu es devenu un membre important de la famille, depuis ton arrivée dans notre vie, tu ne fais que nous apporter une grande joie, je remercie Dieu de t'avoir réuni Ilyas et toi, pour qu'on puisse rencontrer une si belle âme que toi, je n'oublierai jamais l'aide que tu m'as apporté quand on a perdu ALhaj, et j'en serai toujours reconnaissante, et j'espère que ce travail te rendra fière de moi.*

*À ma soeur Rania Kabbadj, mon beau frère Mahdi elbari, et les jouj EL YAZ :*

*Que dire à propos de ce joli cadeau que Dieu m'a offert.*

*Rania tu as été tout simplement ma meilleure amie et ma principale source de soutien durant toute ma vie, merci d'être là quand ça ne va pas. Merci de me prêter ton épaule quand j'en ai besoin. Merci d'apaiser mes pleurs peu importe la situation, tu as toujours les mots qu'il faut et tu sais reconnaître les moments où j'ai simplement besoin d'une oreille attentive pour m'écouter.*

*Merci de m'aimer telle que je suis, avec mes défauts et mes qualités et de me prouver à quel point tu tiens à moi de mille et une façons, tes façons à toi, rien qu'à toi.*

*Mahdi, tu es plus un frère pour moi qu'un beau frère, tant de merveilleux souvenirs avec toi durant toutes ces années, tant de fou-rires et de folies, merci d'être la personne que tu es, merci de rejoindre notre famille qui est devenu la tienne aussi, merci d'être là pour nous, j'espère que ce travail te rendra fier de moi.*

*Et surtout merci à vous de nous offrir le plus beau cadeau du monde, 'les jouj' Elyana et Yazan sont une source de bonheur pour moi depuis leur arrivée, et je ne cesserai jamais de les aimer.*

*À ma petite soeur Rabha Kabbadj :*

*Rabha, tu es le plus précieux bijou de la famille, je ne peux pas souhaiter avoir une meilleure petite soeur, parce que tu es la meilleure.*

*Je suis très fière de toi et de tout ce que tu as pu accomplir, merci pour ta présence qui a toujours été source infinie de bonheur pour nous, merci pour ton aide et ton soutien, merci d'être la plus joyeuse et tendre petite soeur du monde.*

*Je te dédie ce travail, et je te dédie toutes mes années d'effort, j'espère avoir été un bon exemple pour toi, tu apprends de mes erreurs et j'apprend des tiennes.*

*Je t'aime énormément.*

*À mes tantes Alhajja Khadija Essarghi et Nadia Essarghi*

*Merci pour tous les magnifiques moments que nous avons passé ensemble depuis ma naissance, pour votre soutien, vos conseils, et votre amour incomparable, j'ai reçu de votre part tellement d'encouragement et de soutien, et j'en serai toujours reconnaissante.*

*J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondé et je vous dédie ce travail. Je vous aime.*

### *À mon cher DR Rida*

*Ces quelques mots ne sauraient exprimer ce que tu représentes pour moi. Ton soutien, tes encouragements et ton profond attachement m'ont permis de réussir.*

*Tant d'épreuves passées ensemble durant toutes ces années, aussi bonnes que mauvaises, mais voilà que nos rêves commencent à se réaliser, que toutes nos espérances qui semblaient venir de l'au-delà commencent à voir un brin de lumière, un brin de lumière que tu as mis dans ma vie lors de notre rencontre. Je ne trouverai jamais assez de mots pour traduire tout ce que je ressens envers une personne aussi exceptionnelle que toi. Nous avons parcouru ce chemin ensemble, et tu as été un merveilleux partenaire et accompagnant, et aucune expression ne serait suffisante pour te remercier d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragé et de m'avoir donné tellement d'amour et d'affection.*

*Je te dédie ce travail en espérant avoir répondu aux espoirs que tu as fondé et en témoignage de gratitude et de reconnaissance envers toi. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et qu'Allah t'accorde beaucoup de bonheur et de réussite dans ta vie.*

### *À ma meilleure amie Nourelhouda :*

*Ton aide, ta générosité d'esprit, ton soutien ont été pour moi une source de courage et de confiance. Merci de m'aider à avancer, de m'écouter me plaindre souvent. Merci d'être à mes côtés et d'être la meilleure amie dont tout le monde rêve.*

*A tous nos moments de joies et de tristesse, à tout ce qu'on a enduré ces années et à tout ce dont on a rêvé, je te dédie ce travail et j'espère que tu seras fière de moi.*

### *À ma très chère Sara Elibourki :*

*Nous avons partagé énormément de souvenirs ensemble, et beaucoup plus d'aventures, tu es une personne très exceptionnelle pour moi.*

*Merci d'être toujours prête à te tenir droite à mes côtés, et je n'oublierai jamais non plus ta présence pour moi lorsque j'ai perdu mon père qui était le tien aussi, merci pour tous les moments de joie qu'on a vécu ensemble et sache que je serai toujours là pour toi dans le meilleur comme dans le pire.*

*Qu'Allah te donne santé et réussite, je t'aime ma soeur.*

*À mon meilleur ami Abdeljalil Ouizzou :*

*ça fait 8 ans qu'on se connaît, nous avons partagé beaucoup de souvenirs et tu as toujours su gérer mon caractère et tu m'as toujours accepté telle que je suis. Certes, la distance nous a séparé mais ta place est toujours grande dans ma vie, tu es mon deuxième frère et j'espère que ce modeste travail te rendra fier de moi autant que je le suis de toi.*

*À ma chère amie et binôme Hanaa Kassar*

*À toi ma binôme durant toutes ces années d'études, je te dédie ce travail et j'espère que tu seras fière de moi.*

*À Dr Selma Belmaachi, Dr Yassine, Dr Maryam El Ouazzani, Dr Meriem Hakour :*

*Je tiens à vous dédier ce travail en signe de reconnaissance pour l'aide que vous m'avez apporté, ce travail n'aurait pas vu le jour sans vous.*

*À mes chers amis : Omar Jalal, Najmddine Kharbouch, Hamza Irindou, Sara Kabir, Ibtissam Quiouch, Ouail chqormani, Taha Jalil, Marouane Khafif :*

*Les études médicales n'auraient pas été les mêmes sans votre existence, vous êtes devenus ma deuxième famille et je suis très reconnaissante de vous avoir dans ma vie, je vous dédie ce travail et j'espère que vous serez fière de moi.*

*Aux patients*

*À tous les patients qui m'ont marquée durant mes stages hospitaliers, et particulièrement ceux qui portent en silence le fardeau d'une pathologie chronique. Que Dieu vous vienne en aide et vous accorde patience et guérison. À tous mes futurs patients, je ferais de mon mieux pour vous soigner et soulager vos souffrances.*

*À moi même :*

*Merci d'avoir tenu le coup, merci d'avoir toujours cru en mes capacités et d'avoir réaliser ce rêve qui n'est pas juste le mien, mais celui de tes parents aussi. Restes fidèle à tes ambitions, aimante et généreuse envers les gens qui comptent vraiment, et quand ça ira mal, rappelle-toi du chemin parcouru jusque-là.*

*Tu as été à la hauteur.*

*À tous ceux que j'aime et dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur, veuillez trouver dans ce travail mes profonds respects et attachements.*





# REMERCIEMENTS



A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DE THESE,  
PROFESSEUR HANANE RAIS,  
CHEF DE SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE A L'HOPITAL  
MOHAMMED 6 DE MARRAKECH

*Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider  
notre jury.*

*Votre gentillesse, votre bienveillance, et votre dévouement pour l'enseignement médical,  
sont reconnus par tout le monde.*

*Vous m'avez accueilli avec gentillesse et modestie, et vous avez accepté de présider notre  
travail malgré vos obligations professionnelles. Que ces lignes puissent témoigner de mon  
grand respect, ma très haute considération et ma profonde reconnaissance envers la  
grande femme que vous êtes.*

A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE,  
PROFESSEUR BELBACHIR ANASS,  
CHEF DE SERVICE DU CENTRE DE MEDECINE REGENERATIVE A  
L'HOPITAL MOHAMMED 6 DE MARRAKECH

*Permettez-moi de vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordé, en  
acceptant de me donner à traiter un sujet aussi original. Vous m'avez encadré tout au  
long de cette thèse et vous m'avez fait partagé vos brillantes intuitions. Je tiens à vous  
remercier pour votre gentillesse, votre disponibilité permanente, et pour les nombreux  
encouragements que vous m'avez prodigué. C'est à vos côtés que j'ai compris ce que  
rigueur et précision voulaient dire.*

*Travailler sous votre direction était un réel honneur pour moi et j'espère avoir été à la  
hauteur de vos attentes, et vous rendre fier. Veuillez trouver ici le témoignage, de mes  
plus profonds sentiments, de ma gratitude et ma reconnaissance les plus sincères.*

A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THÈSE,  
PROFESSEUR MOHAMED AMINE LAKMICHI,  
PROFESSEUR D'UROLOGIE À L'HÔPITAL MOHAMMED 6 DE  
MARRAKECH

*C'est un grand plaisir de vous voir présent ce jour, très important pour moi. Permettez-moi de vous remercier tout d'abord pour tout ce que vous avez fait pour feu mon père. Votre spontanéité et votre gentillesse me rappellent que la médecine est avant tout une grande famille où l'amour et la bienveillance réciproques doivent résider.*

*Votre soutien moral et vos encouragements ont été pour moi d'une grande importance dans le développement de ce travail.*

*Je vous remercie infiniment d'avoir accepté de juger cette thèse, et que ce travail soit un témoignage de ma profonde reconnaissance et mon grand respect envers votre personne.*

A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THÈSE,  
PROFESSEUR RHIZLANE BELBARAKA,  
CHEF DE SERVICE DE L'ONCOLOGIE MÉDICALE À L'HÔPITAL  
MOHAMMED 6 DE MARRAKECH

*Nous vous remercions de nous avoir honoré par votre présence. Vous avez accepté aimablement de juger cette thèse, malgré votre charge de travail. Cet honneur nous touche infiniment et nous tenons à vous exprimer notre profonde reconnaissance.*

*Votre modestie et votre courtoisie demeurent pour nous des qualités exemplaires. Veuillez accepter, dans ce travail l'assurance de notre estime et notre profond respect.*

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE,  
PROFESSEUR ANAS FAKHRI,  
PROFESSEUR D'HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGÉNÉTIQUE À  
L'HÔPITAL MOHAMMED 6 DE MARRAKECH

*Aucune expression ne saurait témoigner de ma gratitude et de la profonde estime que je porte à votre personne. Vous avez toujours été à l'écoute de vos étudiants, et vous étiez toujours prêt à nous aider de mille et une façons.*

*Nous sommes très reconnaissants professeur, pour votre générosité dans votre enseignement et pour votre bienveillance et gentillesse d'avoir accepté de siéger parmi le jury de ma soutenance de thèse.*

*Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre gratitude et notre haute considération.*



# LISTE DES ABRÉVIATIONS



## Liste des abréviations :

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNtc	: ADN tumoral circulant
ARN	: Acide ribonucléique
ABL	: Abelson kinase
ALK	: anaplastic lymphoma kinase
ACS–CoC	: American college of surgeons commision on cancer
ASR	: Analyte specific reagent
BI	: biosafety level
BRCA	: breast cancer gene
bp	: paire de base
BCR	: Breakpoint Cluster Region
BGI	: beijing genomics institue
CHP	: centre hospitalier périphérique
CIN	: instabilité chromosomique
c–Myc	: c–myelocytomatosis
CDKN2A	: cyclin–dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	: cyclin–dependent kinase inhibitor 2B
CCD	: consensus coding sequence
CPNPC	: cancer pulmonaire non à petite cellule
CAP	: college of american pathologists
CNF	: cytotoxic necrotizing factor
Dpcr	: Digital polymeras chain reaction

dNTP : Deoxynucleoside triphosphate

ESMO : European society for medical oncology

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid

ESCAT : ESMO scale for clinical actionability of molecular targets

FISH : Fluorescence in situ hybridization

FDA : Food and Drug Administration

FFPR : Formalin-Fixe Paraffin-Embedded

Gb Data : Gigabase data

HDM2 : Human murine double minute 2

H&E : Hematoxylin and eosin

HUGO : Human genome Organisation

HGVS : Human genome variation society

HIRA : Histone cell cycle regulator

IHC : Immunohistochimie

Ig H : Immunoglobulin Heavy locus

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene

KOSMOS : Korea Precision Medecine

LOH : Loss of heterozygosity

LIMS : Laboratory information management system

LDT : Laboratory developed test

MMR : Mismatch Repair

MIN : instabilité microsatellitaire

MDR : multidrug resistance

MPR : Major pathological response

Min ION : A nanopore-based sequencing platform

MTB : Molecular tumour board

NIN : instabilité nucléotidique

N myc : Proto-oncogene protein

NCT : National center for tumor diseases

ONT : Oxford nanopore sequencing technology

Pac Bio : pacific biosciences

PCR : polymerase chain reaction

PGM : Personal genome machine

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire

SMRT : Single molecule real time

TAT : Turnaround time

VPH : Viomycin phosphotransferase

VAF : Variant allele frequencies

WGS : whole genome sequencing

WES : whole exome sequencing

WTS : whole transcriptome sequencing

ZMW : Zero-mode waveguides





# Plan



<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 1 -</b>
I.    NGS – Pathologie moléculaire – Biomarqueurs – Médecine de précision .....	- 2 -
II.   Intérêt / Objectif du travail.....	- 2 -
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>- 3 -</b>
I.    Contenu général du questionnaire (cf. annexe 1) : .....	- 4 -
II.   Format et analyse statistique : .....	- 5 -
III.  Ethique : .....	- 5 -
<b>RESULTATS</b> .....	<b>- 6 -</b>
I.    RESULTATS DU QUESTIONNAIRE : .....	- 7 -
1.  DONNEES GLOBALES DE L'ETUDE : .....	- 7 -
2.  ANALYSE DESCRIPTIVE : .....	- 7 -
3.  Principaux enseignements tirés du questionnaire : .....	- 14 -
II.   TEST-RUN : .....	- 15 -
1.  Préparation de la librairie : .....	- 15 -
2.  Préparation de la matrice de séquençage : .....	- 18 -
3.  Le séquençage : .....	- 22 -
4.  Les données du séquençage : .....	- 24 -
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>- 26 -</b>
I.    PATHOLOGIE MOLECULAIRE EN CANCEROLOGIE : .....	- 27 -
1.  Définition : .....	- 27 -
2.  Définition des biomarqueurs : .....	- 27 -
3.  Principales altérations moléculaire en cancérologie : .....	- 28 -
4.  Techniques de détection en pathologie moléculaire : .....	- 35 -
II.   Méthodes de détection des biomarqueurs : .....	- 40 -
1.  Evolution des méthodes de détection des biomarqueurs : .....	- 40 -
2.  Séquençage de haut débit (NGS ) : .....	- 46 -
3.  Stratégie (ou workflow) de mise en évidence des biomarqueurs en médecine de précision en 2022 : .....	- 56 -
III.  Principales recommandations du séquençage NGS en 2022 .....	- 60 -
1.  Recommandations techniques : .....	- 60 -
2.  Recommandations cliniques ESMO .....	- 79 -
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>- 86 -</b>
<b>RESUMES</b> .....	<b>- 89 -</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>- 96 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>- 106 -</b>



# INTRODUCTION



## **I. NGS – Pathologie moléculaire – Biomarqueurs – Médecine de précision**

L'anatomie pathologique est en perpétuelle mutation. De nouvelles entités sont, annuellement décrites et les classifications des tumeurs mises à jour. Ceci est possible par la meilleure compréhension de la cancérogénèse et le développement de nouveaux outils diagnostiques. Les nouveaux facteurs pronostics sont mis en évidence de même que le développement de nouvelles thérapeutiques ciblées. Ces traitements sont, souvent, mieux tolérés et beaucoup plus efficaces que les traitements conventionnels. Toutefois, une mise en évidence de la présence de la cible thérapeutique, au niveau de la tumeur, est nécessaire du fait du coût important de cette thérapeutique. Cette détection se fait par le pathologiste soit par immunohistochimie et, de plus en plus, par biologie moléculaire. Cette nouvelle stratégie thérapeutique constitue la base de la médecine dite « de précision ». L'essor de cette dernière impose de nous développer et approfondir nos connaissances dans la pathologie moléculaire, dernière sous-spécialité de notre passionnante discipline médicale.

## **II. Intérêt / Objectif du travail**

A travers ce travail, nous espérons intéresser les jeunes pathologistes à la révolution de la pathologie moléculaire en :

- Clarifiant autant que possible les termes et concepts
- Mettant en exergue l'intérêt grandissant du séquençage dans la médecine de précision
- Relevant les principales recommandations en matière de séquençage NGS comme outils aux mains du pathologiste
- Soulignant l'intérêt de l'approche multidisciplinaire avec la réunion de concertation pluridisciplinaire dans la prise en charge des patients en oncologie



**MATERIELS ET METHODES**



Afin de rester en phase avec le développement de l'anatomie pathologie, notamment, dans le volet « pathologie moléculaire » ; le CHU Mohammed VI de Marrakech vient d'acquérir un séquenceur NGS Ion Torrent S5. Il est, actuellement, en phase d'installation avec réalisation de tests de validation.

Par ailleurs, et afin de sonder l'état actuel des connaissances des jeunes pathologistes (résidents principalement et pathologistes récemment diplômés), un questionnaire général a été élaboré.

### **I. Contenu général du questionnaire (cf. annexe 1) :**

Pour évaluer les perceptions et les connaissances d'un échantillon des jeunes pathologistes de la région de Marrakech–Safi concernant le séquençage de nouvelle génération, nous avons élaboré un questionnaire intitulé "Etat de connaissance des jeunes pathologistes en séquençage de nouvelle génération (NGS)" contenant 12 questions, dont certaines sont fermées (question à choix unique ou à choix multiple) et des questions ouvertes.

- Deux questions visaient à collecter les données personnelles des participants : Statut professionnel et structure d'exercice.
- Dix questions portaient sur les thèmes suivants :
  - ✓ L'avis des participants sur l'importance du séquençage génomique dans la pratique de l'anatomie pathologique au Maroc.
  - ✓ La formation en NGS
  - ✓ L'existence d'un séquenceur dans la région d'exercice.
  - ✓ Les domaines d'utilisation du NGS
  - ✓ Les connaissances sur l'exon.
  - ✓ Les types de prélèvements sur lesquels se réalise un séquençage.
  - ✓ La durée maximale de conservation du bloc à utiliser.
  - ✓ Les anomalies recherchées par séquençage.

- ✓ La nécessité d'une formation en NGS dans la pratique en anatomie pathologique.

## **II. Format et analyse statistique :**

L'élaboration du questionnaire a été réalisée avec l'application Google Forms et format papier. Ensuite les données collectées ont été saisies sur le logiciel Microsoft office Excel 2019 et analysées sur le logiciel Epi-Info 7.0

## **III. Ethique :**

Nous avons veillé au respect de la confidentialité et à l'anonymat des médecins durant l'étude. Le questionnaire était administré après avoir obtenu le consentement oral des participants et après leur avoir expliqué l'objectif de l'étude.



# RESULTATS





## I. RESULTATS DU QUESTIONNAIRE :

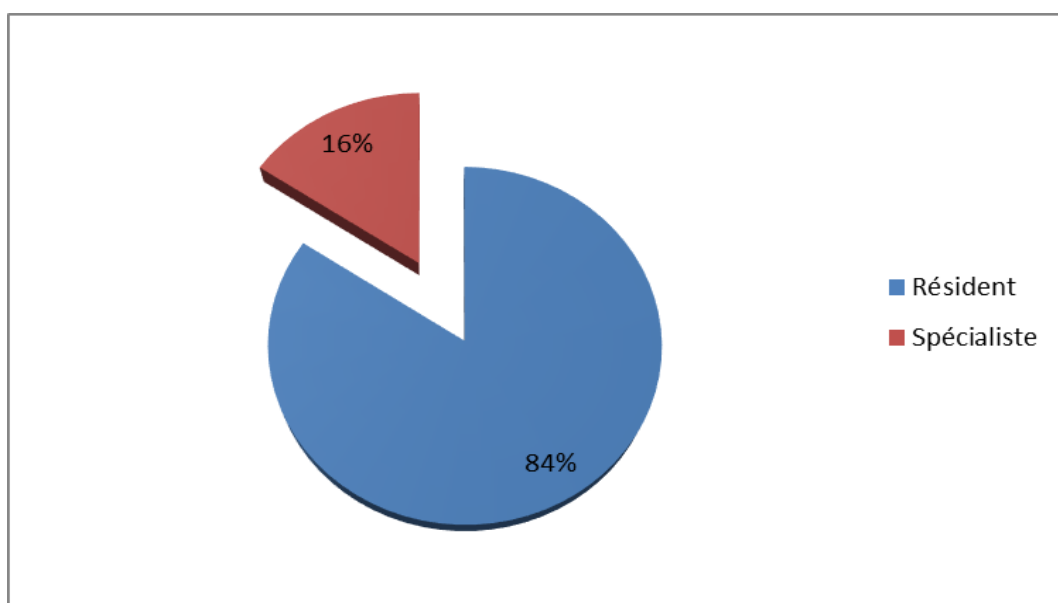
### 1. DONNEES GLOBALES DE L'ETUDE :

L'étude " Etat de connaissance des jeunes pathologistes en séquençage de nouvelle génération (NGS) " a été réalisée auprès d'un échantillon de médecins pathologistes exerçant, aussi bien aux hôpitaux universitaires et périphériques. Parmi les questionnaires diffusés en format papier et en ligne, nous avons obtenu 32 réponses complètes.

### 2. ANALYSE DESCRIPTIVE :

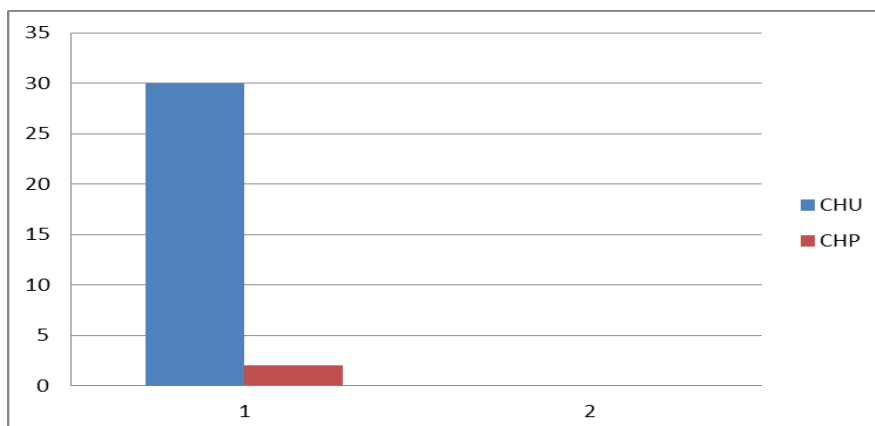
#### 2.1 Description des médecins pathologistes selon les caractères socio-démographiques et professionnels :

##### a) Statut professionnel :



**Figure1** : Répartition des médecins selon le statut professionnel

b) Structure d'exercice :

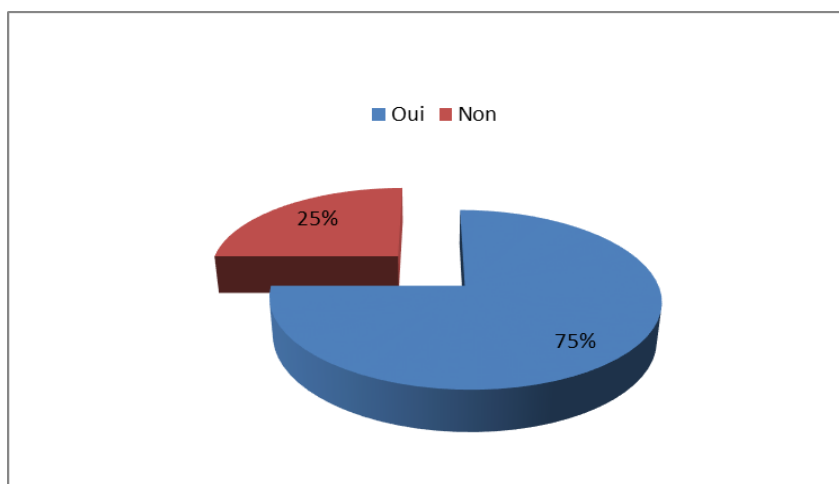


**Figure 2 :** Répartition des médecins selon la structure d'exercice

Nos médecins exerçaient dans différentes structures, avec une prédominance des médecins exerçant au CHU soit 94%.

2.2 Etat de connaissance des jeunes pathologistes en séquençage de nouvelle génération (NGS) :

a) L'importance du séquençage génomique dans la pratique de l'anatomie pathologique au Maroc :

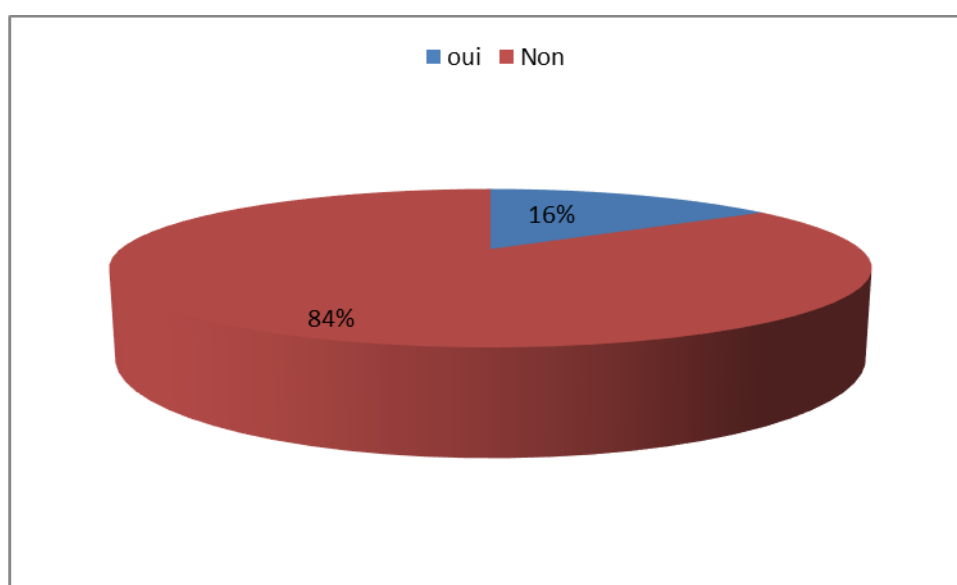


**Figure3 :** Répartition des médecins selon leur avis sur l'importance du NGS dans la pratique de l'anatomie pathologique

Notre étude avait montré que les trois quarts des jeunes pathologistes soit 75% trouvent qu'en 2023, le séquençage de nouvelle génération est devenu indispensable dans la pratique de l'anatomie pathologique, et le un quart restant soit 25% trouvent que nous pouvons s'en passer.

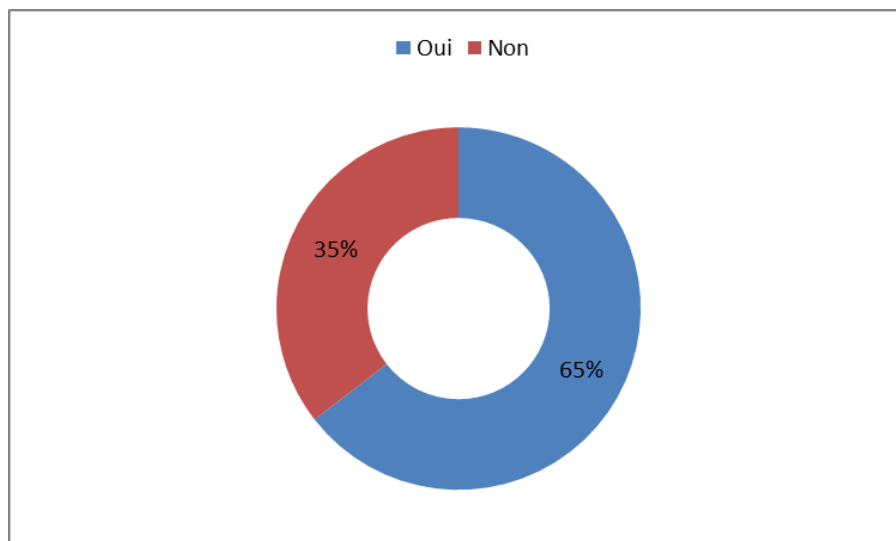
**b) La participation des médecins pathologistes dans une formation en séquençage de nouvelle génération :**

Vingt-sept médecins pathologistes de notre échantillon soit 84% n'ont pas participé à une formation en matière du séquençage de nouvelle génération, tandis que 5 médecins affirment avoir reçu une formation soit 16%.



**Figure 4 : Répartition des participants selon leur participation dans une formation en NGS**

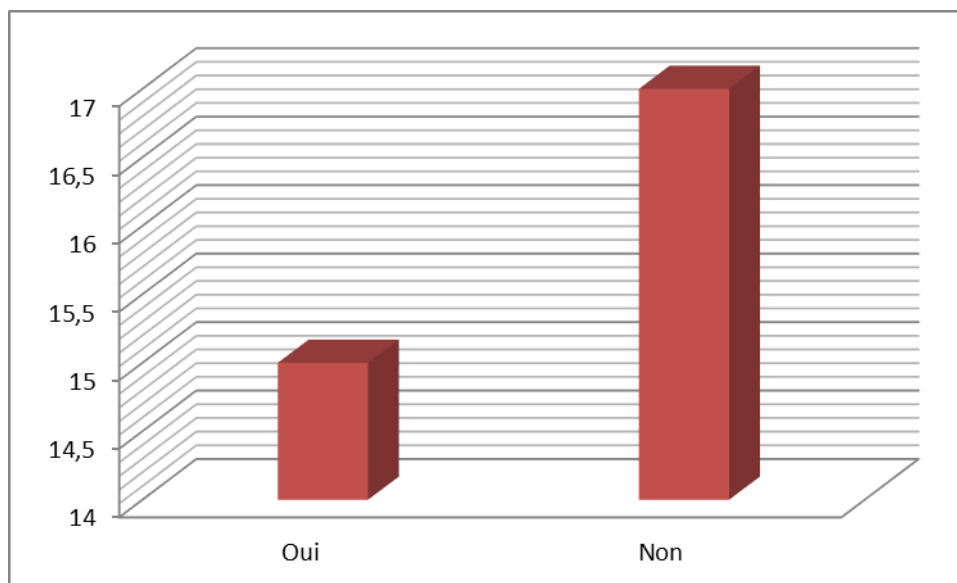
c) L'existence d'un séquenceur dans la région d'exercice :



**Figure 5 :** Répartition des médecins selon l'existence d'un séquenceur dans leur lieu de travail

Vingt médecins de notre échantillon soit 65 % disposaient d'un séquenceur dans leur structure d'exercice, tandis que 11 médecins soit 35% n'en avaient pas.

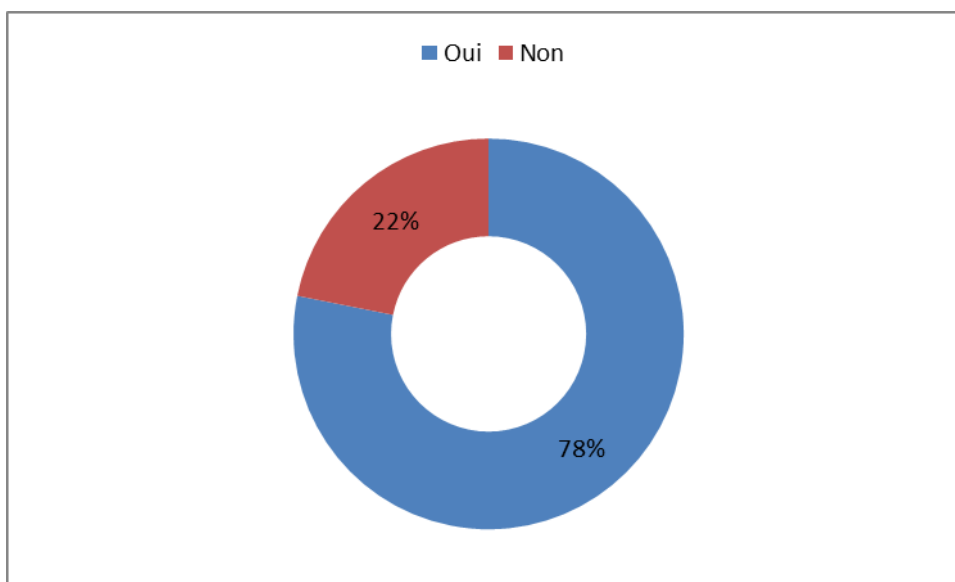
d) Les domaines d'utilisation du NGS :



**Figure 6 :** Répartition des participants selon leur connaissance sur les domaines d'utilisation du NGS

Notre étude avait montré que 17 pathologistes soit 53% n'avaient pas d'informations par rapport aux domaines d'utilisations du séquençage de nouvelle génération, alors que les 15 médecins restants soit 43% connaissaient certains des domaines du NGS.

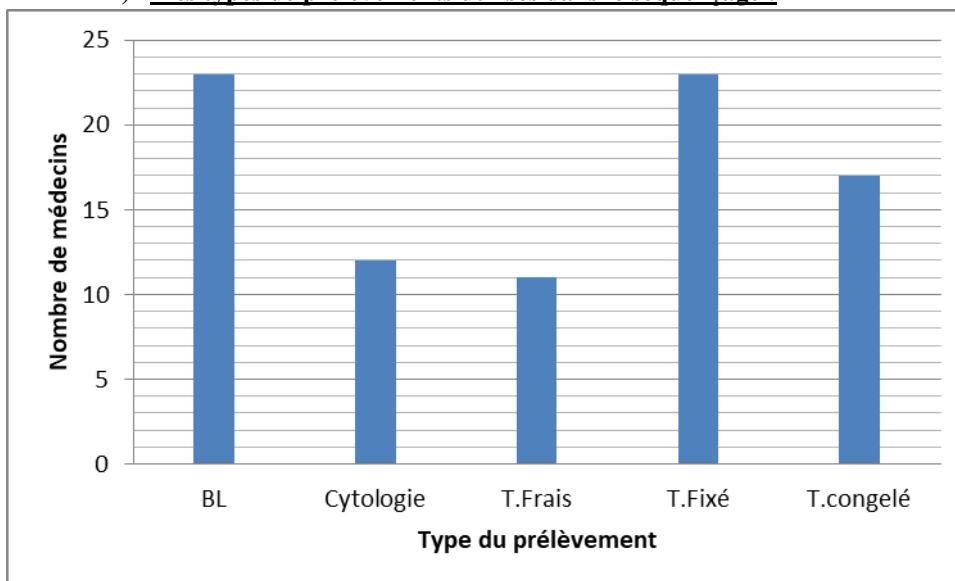
e) **Information sur la notion d'exon :**



**Figure 7 : Répartition selon la connaissance de la notion d'exon.**

La majorité soit 78% des pathologistes interrogés sont informés sur la notion d'exon, alors que 7 parmi eux, soit 22% n'ont pas de connaissance sur ce que le terme « exon » signifie.

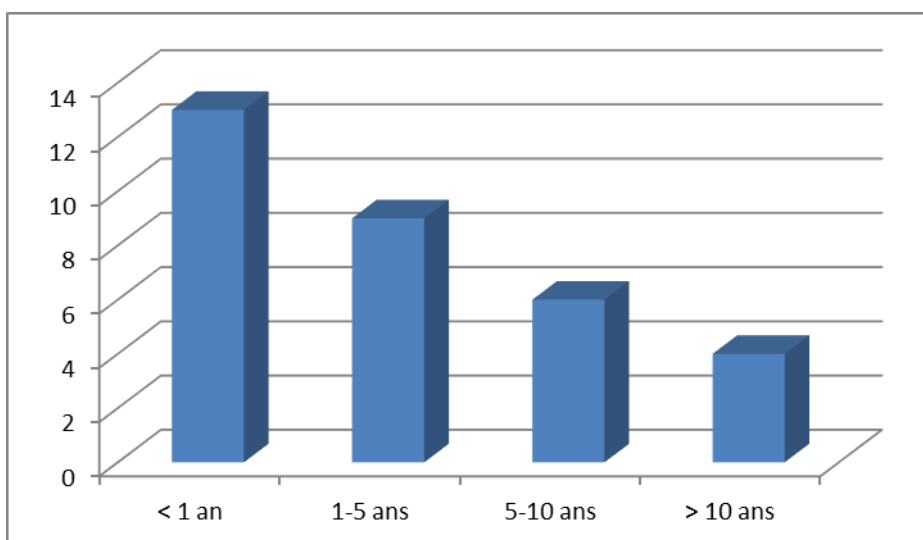
f) **Les types de prélèvements utilisés dans le séquençage :**



**Figure 8 : Répartition des médecins selon le type de prélèvement choisi**

La grande majorité des pathologistes répondant à notre questionnaire ont opté pour la biopsie liquide et le tissu fixé comme type de prélèvement. Le prélèvement sous forme de tissu congelé était la réponse obtenue de la part de 17 médecins. Tandis que 12 médecins se sont prononcés pour la cytologie et 11 autres pour le tissu frais.

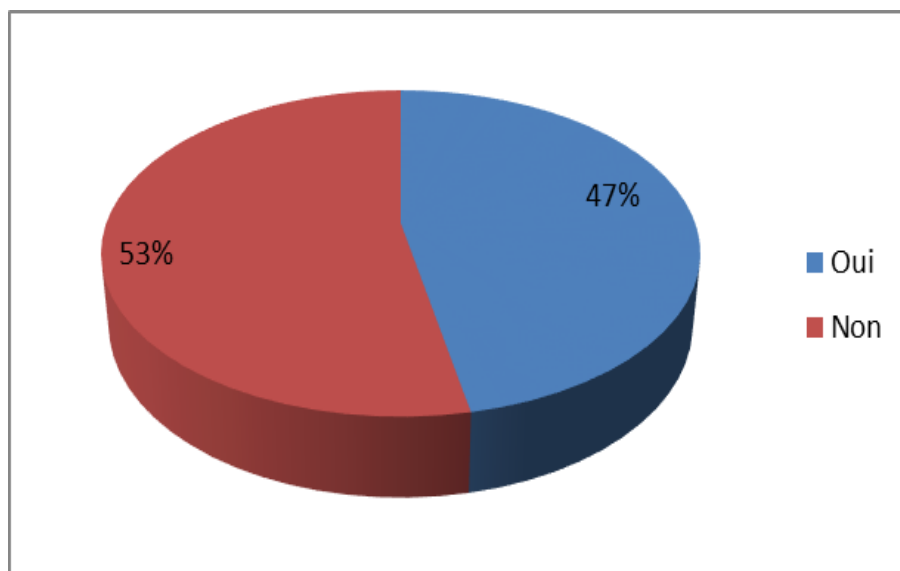
g) **La durée maximale de conservation des blocs utilisés :**



**Figure 9 : Répartition selon la durée maximale de conservation du bloc utilisé**

Une durée inférieure à un an est perçue comme la durée maximale de conservation des blocs utilisés dans 41% des cas. Vient en deuxième lieu, la durée allant de 1 à 5 années avec un pourcentage de 28%. Une durée de 5 à 10 ans et une durée supérieure à 10 ans sont perçues comme des durées maximales de conservation dans respectivement 19% et 12% des cas.

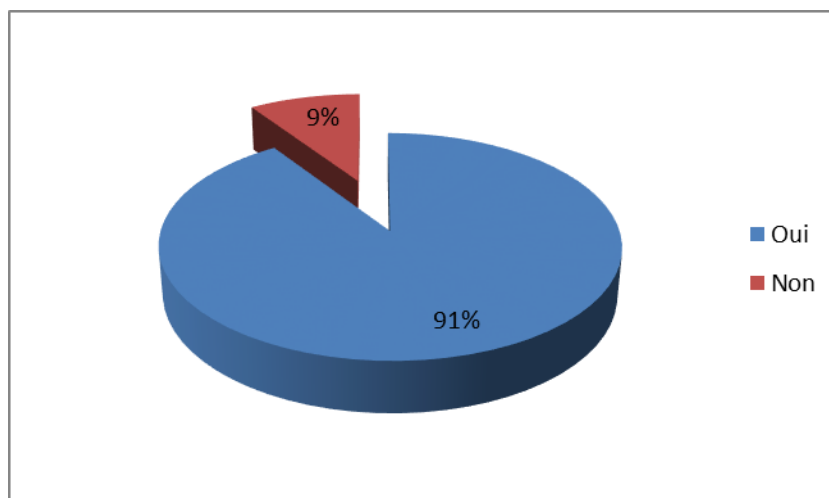
**h) Les anomalies à rechercher par séquençage :**



**Figure 10 :** Répartition selon les connaissances sur les anomalies à rechercher par NGS

Moins de la moitié des pathologistes interrogés soit 47% affirment avoir des idées sur les anomalies recherchées par NGS, tandis que 53% n'ont pas d'informations par rapport aux anomalies que nous pouvons détecter par le séquençage de nouvelle génération.

i) La nécessité d'une formation en NGS dans la pratique en anatomie pathologique :



**Figure 11** : Répartition selon la nécessité d'une formation en NGS

La grande majorité des participants à notre questionnaire soit 91% trouvaient qu'une formation en NGS est primordiale dans la pratique en anatomie pathologique, tandis que 9% des pathologistes interrogés pensaient que cette formation n'est pas nécessaire.

**3. Principaux enseignements tirés du questionnaire :**

Ce questionnaire a été, délibérément, voulu succinct afin d'encourager les jeunes pathologistes à y souscrire. Les enseignements importants que nous pouvons en conclure :

1. La prise de conscience des pathologistes de l'importance grandissante de la pathologie moléculaire et du séquençage NGS.
2. La présence de lacunes en terme de la maîtrise des bases de la biologie moléculaire / pathologie moléculaire.
3. La nécessaire intégration de la formation en pathologie moléculaire dans les cursus de résidanat.



## II. TEST-RUN :

Le centre de médecine régénérative dispose de cette dernière technologie de séquençage à haut débit Ion Torrent – Life Science qu'on va décrire étape par étape tel qu'utilisée dans le test-run. La technique se déroule en quatre étapes à savoir : la préparation de la librairie ; la préparation de la matrice de séquençage ; le séquençage et le traitement des données.



**Figure 12:** le séquenceur S5 Ion Torrent.

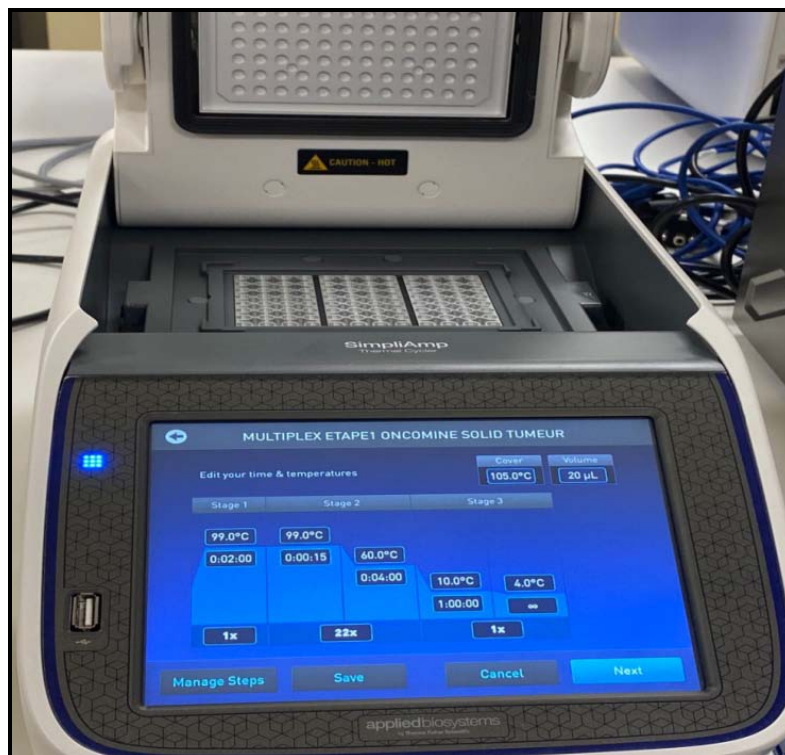
### 1. Préparation de la librairie :

Le principe d'une préparation de librairie pour le S5 Ion Torrent consiste à lier aux fragments d'ADN à séquençer, le couple d'adaptateurs A et P1. La taille médiane des fragments peut varier entre 100 et 400 bases (Figure 13).

Library sizes for Ion PGM™ System sequencing		
Target Read Length	Median Insert Size	Median Library Size
400 bases (400-base-read library)	~410 bp	~480 bp
300 bases (300-base-read library)	~320 bp	~390 bp
200 bases (200-base-read library)	~260 bp	~330 bp
100 bases (100-base-read library)	~130 bp	~200 bp

**Figure13 :** Tailles des librairies utilisées pour le système de séquençage Life Technologie.[1]

Le traitement d'un échantillon d'ADN génomique débute par une étape de fragmentation mécanique ou enzymatique qui présente l'avantage d'être considérablement plus rapide.



**Figure 14:** Cycle d'amplification des échantillons

En amplicon-seq, la méthode pour flanquer les adaptateurs est double, par ligation ou par fusion PCR. Par ailleurs, il est envisageable de traiter plusieurs échantillons en parallèle en utilisant des adaptateurs avec code barre (En standard chez Life technologies : Au nombre de 96 pour les échantillons ADN et 16 pour les échantillons ARN).



Figure 15 : les adaptateurs avec code-barres.

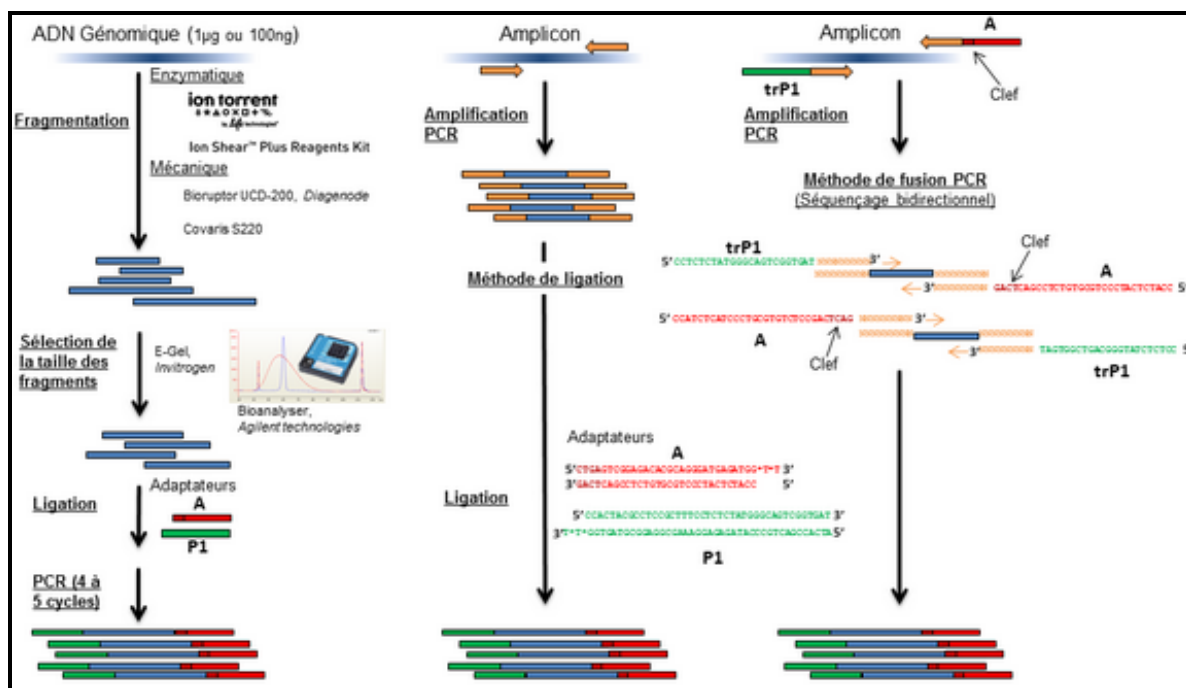
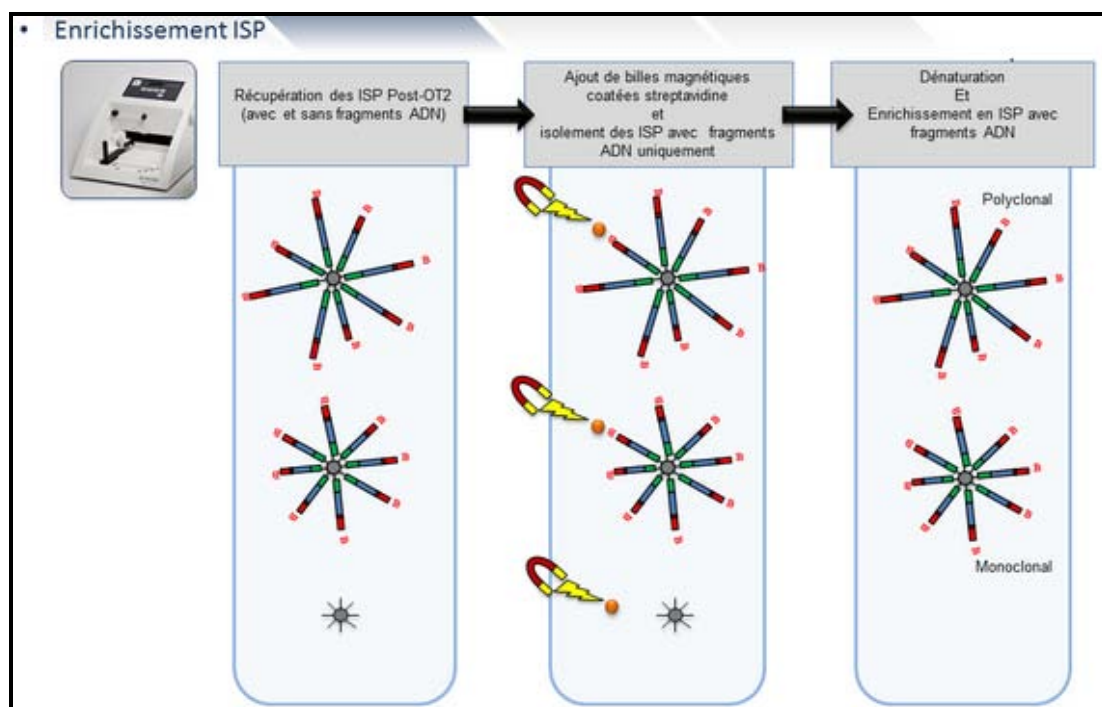


Figure 16 : schéma présentant le principe de préparation de la librairie.[1]



L'amorce ePCR-A couplée à la biotine permettra l'enrichissement ultérieure par un système de capture sur billes liées à la streptavidine (figure 18).



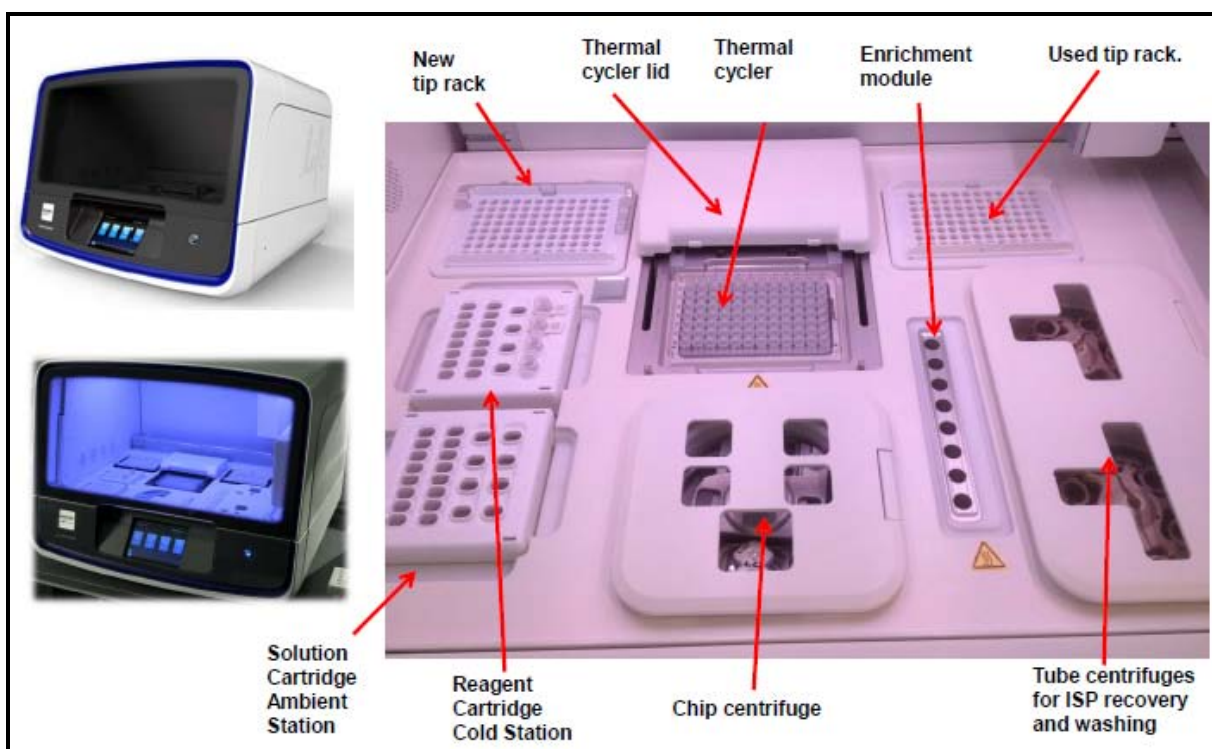
**Figure 18** : préparation de la matrice de séquençage.[1]

La préparation de la matrice de séquençage est automatisée, se déroule au niveau de Thermo Fisher Ion Chef System et consiste à simplifier le flux de travail pour le système GeneStudio S5 Series.

Au niveau de l'ion Chef System, les bibliothèques préparées précédemment et diluées sont ajoutées au tube d'échantillon de bibliothèque Ion ChefTM approprié (tubes à code-barres). Ces tubes d'échantillon sont stockés sur de la glace jusqu'à ce que l'instrument Ion ChefTM soit prêt.

L'étape suivante consiste à charger l'instrument Ion ChefTM parse équipements à savoir (Figure 19) :

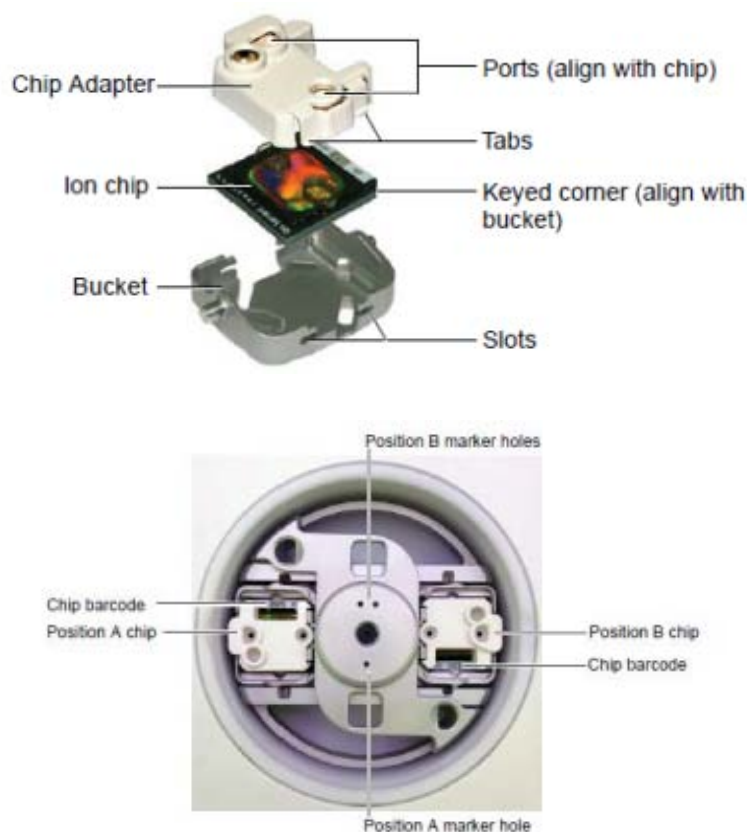
- Reagentcartridge (Celui utiliser est l'Ion 520™) ;
- Ion S5™ Chef Solutions ;
- Chip Adapter ;
- EnrichmentCartridge V2
- Tip Cartridge V2
- PCR plate
- Frame Seal V2
- Recovery Station Disposable Lid V2
- Recovery Tube V2.



**Figure 19:** Emplacement des équipements de l'IonChef™

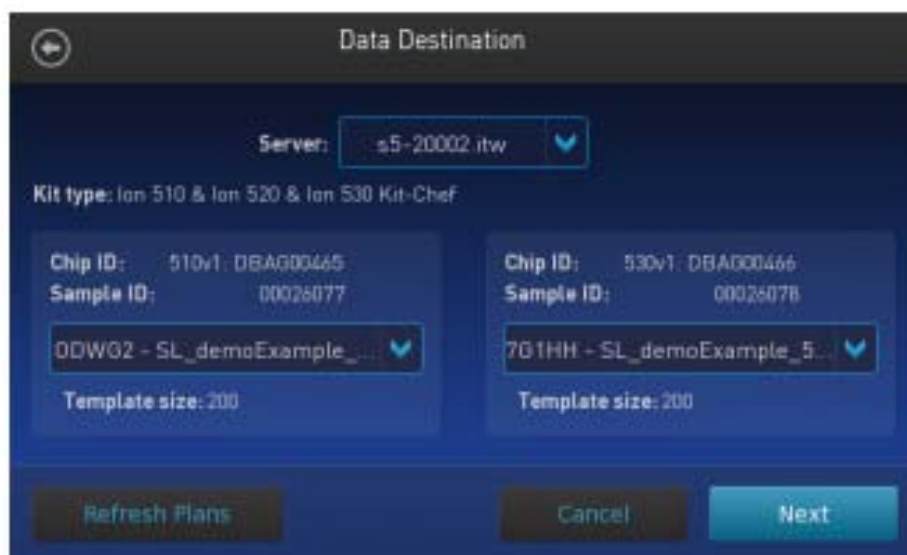
Quant au chargement de la puce, cette dernière se charge dans le seau de la centrifugeuse de tel sorte que le code-barres doit être visible. L'adaptateur de la puce doit être placé par la suite sur la puce et les languettes fixes sont à insérer dans les fentes du seau.

Finalement, l'ensemble adaptateur/puce/godet est chargé dans la centrifugeuse de chargement de puces. La position A de la centrifugeuse est à 90° dans le sens des aiguilles d'une montre du trou unique.



**Figure 20 : positionnement de l'ensemble adaptateur/puce/godet.**

Une fois les consommables et la puce sont installés, le cycle peut être lancé sur le Ion Chef™. En suivant les instructions à l'écran, depuis le « Set up run » jusqu'au « Strat check » et « Deck Scan » l'instrument se prépare en scannant les codes-barres de tous les consommables et réactifs pour s'assurer de leur présence et de leur compatibilité. Lorsque le « Deck Scan » est terminé, appuyer sur « Next » pour afficher l'écran de destination des données.



**Figure 21** : destination des données

Une fois le cycle est achevé, la puce doit être récupérée et stockée à 4°C jusqu'à ce que le séquenceur soit prêt (jusqu'à 6 à 8 heures maximum).

### **3. Le séquençage :**

Le cycle de séquençage doit être démarré dès que possible une fois le chargement de la puce et l'initialisation de l'instrument terminé. Cependant, les cycles de séquençage réussis peuvent être démarrés jusqu'à 24 heures après l'initialisation de l'instrument.

Effectivement, en amont de l'étape de séquençage, une initialisation du S5 est requise et permet notamment une homogénéisation des valeurs de pH ~ 7,8 au sein des différents réactifs de l'appareil (Auto pH).



La matrice de séquençage couplée aux amorces de séquençage et à la polymérase est chargée sur la puce Ion Torrent selon un protocole bien spécifique. Les puces se déclinent selon 3 capacités de séquençage (Chip 314 >10Mb, Chip 316 >100Mb, Chip 318 >1Gb). A noter qu'une version « v2 » pour chacune des puces précitées existe et est indispensable pour toute application de séquençage nécessitant la chimie 400. Le séquençage multi-parallélisé revient donc au décryptage simultané des fragments ADN couplés aux ISP. A chaque polymérisation de nucléotides non modifiés, la libération d'ions H<sup>+</sup> entraîne une variation de pH, elle même détectée au niveau de la couche mince (technologie des semi-conducteurs) située au fond de chaque puits. L'ensemble des données brutes générées est transcrits sous forme d'ionogrammes (Figure 22).

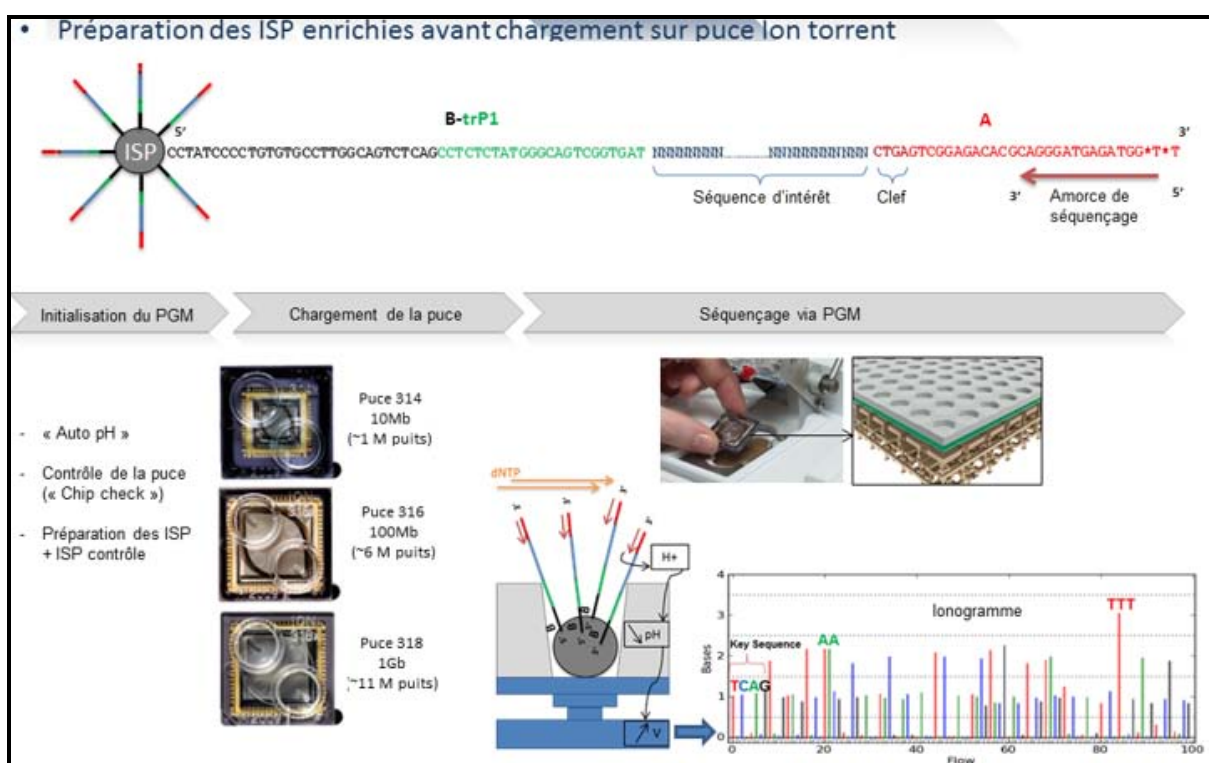


Figure 22 : Principe de séquençage.[1]

#### 4. Les données du séquençage :

A l'issue du « run » de séquençage, le fichier .DAT regroupe l'ensemble des données brutes (ionogrammes). Ces fichiers sont transférés du PGM vers le Torrent Server. L'algorithme de « base calling » permet la conversion des données sous forme de lettres en séquences (A, T, C, G) formant le read (séquence au format FASTA) associé à un score de qualité (Phred Score codé en ASCII), les deux types de données étant associés dans un fichier. FASTQ (qui tend à devenir le format de référence).

Un prétraitement est également appliqué sur la base des reads générés et qui équivaut au nombre d'ISPs vivantes ou « Live ISPs » (On parle d'ISPs vivantes pour les ISPs associées à la clef) :

- trimming : élimination des adaptateurs et/ou portions de reads de mauvaise qualité
- filtres : élimination des « reads » de petites tailles, de mauvaise qualité, des polyclonaux

L'ensemble de ces informations est repris au travers du « report » généré à l'issue du séquençage et du prétraitement. Y sont également renseignés, le nombre de reads générés ainsi que leur taille moyenne (Figure 23).

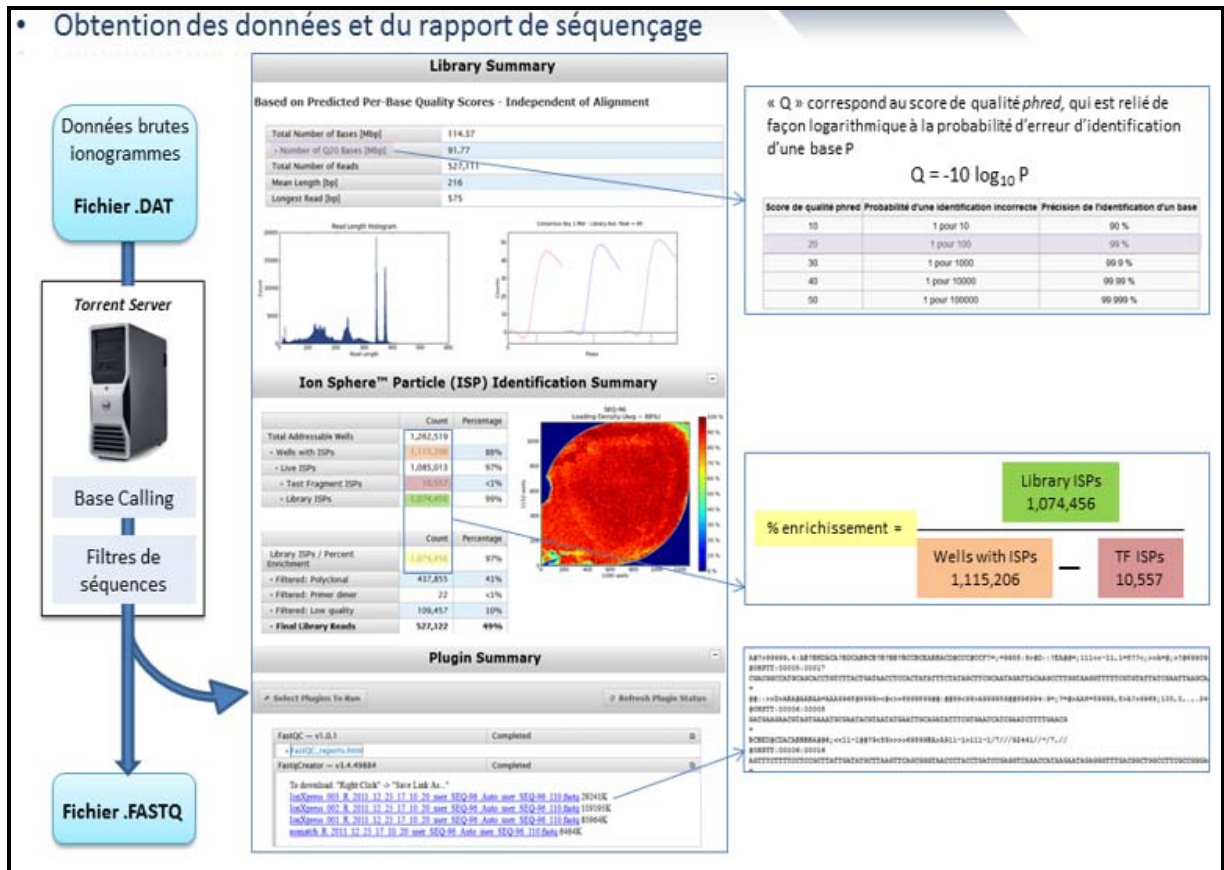


Figure 23: rapport de séquençage.[1]



# DISCUSSION



## I. PATHOLOGIE MOLECULAIRE EN CANCEROLOGIE :

### 1. Définition :

La médecine personnalisée est une nouvelle approche de prise en charge des patients. Elle vise à intégrer et prendre en compte les données du patient pour lui offrir le traitement le plus adapté à son cas. Ceci est, particulièrement, vrai en oncologie médicale. Le but est de prescrire le traitement le plus adapté et ayant démontré son efficacité. Elle s'aide pour cela des résultats d'analyse pointue, notamment, de biologie moléculaire pour déterminer les caractéristiques moléculaires des tumeurs permettant d'asseoir le diagnostic, d'évaluer le pronostic et de prédire la réponse à des thérapies ciblées. Il s'agit de la pathologie moléculaire, un des fondements principaux de la médecine de précision.

### 2. Définition des biomarqueurs :

Un biomarqueur peut être défini comme une mesure objective d'une caractéristique biologique, qui est évaluée pour son potentiel en tant qu'indicateur de processus physiologiques ou pathologiques, voire de l'efficacité d'un traitement médicamenteux. [2] Les biomarqueurs sont largement utilisés en recherche clinique et en pratique médicale pour améliorer le diagnostic, le traitement et le suivi des maladies.

Cet outil biologique peut être déterminé par diverses méthodes, notamment l'immunohistochimie, l'hybridation in situ, la biochimie ou la biologie moléculaire.

Les différents types de biomarqueurs d'intérêt en oncologie sont :[2]

- **Physiopathologique** : permettant l'explication des modifications des fonctions de l'organisme
- **Diagnostique** : utilisé pour aider à identifier la présence ou l'absence d'une maladie ou d'un trouble.[3]

- **Pronostique** : utilisé pour prédire l'évolution probable de la maladie chez un patient, et définir par exemple une population de bon pronostic où une descasclade thérapeutique peut être envisagée. [3]
- **Prédictif** : pour prédire l'efficacité d'un traitement médicamenteux chez un patient.[3]
- A ce niveau, on peut distinguer :[2]
  - ❖ Un test prédictif dit « Compagnon » :Prédictif comportant une thérapie spécifique et "requis" avant l'utilisation de la dite thérapie. [2]
  - ❖ Un test prédictif dit « Complémentaire »: Prédictif avec une thérapie spécifique et accepté comme fournissant une orientation pour la thérapie mais non requis. Un biomarqueur peut être unique ou composite (équation basée sur plusieurs éléments précités). [2]

### **3. Principales altérations moléculaire en cancérologie :**

La dérégulation de l'expression de ces gènes peut faire partie aussi bien au niveau du gène que de ses produits. Bien que les altérations puissent concerner soit l'ADN, l'ARN ou la protéine, nous nous consacrons dans ce travail qu'aux anomalies de l'ADN.

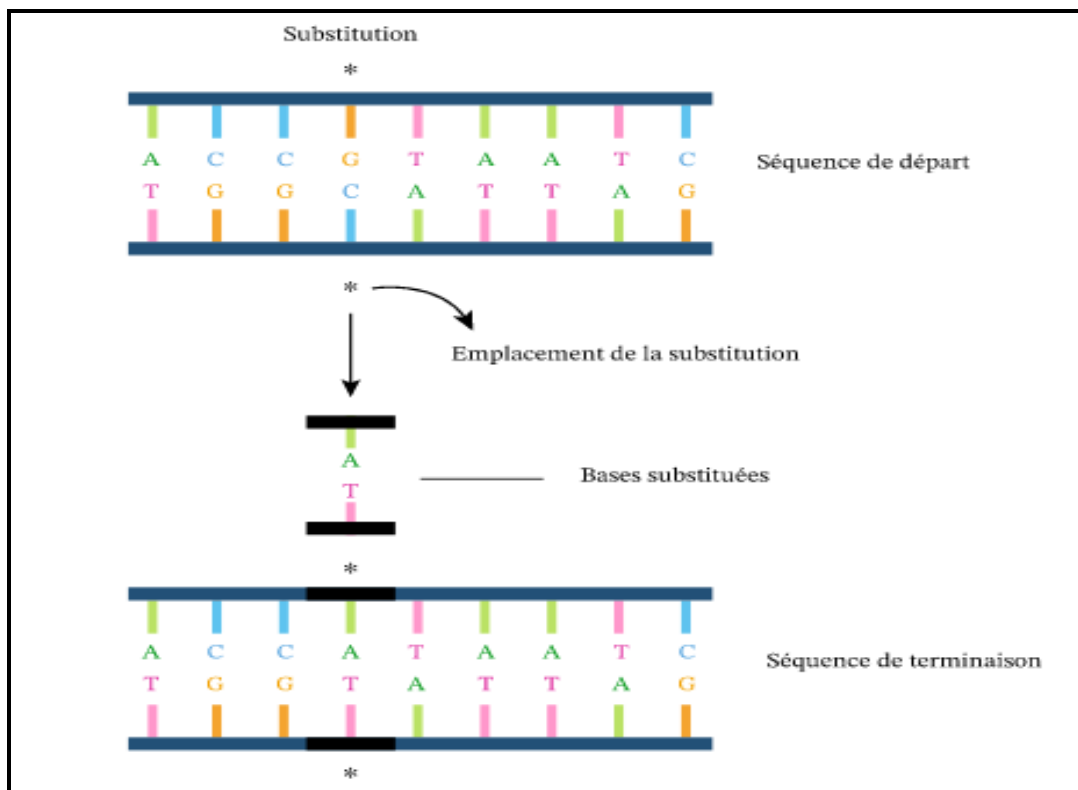
Celui-ci est le support de l'information génétique. Il peut être la cible de mutations ponctuelles, de remaniements chromosomiques, ou encore de variations épigénétiques. [9] [17]

En dehors des anomalies de méthylation caractéristiques de l'épigénétique, on peut distinguer essentiellement trois grands types d'instabilité :

#### **3.1 L'instabilité nucléotidique ou NIN :**

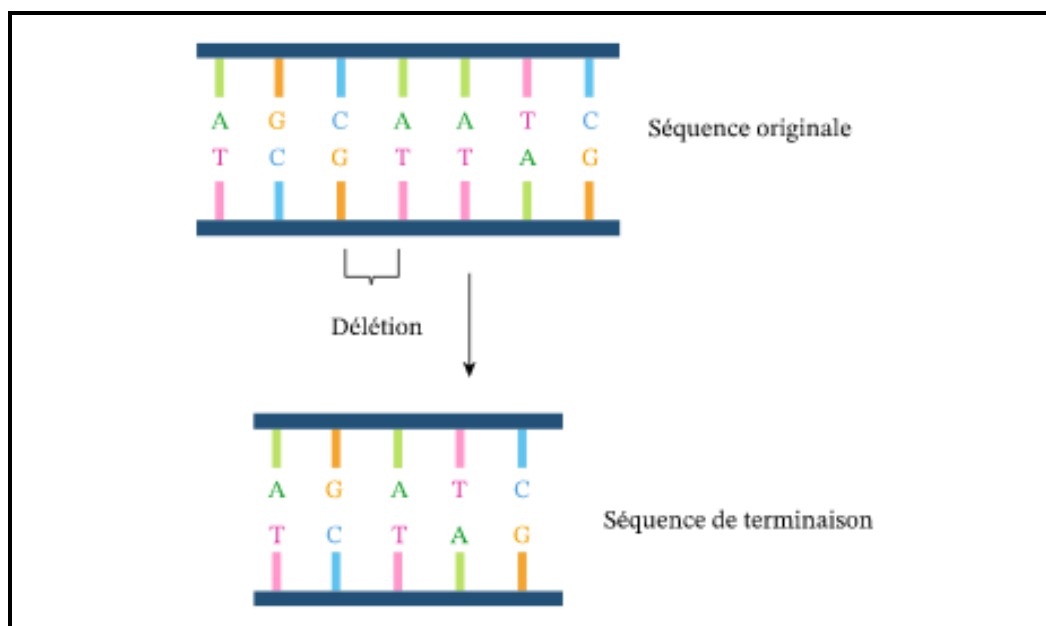
L'instabilité nucléotidique, également appelée NIN, résulte de dysfonctionnements dans les processus de réparation de l'ADN, ce qui entraîne des modifications subtiles de la séquence d'ADN appelées mutations à type de :

- ❖ **Substitutions** :Il y a un remplacement d'une base d'ADN par une autre base d'ADN dans un site précis du génome.



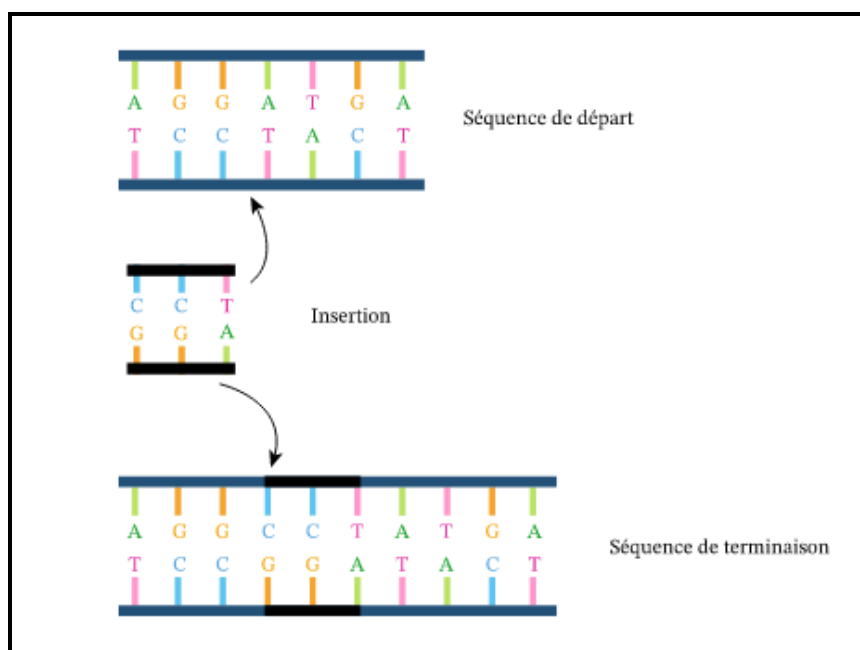
**Figure 24 :** Illustration d'une anomalie par substitution.[4]

- ❖ Délétions : Lors d'une mutation par délétion, une séquence d'un ou plusieurs paires de bases est supprimée à partir d'un locus d'ADN.



**Figure 25 :** Illustration d'une anomalie par délétion.[4]

- ❖ Insertions de nucléotides : Lors d'une mutation par insertion, une ou plusieurs nouvelles paires de bases sont ajoutées à un locus d'ADN.



**Figure 26:** Illustration d'une anomalie par insertion.[4]



Ces changements peuvent affecter la séquence codante du gène, appelée « exon », et entraîner soit une substitution d'acide aminé, soit la production d'une protéine incomplète. Les conséquences peuvent être variées :

- ❖ Altération fonctionnelle de la protéine avec perte ou gain de fonction,
- ❖ Changement de la sensibilité à la dégradation,
- ❖ Dérégulation de son niveau d'expression.

D'autres mutations peuvent affecter les séquences régulatrices des gènes, entraînant une perturbation du niveau de transcription. À l'inverse, certaines mutations peuvent diminuer l'activité promotrice.

### **3.2 L'instabilité microsatellitaire ou MIN :**

L'instabilité microsatellitaire est une affection génétique qui se manifeste par des mutations répétitives dans les régions de l'ADN appelées microsatellites. Ces derniers sont des séquences courtes et répétitives d'ADN présentes dans tout le génome humain. Bien qu'ils soient normalement stables, chez certaines personnes, ces séquences peuvent subir des mutations répétitives qui altèrent leur longueur.

L'instabilité des séquences répétées du génome (appelées microsatellites) résulte de l'inactivation fonctionnelle du système de réparation des erreurs produites au cours de la réplication de l'ADN (système mismatch repair MMR). [5]

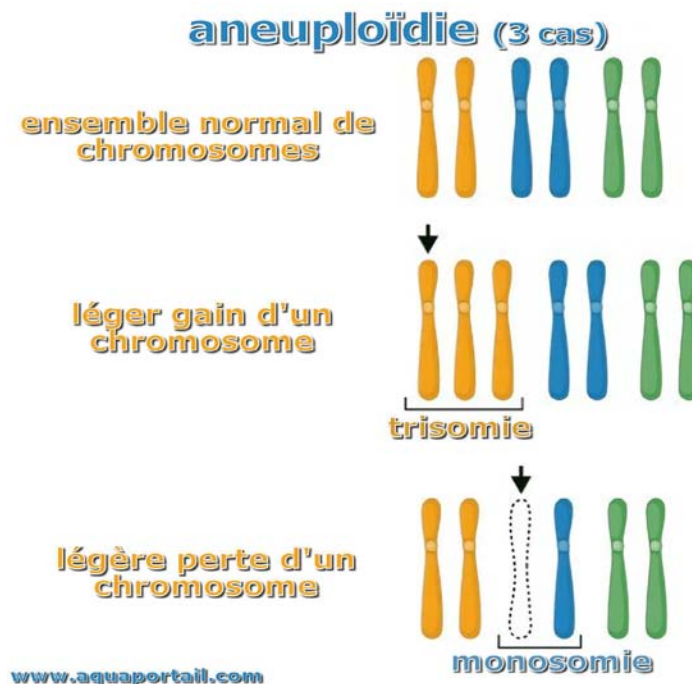
Elle signe un phénotype tumoral fréquent appelé MSI (microsatellite instable) qui a été mis en évidence il y a un peu plus de 20 ans. Elle peut être héréditaire tel est le cas dans le Syndrome de Lynch, ou, le plus souvent, de survenue sporadique. [5]

### 3.3 L'instabilité chromosomique ou CIN :

Elles peuvent être classées en quatre grandes catégories :

a. l'aneuploïdie,

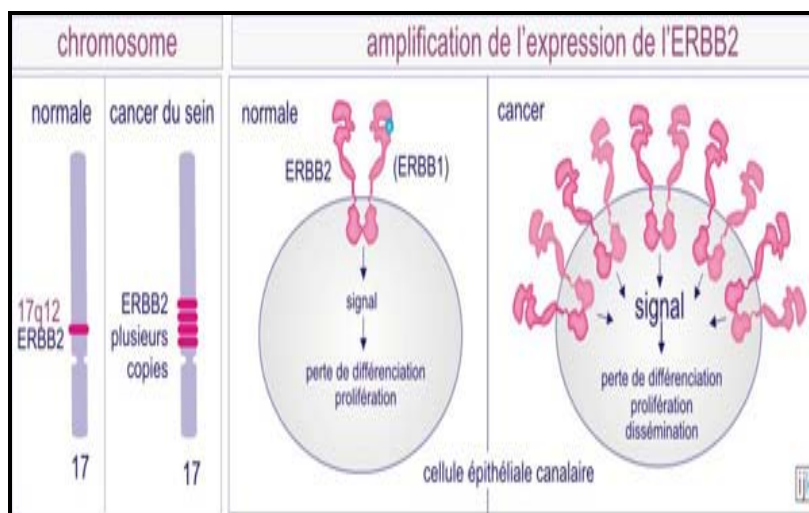
caractérisée par un nombre anormal de chromosomes consécutif à une perte ou un gain de chromosomes ou de bras chromosomiques qui reste parmi les propriétés les plus communes des cellules cancéreuses et associée à l'agressivité tumorale [18].



**Figure 27:** Schéma explicatif d'une Aneuploidie [6]

b. L'amplification de gènes qui a lieu spécifiquement au niveau des régions contenant des gènes dont la surexpression est corrélée à des stades plus ou moins précoces de la tumorigenèse et impliqués dans :

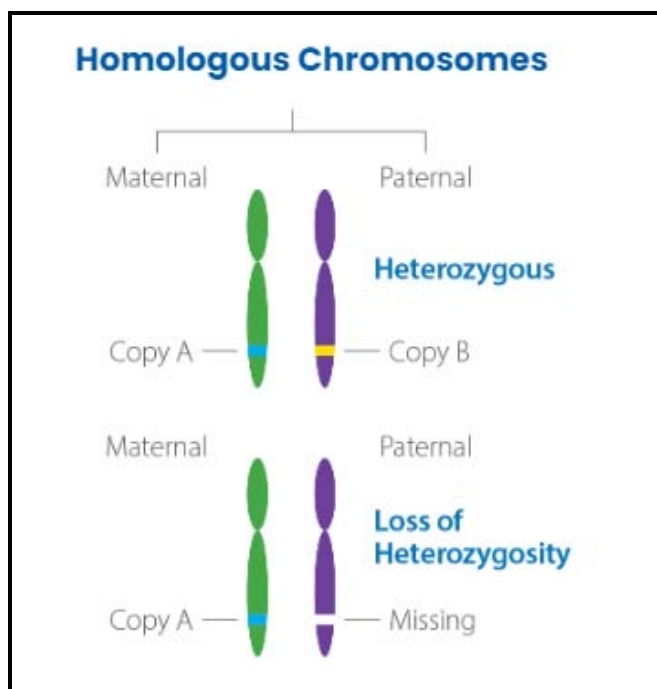
- ❖ la croissance (ERBB2, EGFR, ...)
- ❖ la prolifération (c-Myc, NMyC, K-Ras, Cycline D1, ...)
- ❖ l'inhibition de l'apoptose (Bc12, HDM2, ...)
- ❖ la résistance aux drogues (MDR1, MPR ...)



**Figure 28:** Illustration d'une anomalie par amplification. [7]

c. La perte de gènes ou LOH (loss of heterozygosity) qui affecte différents gènes suppresseurs de tumeurs. C'est par exemple le cas des gènes codant :

- ❖ p16 (CDKN2A)
- ❖ p15 (CDKN2B)
- ❖ p53
- ❖ ou encore de BRCA1 et de son homologue BRCA2 ;

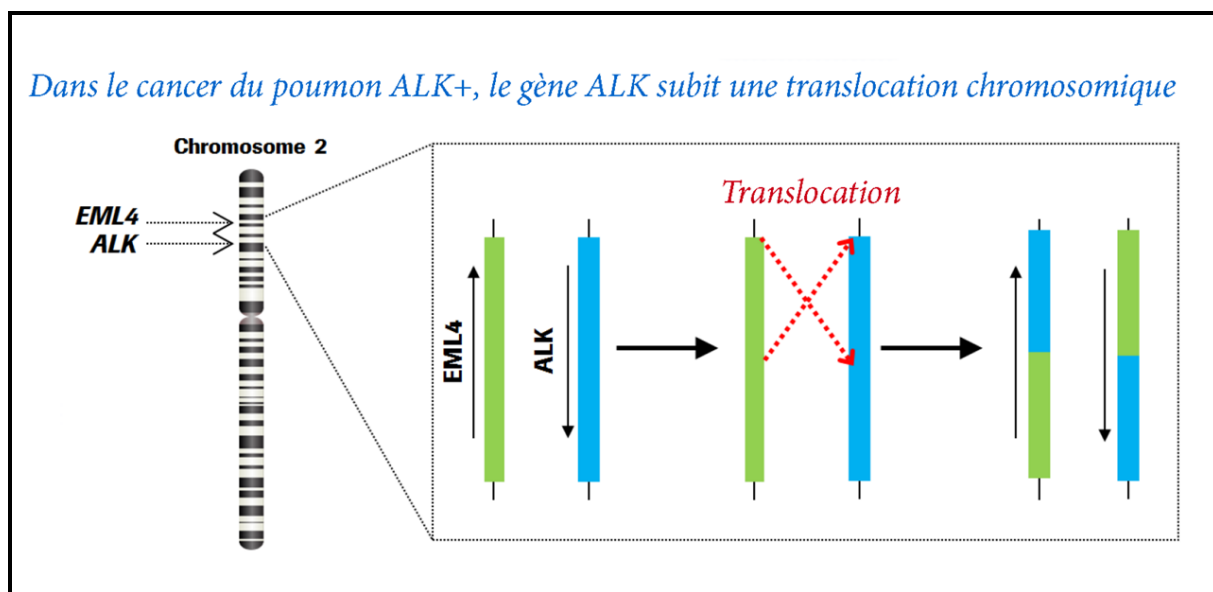


**Figure 29** : Schéma explicatif de la perte d'hétérozygote. [8]

- d. les réarrangements géniques qui sont dus à la translocation et la fusion de fragments de chromosomes.

Ils conduisent souvent à l'expression de protéines chimériques et/ou placent le gène sous le contrôle du promoteur d'un autre gène entraînant, dans tous les cas, un niveau d'expression anormal. Parmi les cas les plus étudiés :

- ❖ celui du chromosome de Philadelphie dû à la translocation de la partie 3' de l'oncogène ABL (Abelson) localisé sur le chromosome 9 et sa fusion à la partie 5' du gène BCR (Breakpoint Cluster Region) donnant naissance à la protéine de fusion BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques [9].
- ❖ La translocation t(8, 14) de l'oncogène c-Myc ne donne quant à elle pas naissance à une protéine chimérique mais place le gène sous la dépendance du promoteur de la chaîne lourde de l'immunoglobuline H (IgH) et est associée au développement de certaines leucémies et lymphomes, en particulier, du lymphome de Burkitt [19].



**Figure 30 :** Illustration d'une anomalie par translocation du gène ALK dans le cancer du poumon.[9]

#### **4. Techniques de détection en pathologie moléculaire :**

De nombreuses techniques ont été utilisées pour détecter et mettre en évidence les altérations génétiques en pathologie moléculaire.

##### **a) L'immunohistochimie (IHC) :**

L'IHC détecte l'expression des protéines dans les tissus. Les échantillons de tissu sont marqués contre des biomarqueurs spécifiques (par incubation avec des anticorps contre des épitopes spécifiques). L'expression est visualisée par microscopie. La biopsie d'une tumeur solide est requise[10],[11]

Parmi les avantages de cette technique, on peut citer :

- ❖ Un délai d'exécution rapide [10]
- ❖ Une technique peu coûteuse et largement disponible[11]
- ❖ Une méthode de dépistage précoce utile[12]
- ❖

Les principaux inconvénients sont :

- Il s'agit d'un test ciblant un biomarqueur uniques à la fois [10], [11]
- Elle ne peut pas faire la distinction entre une protéine de type sauvage et une protéine potentiellement altérée
- Elle ne fournit aucune information sur les partenaires de fusion potentiels[11].
- Elle manque de normalisation pour certaines altérations [12]

b) **L'hybridation in situ :**

La technique de FISH détecte les délétions, amplifications et réarrangements[10]–[11] . Des sondes fluorescentes sont utilisées pour détecter et localiser des séquences d'ADN cibles spécifiques dans les cellules tumorales, et les signaux colorés qui en résultent peuvent être détectés à l'aide d'un microscope fluorescent[10], [11]. Une biopsie de la tumeur solide est nécessaire[10], [11]

Les principaux avantages de cette technique sont :

- Il s'agit d'une technique très sensible[12]
- Le délai d'exécution est relativement rapide[13]
- La possibilité d'identifier plus d'un biomarqueur à la fois grâce à l'utilisation de plusieurs sondes [11]

Les inconvénients de la technique sont :

- Le test cible un biomarqueur unique [10], [11]
- L'interprétation nécessite une expertise technique. [11], [12]
- L'absence de seuil standard de positivité. [12]
- Elle ne permet pas d'identifier le partenaire de fusion pour certaines altérations ou de distinguer les fusions actives/inactives. [12],[14]

c) La réaction de polymérase en chaîne ( PCR ) :[15]

La PCR est la technique la plus utilisée au laboratoire en pathologie moléculaire. Elle permet d'obtenir rapidement, in vitro, un grand nombre de segments d'ADN identiques, à partir d'une séquence initiale d'intérêt. Il s'agit d'une technique très sensible qui permet de détecter des mutations même si c'est à de très faibles quantités [16] La PCR quantitative ou « Real-Time PCR » est de grand intérêt en cas de recherche de la maladie résiduelle après l'utilisation d'un nouveau traitement ciblé [17]

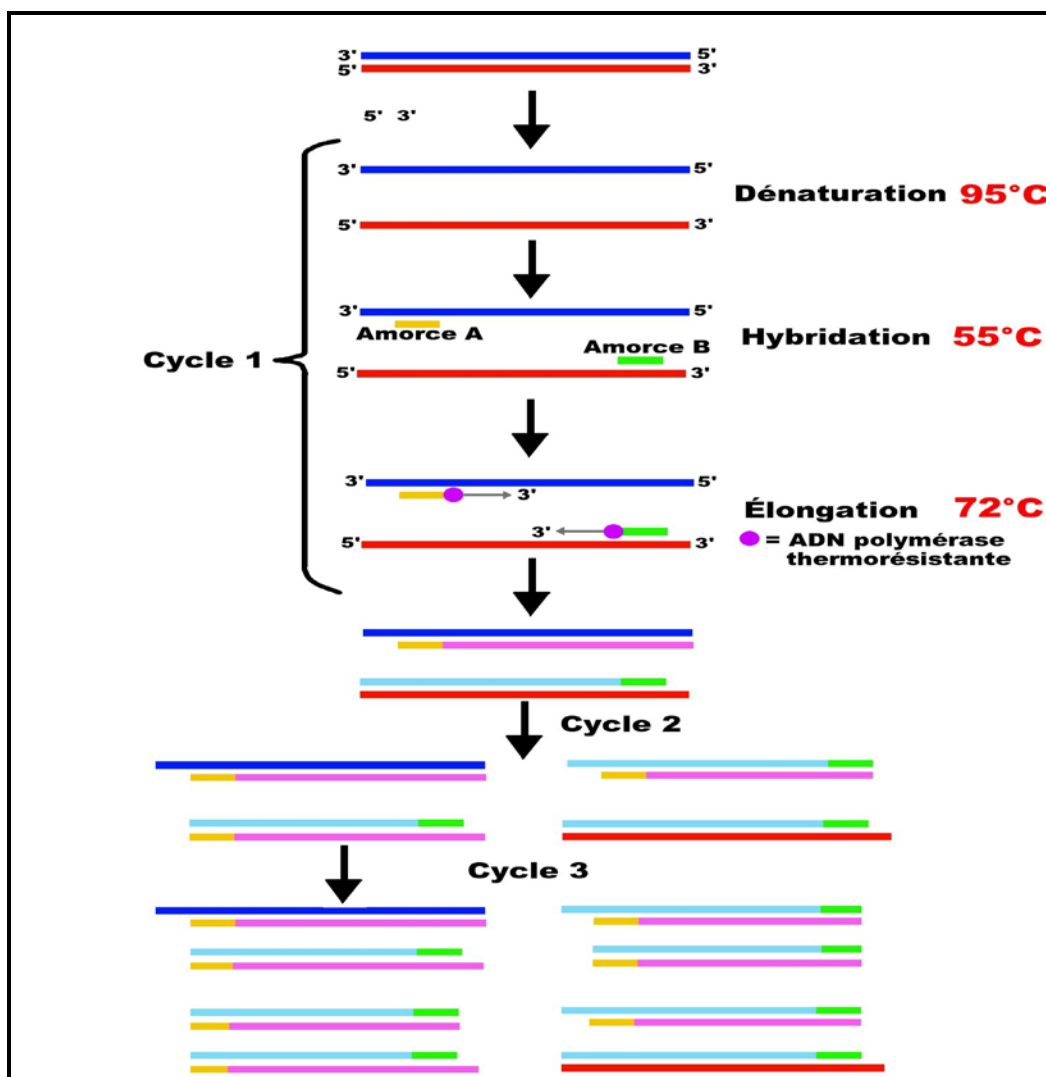


Figure 31 : Chronologie de la PCR[18]

Les avantages de la PCR sont :

- La tendance à être spécifique dans l'amplification de la séquence cible du fragment d'ADN. [19],[20].
- Une technique peu coûteuse et facilement accessible. [19],[20]
- Un délai d'exécution rapide. [19],[20]
- Approbation par la FDA et de plusieurs pour les thérapies ciblées approuvées par la FDA. [21]

Les principaux inconvénients sont :

- La nécessité d'avoir des informations et données préalables sur la séquence cible sont nécessaires pour générer les amorces pour l'amplification sélective. [22]
- Le risque non négligeable de contamination des échantillons. [22]
- Certaines erreurs lors de la technique (notamment la Taq polymérase) [23]
- Possibilité de surreprésentation de la même séquence sur certains fragments. [24]

d) **Le séquençage de première génération Sanger :**

C'est une technique développée dans les années 1970. Elle est appelée, aussi, technique par « Electrophorèse capillaire ». Elle permet l'identification des altérations majeures (drivers), ainsi que de mutations majoritaires de type hotspot. Elle a été largement supplantée par le séquençage NGS.

e) **Le séquençage de nouvelle génération (NGS) :**

Le séquençage NGS permet le séquençage massif et parallèle utilisant des technologies élaborées.

Il offre comme avantages [25]:

- La capacité de séquençage massive et en parallèle.
- Le criblage simultané de plusieurs gènes dans plusieurs échantillons.
- Une meilleure appréciation de l'hétérogénéité des tumeurs.



- La détection quantitative et sensible des aberrations génomiques.
- La diminution des coûts de séquençage par gène.

Ces principaux inconvénients sont [25]:

- La complexité du flux de travail, de l'analyse bio-informatique et de l'interprétation des résultats.
- La nécessité d'une validation approfondie des performances de l'essai.
- La nécessité de sélection des gènes pour le panel NGS.
- Le choix et la sélection de l'approche de capture de cible selon la plateforme disponible.
- La nécessaire actualisation et revalidation des mises à jour.

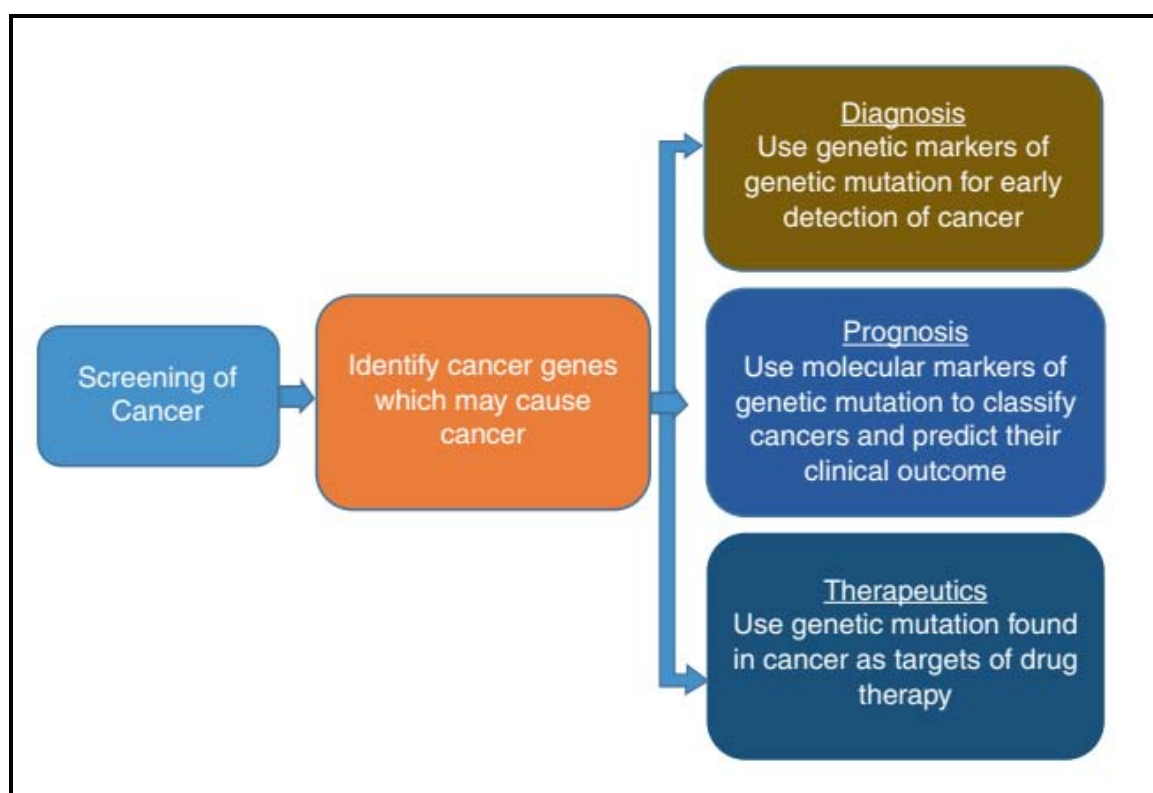
**Tableau I** : Tableau récapitulatif des principales techniques moléculaires [26]

Methodology	Advantages	Disadvantages
Direct Sequencing (Sec. Sanger)	- "gold standard" molecular approach - ability to identify known and unknown genomic alterations - high specificity	- low sensitivity - limited multiplexing power
RT-PCR	- low TAT - high sensitivity - cheap	- ability to identify only known and well characterized genomic alterations - limited multiplexing power.
dPCR	- low TAT - cheap - high sensitivity (higher than RT-PCR)	- ability to identify only known and well characterized genomic alterations - limited multiplexing power
NGS	- high sensitivity - ability to identify known and unknown genomic alterations - high multiplexing power.	- careful validation is required; - bioinformatics support is needed; - skilled laboratory staff is required.

## II. Méthodes de détection des biomarqueurs :

### 1. Evolution des méthodes de détection des biomarqueurs :

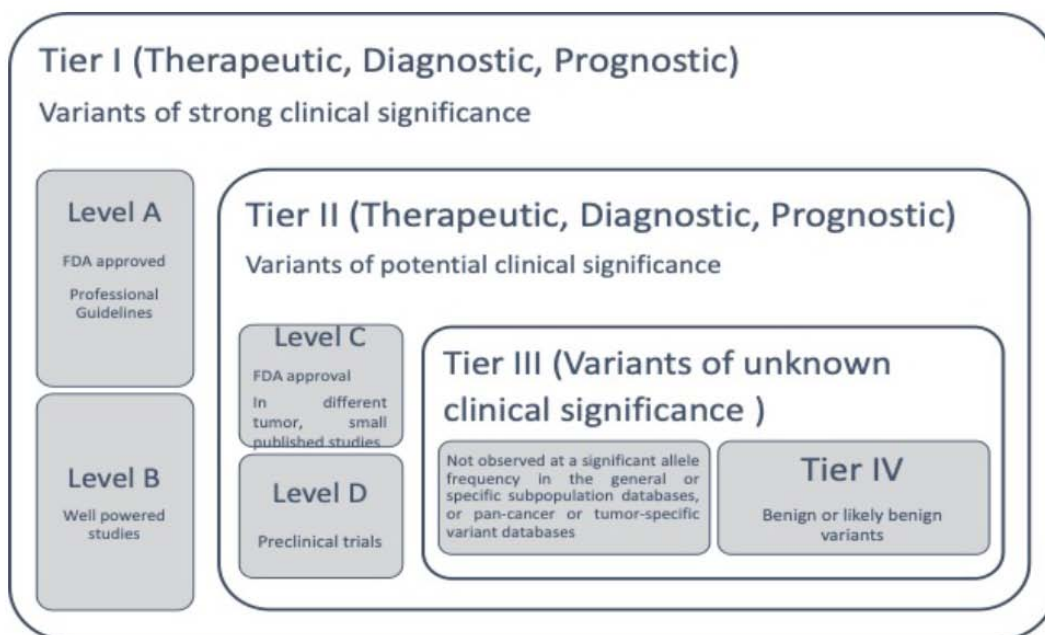
Dans le but d'harmonisation des guidelines, l'European Society for Medical Oncology (ESMO) et le collège américain de pathologiste ont publié des échelles cliniques d'évaluation des cibles thérapeutiques moléculaires. Le but est de mettre l'accent, principalement, sur les biomarqueurs ayant un intérêt clinique et thérapeutique. Ces derniers sont appelés des biomarqueurs « actionnables ».[27], [28]



**Figure 32 :** Intérêt de la recherche des biomarqueurs en oncologie.[15]

**Tableau II:** recommandations de l’ESMO sur les biomarqueurs actionnables[27]

<b>Table 1. European Society for Medical Oncology (ESMO) clinical actionability of molecular targets</b>	
Tier I	Alteration-drug match is associated with improved outcome in clinical trials
Tier II	Alteration-drug match is associated with antitumor activity, but magnitude of benefit is unknown
Tier III	Alteration-drug match is suspected to improve outcome based on clinical trial data in other tumor type(s) or with similar molecular alteration
Tier IV	Preclinical evidence of actionability
Tier V	Alteration-drug match is associated with objective response, but without clinically meaningful benefit
Tier X	Lack of evidence for actionability

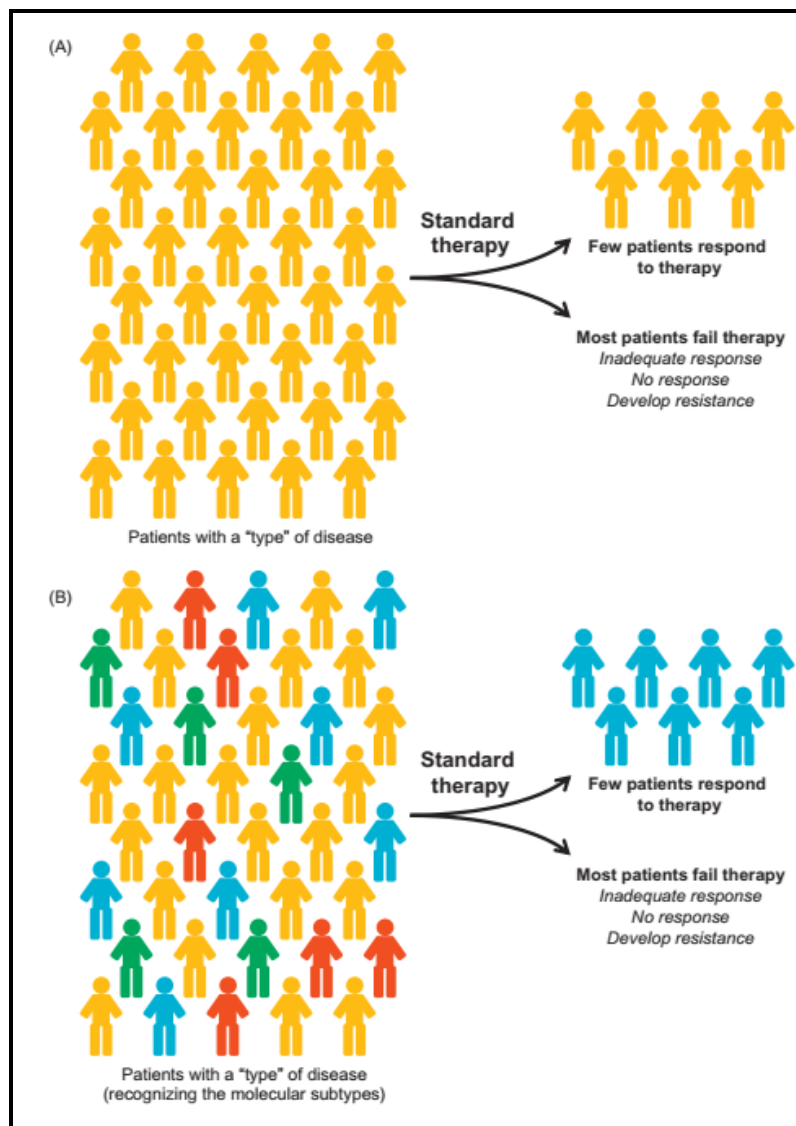


**Figure 33:** recommandations du collège américain de pathologiste sur les biomarqueurs actionnables.[28]

La médecine de précision est passée par de nombreuses phases :

a) **Stratégie de détection par « Histologie seule » :**

C'est la phase d'analyse morphologique exclusive. Dans cette phase, l'histologie seule était pourvoyeuse des facteurs de bons et mauvais pronostics. Tous les patients sont traités de la même manière, souvent, avec un traitement standard. Malheureusement, beaucoup de patients ne tiraient pas de bénéfice notable de ce traitement.[29]

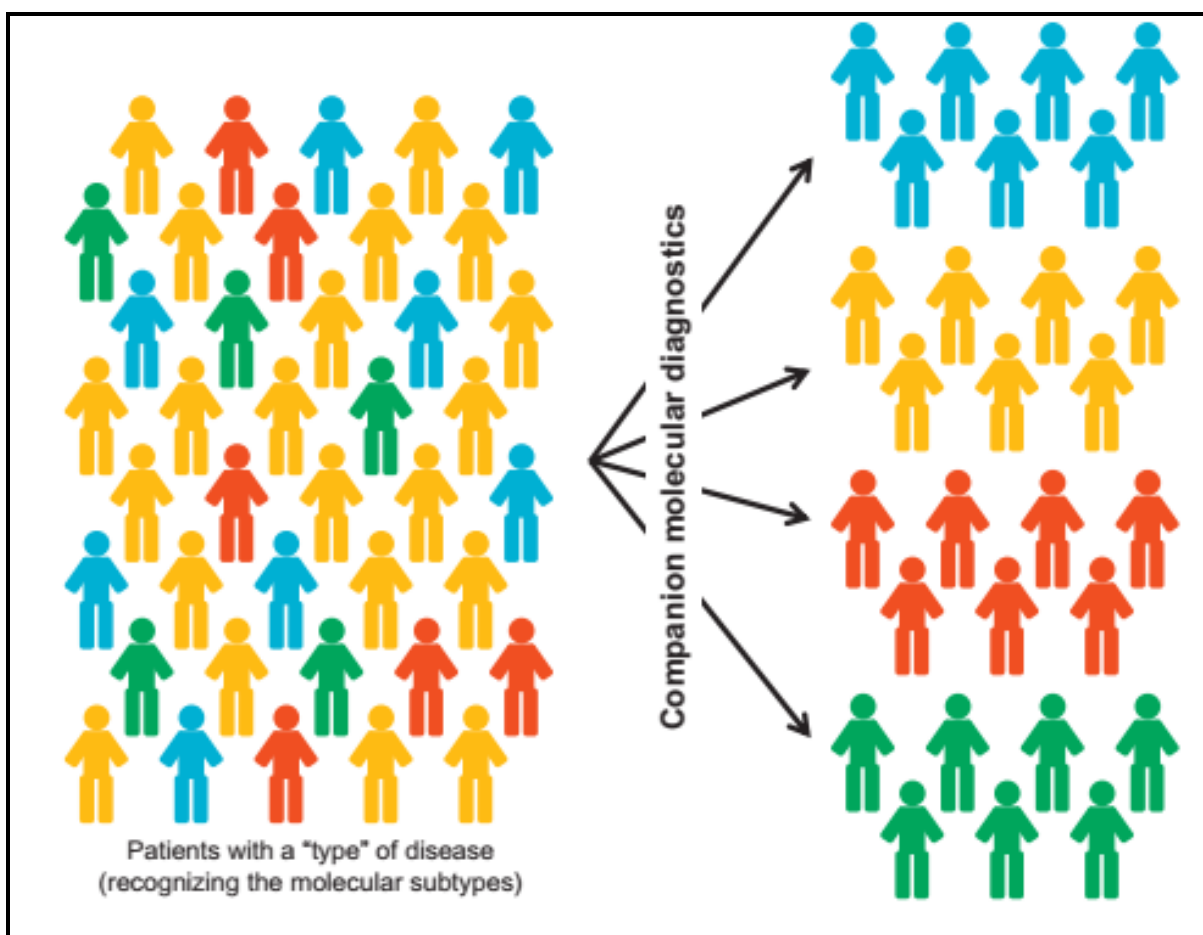


**Figure 34** : Phase où tous les patients bénéficiaient du même traitement standard en se basant sur l'histologie seule[29]

b) **Histologie + 1 biomarqueur :**

C'est la phase d'analyse morphologique combinée à l'étude de quelques biomarqueurs spécifiques combinant l'histologie avec 1 ou plusieurs biomarqueurs spécifiques à une pathologie (exemple EGFR, BRCA1/2...). Ce système permet de donner le traitement au patient.

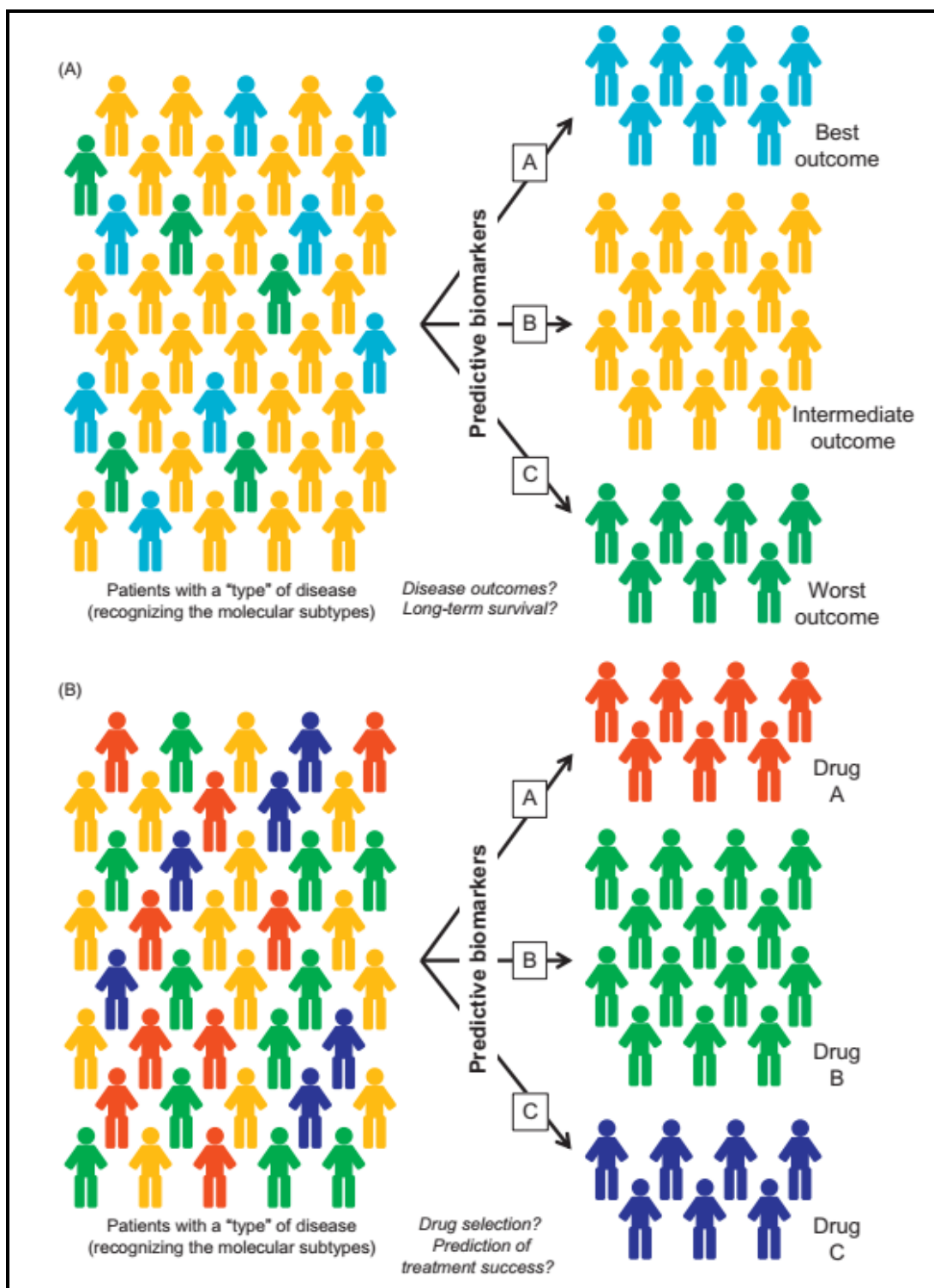
[29]



**Figure 35 :** Phase où tous les patients bénéficient du traitement adéquat en se basant sur les biomarqueurs prédictifs.[29]

c) **Histologie + Profilage génomique large :**

C'est la phase d'analyse morphologique combinée au profilage génomique. Elle combine l'histologie avec un profilage génomique jetant la base de la médecine personnalisée basée sur les altérations spécifiques portées par chaque patient. Cette phase est l'évolution de la phase précédentes.



**Figure 36** : Phase de la médecine personnalisée combinant l'analyse morphologique combinée au profilage génomique. [29]

## 2. Séquençage de haut débit (NGS) :

Il existe diverses plates-formes NGS qui utilisent des technologies de séquençage différentes, mais toutes fonctionnent en séquençant des millions de petits fragments d'ADN simultanément. Les analyses bioinformatiques sont utilisées pour reconstituer ces fragments en cartographiant le génome de référence de chaque individu. Ce processus permet de séquencer chaque base des trois milliards de bases du génome humain plusieurs fois, offrant une profondeur de séquençage considérable pour obtenir des données précises et découvrir des variations inattendues de l'ADN.

Le NGS peut être utilisé pour séquencer des génomes complets ou limité à des domaines d'intérêt spécifiques, incluant l'ensemble des 22 000 gènes codants (un exome complet) ou un petit nombre d'individus de gènes.[30]

Plusieurs technologies NGS à haut débit existent. Nous distinguons 2 grandes catégories de séquenceur.

- Le séquenceur de seconde génération ou « Short-read sequencing » « Short-read NGS ». Elle se réfère au séquenceurs apparus, juste après, le séquenceur Sanger dit de 1<sup>ère</sup> génération. Le caractère commun est le séquençage massif de molécules d'ADN courtes amplifiées de (250–800 bp). Dans cette catégorie, on retrouve les séquenceurs de marque Illumina ou Thermo-fisher [31]–[33]
- Le séquenceur de troisième génération ou « long-read sequencing ». On y retrouve les séquenceurs de type Pacific Biosciences ou Oxford Nanopore technology. Elles peuvent atteindre une longueur de lecture jusqu'à 10 kb.

### 2.1 Le séquenceur de seconde génération ou « Short-read sequencing » :

Elles doivent leur réussite à une analyse synchrone des séquences, synonyme d'une baisse des coûts, d'une vitesse accrue et d'une plus grande sensibilité. Là où la méthode de Sanger nécessite préalablement de générer différents brins d'ADN de longueurs différentes, associées à un fluorophore pour la lecture, ces méthodes reconstituent directement les brins

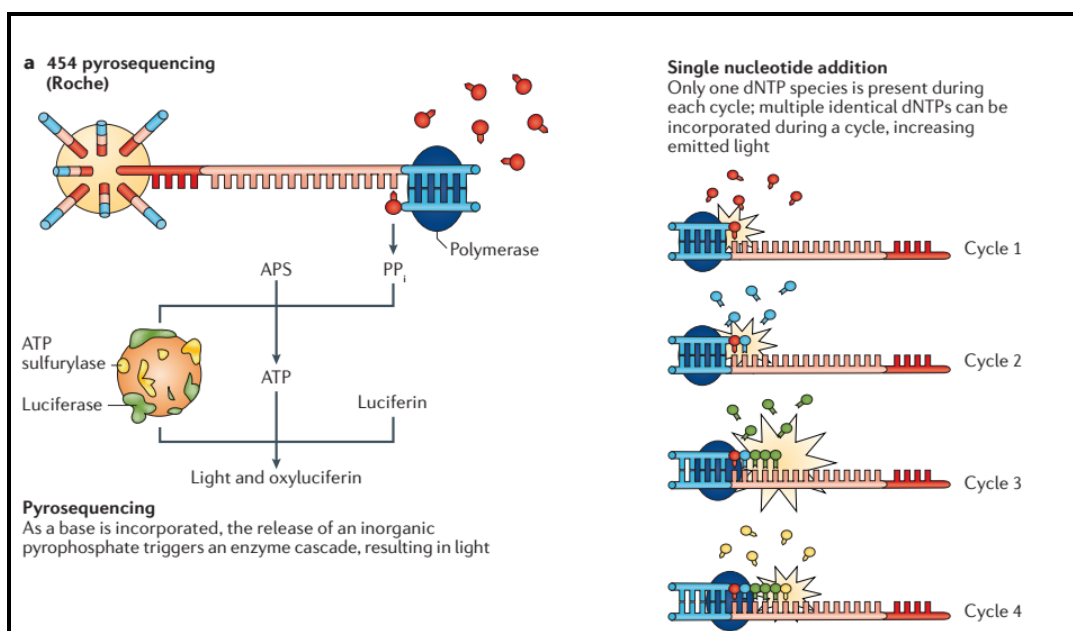


d'ADN en déterminant quels éléments viennent d'être intégrés. Pour ce faire, ces technologies partent d'un simple brin d'ADN préalablement préparé, mais utilisent par la suite des approches différentes que nous décrivons ci-dessous. [34]

**a) Le Pyroséquençage (Roche 454) :**

Cette méthode implique d'abord la fragmentation mécanique de l'ADN, suivi d'une étape d'amplification par PCR. La PCR est réalisée en émulsion, ce qui permet d'effectuer plusieurs millions de réactions distinctes dans un seul tube. Ensuite, le mélange obtenu est déposé sur une plaque pour lancer la réaction de séquençage par synthèse, base par base. La lecture de chaque nucléotide incorporé est révélée par une réaction chimio-luminescente et détectée par une caméra CCD. À chaque étape, le nucléotide inséré est dégradé pour permettre l'insertion d'un nucléotide différent dans la séquence complémentaire.

Grâce à cette technologie, il est possible d'obtenir jusqu'à un million de séquences, avec une longueur pouvant atteindre 400 paires de bases (pb). Cependant, les erreurs de séquençage les plus fréquentes sont des insertions ou des délétions résultant des régions homopolymères, qui sont des répétitions identiques de la même base. [35],[36]



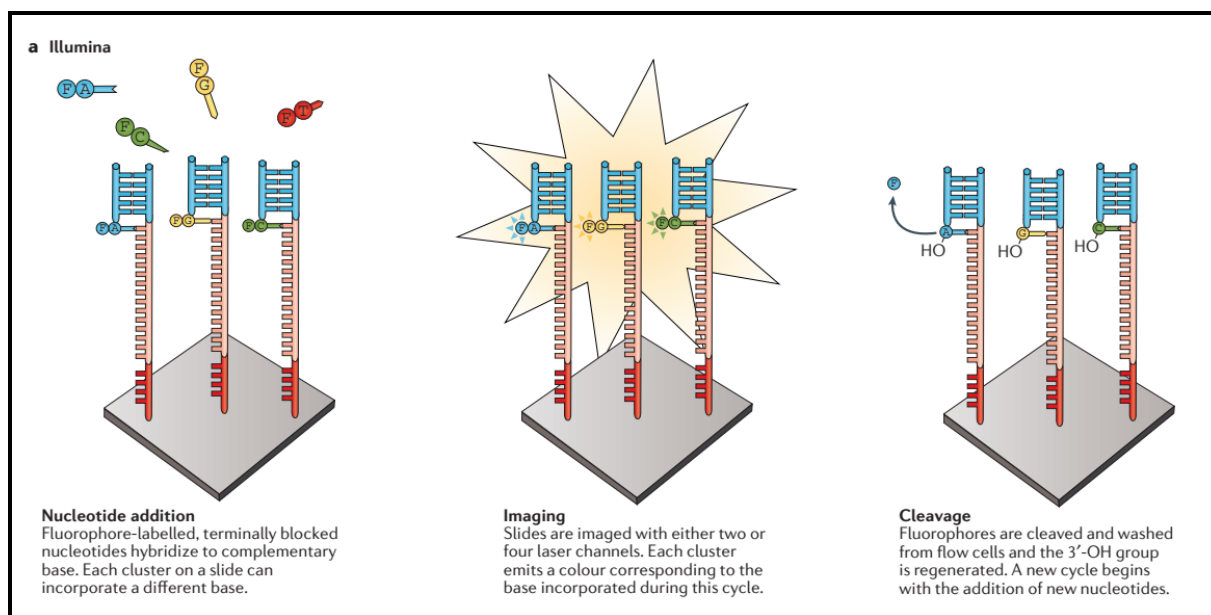
**Figure 37 :** Image récapitulative de la technique de pyroséquençage. [37]

**b) Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina) :**

Dans cette technique, l'amplification de l'échantillon à analyser se produit sur un support solide plutôt qu'en solution. La réaction de séquençage est ensuite réalisée directement sur ce support où l'ADN a été amplifié. La séquence est déterminée position par position à l'aide d'un mélange contenant toutes les bases, chacune associée à un fluorophore différent. L'extrémité des bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Un laser détecte les bases incorporées à chaque position, tandis que le clivage des fluorophores permet l'incorporation de la base suivante. Cette méthode permet d'acquérir en parallèle plus de 3 milliards de séquences de 150 paires de bases. Comme chaque position est lue une à la fois, les erreurs principales de cette technologie sont des substitutions de base.[35], [36]



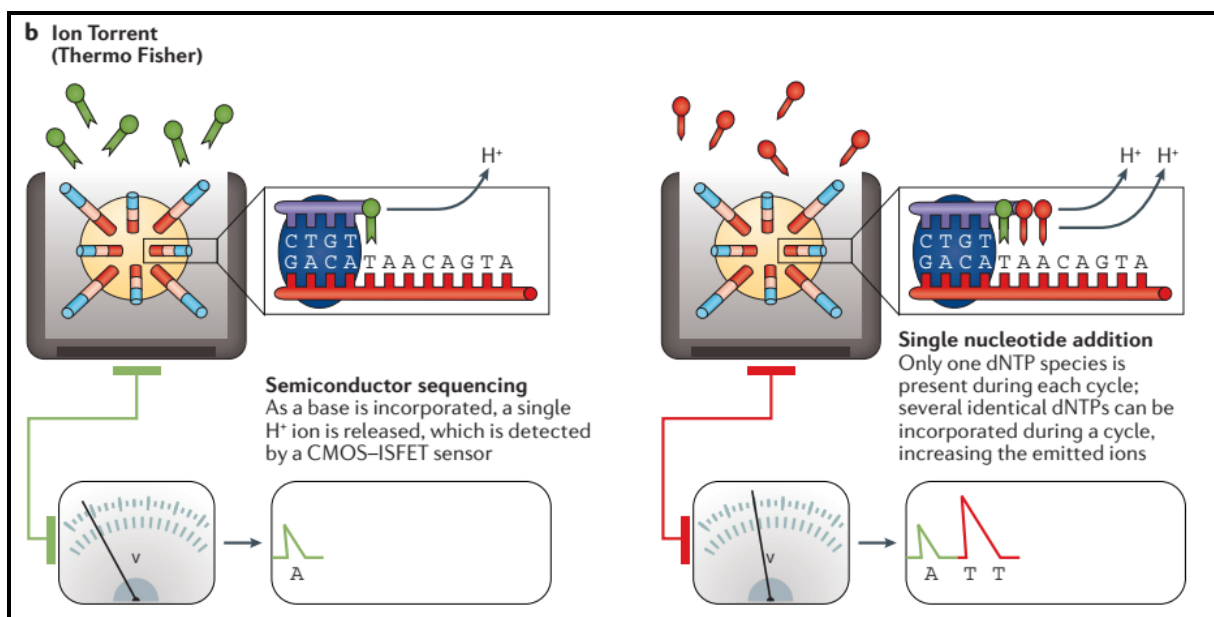
**Figure 38: Exemple d'un séquenceur haut débit ILLUMINA [38]**



**Figure 39 : Image récapitulative de la technique Illumina[37]**

**c) Séquençage par ligation (Ion Torrent - Thermo fisher ):**

La méthode de séquençage par ION TORRENT commence par une étape d'amplification similaire à celle du pyroséquençage, mais les séquences amplifiées sont attachées à un support solide plutôt qu'à une plaque. La réaction de séquençage se déroule ensuite en utilisant un système complexe de cycles de ligation et de clivage, qui permet non seulement la lecture de la séquence, mais également la correction des erreurs d'incorporation. Cette méthode permet de lire simultanément jusqu'à 1,5 milliard de séquences de 75 bases, et la présence d'un système intégré de correction d'erreurs et l'utilisation de la ligase rendent cette technologie très fiable.[35], [36]



**Figure 40 :** Image récapitulative de la technique Ion Torrent [37]

Ci joint nous vous présentons un tableau ( tableau 2 ) comparatives entres les 3 techniques :

**Tableau III** : tableau comparatif entre les 3 techniques de séquençage de nouvelle génération.

[39]

(Modified from [38]).

Platform	Roche 454/GS FLX +	Illumina GAI		Life Technologies / SOLiD 5500xl system
		GAI	HiSeq 2000	
Library	Fragment / emulsion PCR	Fragment / polony		Fragment / emulsion PCR
Sequencing Principal	Pyrosequencing	Sequencing by synthesis		Sequencing by ligation
Read length (base)	700–1000	150	100	75
Gb per run	0.7	95	600	300
Pros	Long reads improve mapping in repetitive regions, fast run time	Currently the most widely used platform in the field		Two-base encoding provides inherent error correction
Cons	High reagent cost, high error rate in homopolymer repeats	Low multiplexing capability of samples		Long run time
Examples of biological applications	Bacterial and insect genome <i>de novo</i> assemblies, medium scale (<3 Mb) exome capture, virus discovery in metagenomics	Variant discovery by whole—genome resequencing or whole—exome capture, virus discovery and gene discovery in metagenomics		Variant discovery by whole—genome resequencing or whole—exome capture, gene discovery in metagenomics

### 2.2 Le séquenceur de troisième génération ou « Long-read sequencing » :

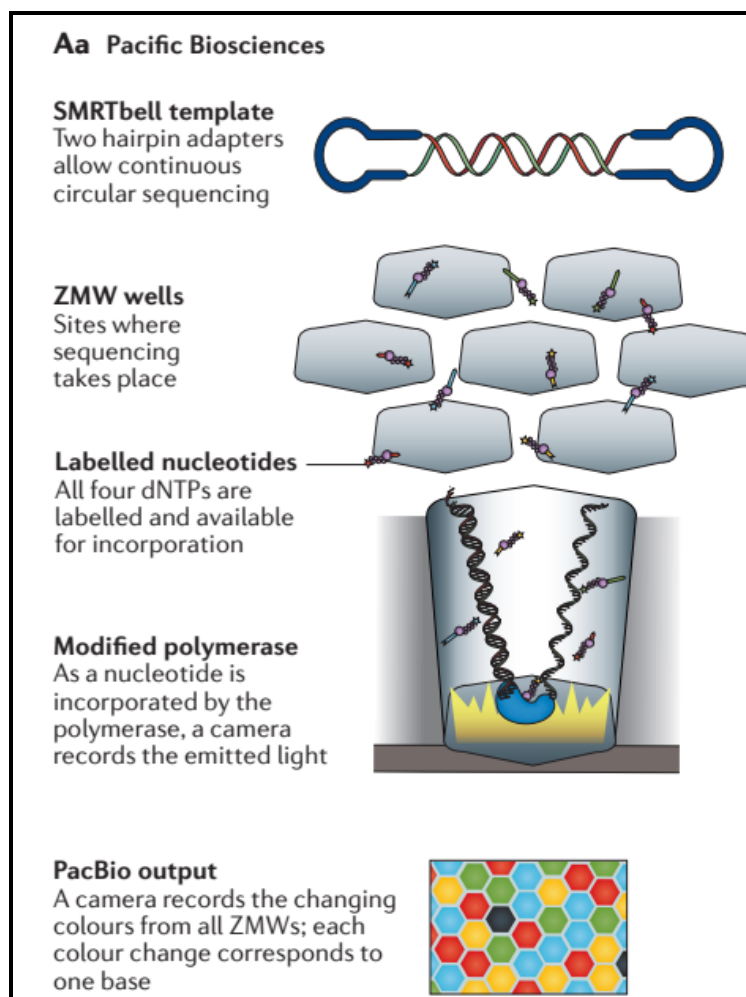
Avec une meilleure compréhension de la pathologie moléculaire, il est désormais clair que les génomes sont extrêmement complexes et contiennent de nombreux éléments répétitifs de grande taille. Toutefois, de nombreux de ces éléments complexes sont tellement longs que les technologies de séquençage de seconde génération ne sont pas toujours capables de les

détecter. Le séquençage à longue lecture fournit des lectures de plusieurs kilobases, permettant de résoudre ces grandes caractéristiques structurales.[37]

On décrit 2 principales plateformes de séquençage de troisième génération :

a) **Séquençage par la plateforme PacBio :**

Actuellement, la plateforme de lecture longue la plus largement utilisée est l'approche de séquençage en temps réel d'une seule molécule (SMRT) utilisée par Pacific Biosciences (PacBio) [40]. L'instrument utilise une cellule d'écoulement spécialisée avec plusieurs milliers de puits de picolitres individuels avec des fonds transparents appelés « ZMW ». Dans ce système, la polymérase au fond et permet au brin d'ADN de progresser à travers le ZMW. En ayant un lieu d'incorporation constant grâce à l'enzyme stationnaire, le système peut se concentrer sur une seule molécule. L'incorporation sur chaque modèle de molécule unique par puits est visualisée en continu avec un système laser et caméra qui enregistre la couleur et la durée de la lumière émise lorsque le nucléotide marqué s'arrête momentanément pendant l'incorporation au fond du ZMW.[37]



**Figure 41** : Image récapitulative de la plateforme Pac Bio[37]

**b) Séquençage par ligation par la plateforme Oxford Nanopore Technologies (ONT) :**

Contrairement à d'autres plates-formes, les séquenceurs de nanopores ne surveillent pas les incorporations ou les hybridations de nucléotides guidés par un brin d'ADN matrice. Alors que d'autres plates-formes utilisent un signal secondaire, la lumière, la couleur ou le pH, les séquenceurs à nanopores détectent directement la composition de l'ADN d'une molécule d'ADN en cours de formation. Pour réaliser le séquençage, l'ADN est passé à travers un pore de protéine lorsque le courant passe à travers le pore. Au fur et à mesure que l'ADN se transloque sous l'action d'une protéine motrice secondaire, il se produit un blocage de tension qui module le courant passant à travers le pore. Le tracé temporel de ces charges est appelé espace ondulé

et les décalages de tension sont caractéristiques de la séquence d'ADN particulière dans le pore, qui peut alors être interprétée comme un k-mer. Le terme k-mer fait généralement référence à toutes les sous-chaînes de longueur k qui sont contenues dans une chaîne de caractère. En génomique computationnelle, les k-mers font référence à toutes les sous-séquences (de longueur k) à partir d'une lecture obtenue par séquençage de l'ADN.

La dernière plateforme de la marque Oxford est une plate-forme à très haut débit qui comprend 48 cellules de flux individuelles, chacune avec 3 000 pores en cours d'exécution à 500 pb par seconde. Cela équivaut à ~ 2 à 4 To pour une exécution de 2 jours sur un appareil entièrement chargé.[37]

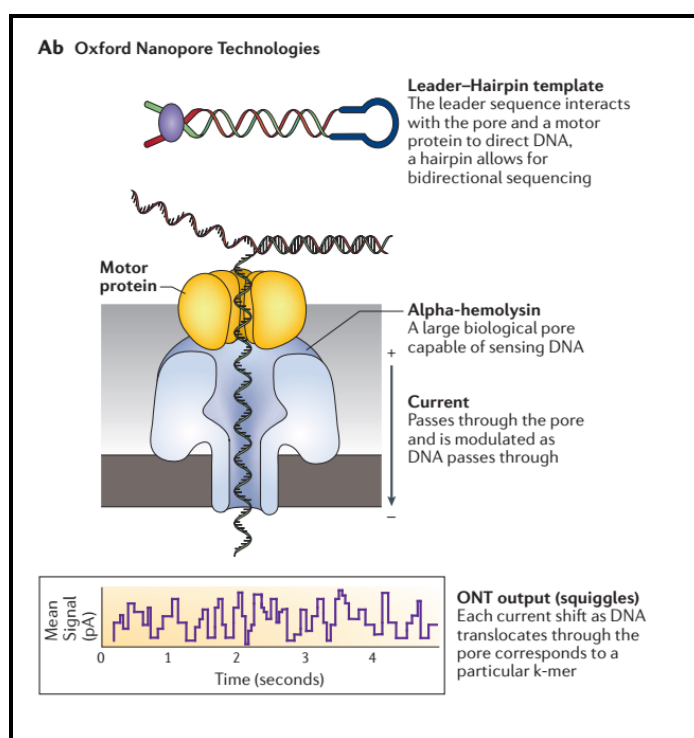


Figure 42 : Image récapitulative de la plateforme Oxford Nanopore Technologies[37]



**Tableau IV :** Tableau récapitulatif des caractéristiques de différentes plateformes de séquençage.

[28]

Platform	Method of Sequencing	Pros	Cons
Illumina	Sequencing by synthesis—cyclic reversible termination technology Paired end sequencing	High throughput, low cost per Gb data. High accuracy	Short read length, high instrument cost
Ion Torrent	Ion semiconductor sequencing technology	Low instrumental and operational cost. Short execution time. Simple machine	High error rate. Intermediate cost per Gb data. More hands-on time
Pacific Bioscience	Single-molecule real-time long-read sequencing	Longest reading length available. Short instrument execution time	High error rate. High cost per Gb data. Many methods are still under development
Oxford Nanopore	Single-molecule real-time long read sequencing	Small, portable and low cost instrument	High error rate. Biased errors. High cost per reading
Complete Genomics BGI	Sequencing by ligation DNA nanoball sequencing mate pair library	Low cost per run, short execution time, large amount of data, error rates low	Short read length
Gene Reader (Qiagen)	Sequencing by synthesis, single nucleotide addition	High throughput, reduced manual intervention, complete solution from extraction to data analysis	Closed system, high cost

**Tableau V:** Tableau comparatif entre les différentes techniques de séquençage de nouvelle génération.[41]

**Table 1.** Comparison of different NGS platforms: Illumina MiSeq, Illumina HiSeq 2000, Ion Torrent PGM, PacBio SMRT and Oxford Nanopore MinION.

	<b>Illumina MiSeq</b>	<b>Illumina HiSeq 2000</b>	<b>Ion Torrent PGM</b>	<b>PacBio SMRT</b>	<b>Oxford Nanopore MinION</b>
Read Length	Up to 150 bases	Up to 150 bases	~200 bases	Average 1500 bases	13–20 kb
Paired-End	Yes	Yes	Yes	No	No
Reported Accuracy	Mostly >Q30	Mostly >Q30	Mostly Q20	<Q10	Mostly Q50
Observed Raw Error Rate	0.80%	0.26%	1.71%	12.86%	10.50%
Insert Size	Up to 700 bases	Up to 700 bases	Up to 250 bases	Up to 10 kb	Average of 331 bases
Run Time	27 h	11 days	2 h	2 h	72 h

### **2.3 L'appréciation de la qualité des données du séquençage :**

Deux critères fondamentaux permettant d'évaluer la qualité des données de séquençage NGS :

- La profondeur de séquençage, mesurée par le nombre de lectures (ou reads) obtenues pour chaque base ciblée, est exprimée en nombre de fois (X). Par exemple, une profondeur de 100X indique que la base ou la région considérée a été séquencée de manière indépendante 100 fois. Pour détecter des variants à l'état hétérozygote avec une qualité satisfaisante, l'ESHG recommande une profondeur minimale de 20X pour une analyse précise.[42], [43]
- La couverture est le pourcentage de bases effectivement séquencées par rapport au nombre total de bases ciblées. Elle donne une indication de la qualité globale de l'analyse. Pour obtenir des résultats fiables, il est recommandé d'avoir une profondeur de séquençage minimale de 20X avec une couverture de 100 %, c'est-à-dire que chaque base de la région ciblée doit être séquencée au moins 20 fois de manière indépendante.[43]

### **3. Stratégie (ou workflow) de mise en évidence des biomarqueurs en médecine de précision en 2022 :**

Il existe plusieurs approches pour répondre à une demande d'analyse moléculaire, ce qui rend la prise en charge non-uniforme. Le pathologiste doit sélectionner la méthode diagnostique la plus adaptée à chaque situation particulière, ce qui nécessite une évaluation au cas par cas.

#### **3.1 Plusieurs approches de détection des biomarqueurs sont utilisées :**

▪ **Hostspot testing** : Cette méthode se focalise sur des zones particulières du génome qui ont été identifiées comme étant cruciales ou essentielles pour le développement de la maladie ou pour la réponse à un traitement.

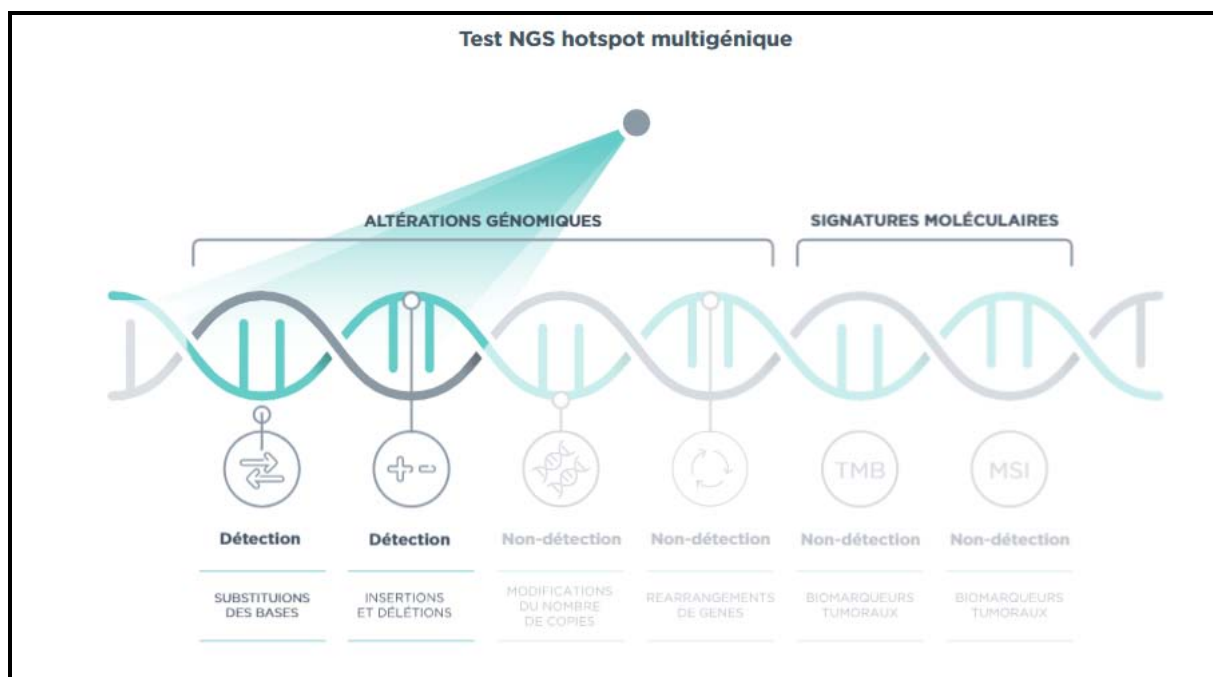


Figure 43: Illustration de l'approche Hotspot [44]

▪ **Profilage génomique large (panels) :** Par ce procédé, le séquenceur NGS va permettre le sondage d'un large éventail de gènes afin d'identifier des altérations génomiques exploitables en oncologie.

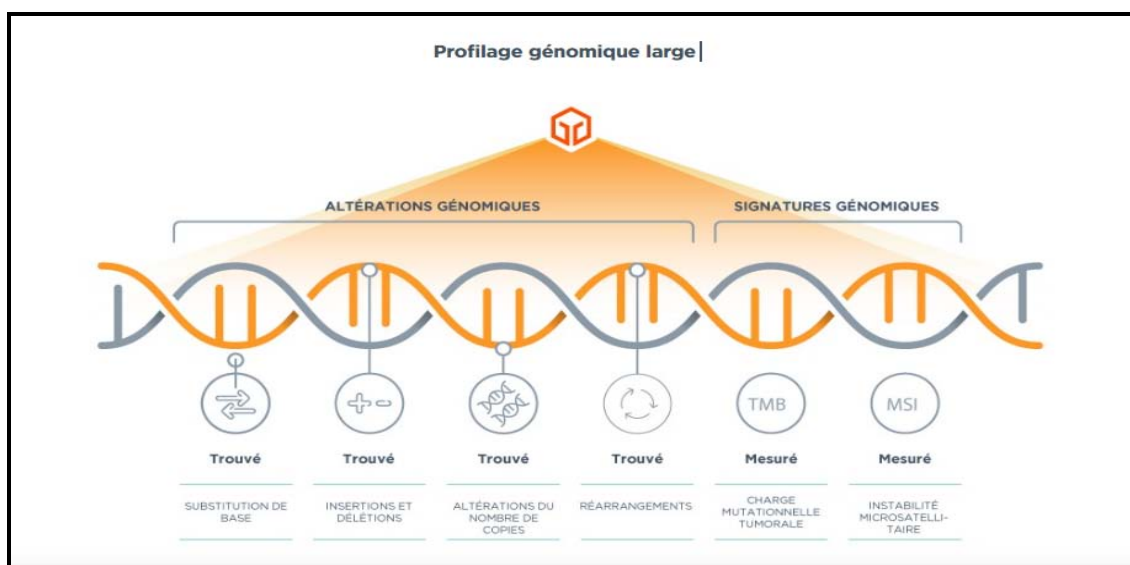
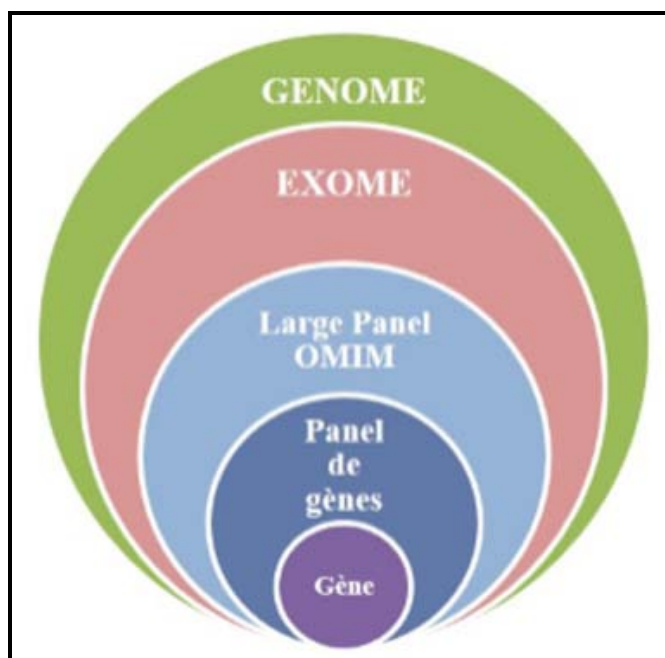


Figure 44 : Illustration de l'approche du profilage génomique large[44]

- **Whole Genome Sequencing (WGS)** : séquençage de tout l'ADN du génome
- **Whole Exome Sequencing (WES)** : séquençage sélectif des exons (régions codantes)
- **Whole Transcriptome Sequencing (WTS)** : séquençage des régions non codantes de l'ARN associées aux processus de carcinogénèse

Les trois méthodes précédemment mentionnées sont moins répandues et exigent des capacités de stockage et d'outils bio-informatiques plus avancées.[45] De plus, les altérations identifiées peuvent ne pas être pertinentes sur le plan clinique ou ne pas pouvoir être utilisées.[46]-[48]



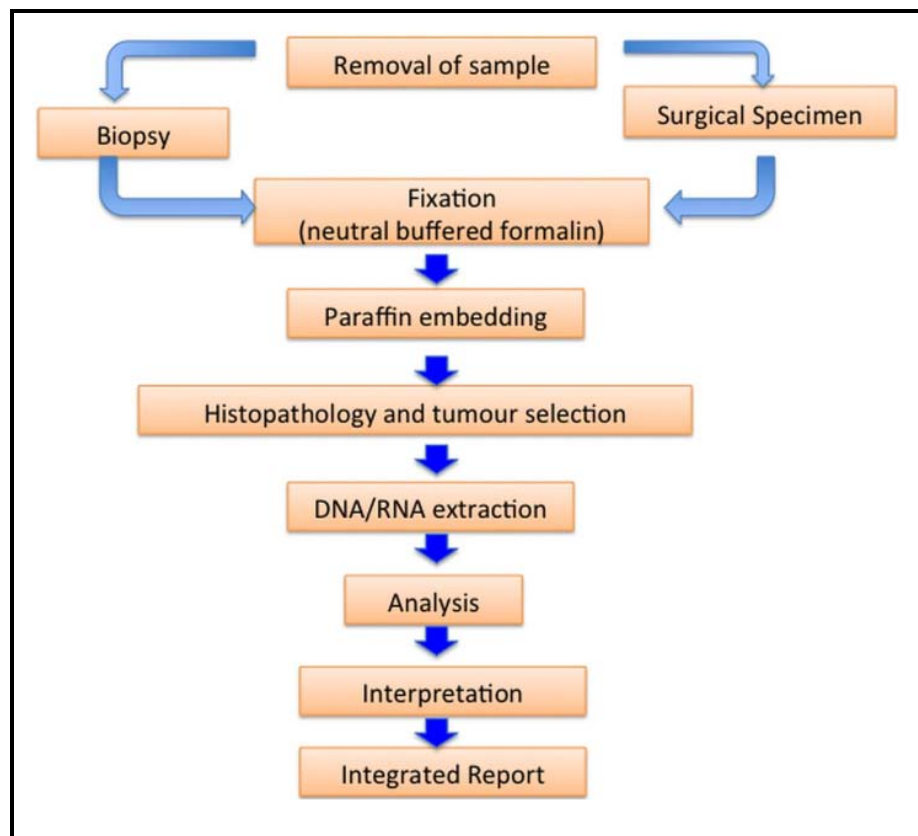
**Figure 45** : Différents niveaux d'approche du séquençage moléculaire [43]

### 3.2 L'approche morpho-moléculaire intégrative en médecine de précision :

Malgré les avancées de la biologie moléculaire, la morphologie reste essentielle dans la prise en charge des patients. En fait, la morphologie est devenue encore plus cruciale non seulement pour diagnostiquer la maladie, mais également pour garantir des tests moléculaires de haute qualité. [49]

Un examen morphologique rigoureux pré-analyse moléculaire est nécessaire pour : [50]-  
[52]

1. Confirmer le sous-type histologique de la lésion.
2. Vérifier que l'échantillon est représentatif.
3. Sélectionner la zone avec le rapport le plus élevé de cellules malignes.
4. Choisir l'analyse moléculaire la plus efficace et la plus rentable.
5. Identifier la présence d'artefacts dus à des erreurs pré-analytiques.
6. Evaluer l'hétérogénéité intra-tumorale pouvant introduire des biais moléculaires. [50]-  
[52]



**Figure 46 :** Flowchart en pathologie moléculaire du prélèvement à l'émission du rapport de séquençage[53]

### III. Principales recommandations du séquençage NGS en 2022

#### 1. Recommandations techniques :

De nombreux travaux se sont intéressés aux conditions optimales pour un examen de pathologie moléculaire. Ils ont conduit à l'élaboration de plusieurs recommandations de prise en charge des prélèvements en pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

##### 1.1 En pré-analytique :

Le laboratoire de pathologie doit être en mesure de traiter de multiples types d'échantillons. Bien que de nombreux problèmes soient communs à tous les tests de diagnostic, ceci est encore plus critique lorsque les besoins de l'analyse moléculaire sont inclus dans une approche de diagnostic. [53]

##### a) Identification et étiquetage du prélèvement :

Il existe un risque d'erreur d'identification des échantillons, et une attention particulière doit être accordée à ce danger. Il incombe à la personne qui prélève l'échantillon d'identifier le patient, l'échantillon requis, de s'assurer que l'échantillon est correctement étiqueté, fixé dans du formol (si nécessaire) et/ou envoyé au laboratoire à l'état frais. [53]

Un minimum de 4 identifiants est nécessaire :

- Le prénom,
- Le nom,
- La date de naissance,
- Le code d'identification de l'hôpital

##### b) Prise en charge des échantillons Tissulaires :

Les problèmes pré-analytiques en pathologie moléculaire commencent au bloc opératoire : lors d'une intervention chirurgicale, les vaisseaux sanguins sont clampés afin d'éviter les saignements. Cette procédure détermine une ischémie chaude (ainsi définie car elle se produit

à la température du corps). Après l'exérèse, lorsque la pièce chirurgicale est à température ambiante ou sur glace, et jusqu'à la fixation complète, le tissu subit une ischémie froide [54].

L'ischémie froide représente l'écueil majeur en pathologie moléculaire. Elle se produit dès le retrait du tissu du corps pour les grands spécimens chirurgicaux. Un intervalle de temps prolongé entre la ligature des vaisseaux sanguins au bloc opératoire et la fixation ou la congélation des tissus peut provoquer des altérations quantitatives et qualitatives de l'acide nucléique, en particulier de l'ARN.[55]. En fait, l'ischémie peut entraîner une transcription accrue ou réduite de certains gènes, modifiant les niveaux d'ARN, même après un court intervalle (30 min ou moins) [56].

Lorsque l'analyse moléculaire concerne des échantillons frais de tumeur, la prise en charge doit être effectuée au laboratoire de pathologie, immédiatement, après la réception du prélèvement du bloc opératoire selon des protocoles définis. Ceci suggère la nécessaire proximité du laboratoire du site opératoire.

La fixation du prélèvement est nécessaire dans les cas de non prise en charge à l'état frais. Le formol ne pénètre le tissu qu'à environ 1 mm/h.

La majorité des biopsies diagnostiques sont de petite taille et sont fixées rapidement lorsqu'elles sont placées dans du formol tamponné neutre à 4. Par contre, les spécimens chirurgicaux sont plus volumineux, nécessitant une fixation contrôlée et rigoureuse. [57], [58]. Il est, hautement souhaitable, d'inciser les grandes masses pour permettre la pénétration du fixateur.

Le formol à utiliser ne doit être utilisée que 24 h après dilution à 4% p/v, afin de réduire l'effet de la polymérisation, et d'assurer une concentration stable de 4 %.[55]

La fixation au formol est, ainsi, l'étape la plus critique de la phase pré-analytique. Un temps de fixation adéquat est d'une importance capitale afin de préserver, autant que possible,

l'intégrité des acides nucléiques. Un temps plus court peut conduire à une fixation incomplète et engendrer la dégradation enzymatique du tissu, conduisant à une morphologie sous optimale. De même, un temps de fixation plus long peut entraîner une extraction plus difficile de l'ADN et de l'ARN [59], altérer les acides nucléiques et causer des ruptures de brins et des pertes de bases.

Enfin, l'emballage sous vide des tissus avec transfert au laboratoire à 4°C (Tissue Safe) peut être une option pour la prise en charge des échantillons pour les sites éloignés du laboratoire de l'hôpital. [60]

Quelques études ont constaté que l'ADN extrait d'échantillons de tissus FFPE des échantillons de tissus de spécimens chirurgicaux de plus de 7 ans ne pouvait pas être analysé par NGS.[61], [62]

**c) Prise en charge des échantillons cytologiques :**

Les échantillons de cytologie doivent également être manipulés selon des procédures opératoires normalisées définies. Dans certains centres, les pathologistes sont impliqués dans la réalisation de l'aspiration à l'aiguille fine, ce qui facilite la manipulation l'échantillon. La fixation se fait généralement dans un fixateur alcoolique, qui préserve les acides nucléiques relativement intacts.

Cela rend ces échantillons pour la plupart des analyses moléculaires, bien que certains problèmes ont été constatés dans les tests du virus du papillome humain (VPH) et du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).[63][64][65][66]

Il existe différents types de préparations cytologiques, comme les frottis directs, les préparations de cyospin, les échantillons cytologiques en milieu liquide et les blocs cellulaires FFPE. Même si elle peut varier d'une institution à l'autre, la procédure d'obtention d'un bloc cellulaire est similaire au traitement pathologique chirurgical typique, et elle implique généralement la fixation et l'inclusion en paraffine. [41]



Un avantage important des blocs cellulaires est qu'ils permettent au pathologiste de sélectionner le matériel pour l'analyse moléculaire. Le plus grand inconvénient est l'incapacité de les évaluer immédiatement pour savoir si elles sont adéquates. Un autre inconvénient est que les processus de fixation et d'inclusion sont associés à une détérioration des cellules nucléiques.

Un problème important avec les spécimens cytologiques est que les tests NGS ont généralement été désignés et validés uniquement sur des biopsies FFPE. Parmi les problèmes pré-analytiques du NGS basé sur la cytologie, il y a la cellularité de l'échantillon et la fraction tumorale.[41] La cellularité dépend principalement de la qualité de la procédure d'obtention de l'échantillon cytologique et des caractéristiques de la tumeur. Le seuil cellulaire minimum requis pour une analyse NGS dépend à la fois de la capture de la cible et de la plateforme utilisée. [67] Par exemple, Illumina NGS nécessite environ 15 000 cellules après une capture par hybridation, tandis que le NGS d'Ion Torrent nécessiterait entre 100 et 1 000 cellules [68], [69]

**d) Prise en charge des échantillons de biopsie liquide :**

Concernant les échantillons de biopsie liquide, les prélèvements doivent être recueillis dans des tubes à EDTA ou des tubes spéciaux fournis par les fabricants. En général, les échantillons de biopsie liquide pour le NGS peuvent être conservés à court terme à température ambiante ou à 4°C pendant quelques jours. Pour une conservation à plus long terme, il est recommandé de stocker les échantillons à -20°C ou -80°C, ce qui peut permettre une conservation de plusieurs mois à plusieurs années. Cependant, il est important de noter que la qualité de l'ADN extrait à partir de ces échantillons peut diminuer avec le temps.[70]

**Tableau N° VI : Recommandations pour un séquençage NGS en pré-analytique.**

**Recommandation 1 :** Identifier le patient et étiqueter l'échantillon à l'aide de quatre identifiants (par exemple, prénom, nom, date de naissance, code d'identification de l'hôpital).

**Recommandation 2 :** Préciser le type et l'origine du spécimen.

**Recommandation 3 :** Choisir un type de conteneur adéquat. L'utilisation de diagrammes et des check-lists de contrôle dans les salles d'opération peuvent aider à garantir une utilisation correcte.

**Recommandation 4 :** Veiller au respect et le contrôle du temps et de température qui doit être à 4°C

**Recommandation 5 :** Respecter les exigences de fixation au formol tamponné neutre à 4%

**Recommandation 6 :** Procéder à l'Incision des grandes masses, en respectant les marges de résection pour permettre la pénétration du formol.

**Recommandation 7 :** L'utilisation des tubes EDTA pour les échantillons de biopsie liquide, pour préserver l'ARN.

## 1.2 En analytique :

### a) La réception et manipulation des échantillons :

Un processus dédié à la réception des échantillons doit-être instauré. Le laboratoire doit être doté d'un personnel bien formé. L'attribution d'un numéro d'enregistrement propre à chaque prélèvement est de la plus grande importance.[71]-[73]

### b) Le système d'information :

L'utilisation d'un système d'information de gestion de laboratoire (LIMS) est devenue une nécessité permettant l'utilisation d'une identification par un code barre des échantillons. Tous les échantillons doivent être suivis depuis le patient jusqu'au rapport final.[74]

### c) Le temps de prise en charge du prélèvement :

Le traitement de l'échantillon doit commencer dès que possible (idéalement dans les 30 minutes) après l'arrivée du prélèvement. L'heure du prélèvement doit être indiquée sur les

tubes et les flacons. Le temps écoulé entre le prélèvement et le traitement doit être enregistré.  
[53]

**d) La macroscopie :**

Les échantillons tissulaires passent par un examen macroscopique et une étape de coupe. Les échantillons sont prélevés et placés dans des cassettes plastiques à code-barres et/ou numérotées.

La décalcification est nécessaire pour les fragments osseux. Ce processus réduit, malheureusement, les chances de récupération de l'ADN et surtout de l'ARN. Il faut éviter, au maximum, l'utilisation des fragments décalcifiés pour une analyse moléculaire.[73]

**e) Choix du fragment tumoral :**

Lors du choix du fragment tumoral, il est recommandé que le pathologiste marque la zone de la section contenant le néoplasme sur la lame H&E au moment du diagnostic. La récupération de ce fragment tumoral se fera par macro-dissection, microdissection ou raclage. Lorsque les zones concernées sont dispersées et de petites tailles, il peut être nécessaire de marquer plusieurs zones pour la microdissection manuelle afin de tenir compte de l'hétérogénéité du contenu cellulaire. [75]

Le pathologiste doit estimer le pourcentage de cellules néoplasiques présentes dans l'échantillon sélectionné pour l'extraction de l'ADN/ARN. Cette estimation est importante pour déterminer le succès ou l'échec des tests ultérieurs car elle définit la limite inférieure de détection. [76]

**f) L'extraction d'ADN et d'ARN :**

L'extraction optimale des acides nucléiques est la clé principale pour obtenir des résultats de séquençage réussis. Des directives énumérant le protocole de validation, ainsi que la liste des différents échantillons et des méthodes d'extraction approuvées et validées pour les tests NGS sont disponibles.[77],[78]

Pour une manipulation réussie, 50 à 60 ng d'ADN/ARN de bonne qualité sont nécessaires. comme matériaux de départ.[79]. Certains séquenceurs peuvent requérir, moins, de quantité d'ADN pour l'analyse.

L'extraction d'acides nucléiques pour un usage clinique nécessite des réactifs de qualité contrôlée, idéalement marqués IVD CE Le choix de la méthode à utiliser doit prendre en compte le débit, la qualité et la quantité requise d'ADN ou d'ARN et des méthodes d'analyse prévues.

Les méthodes automatisées sont utiles car elles permettent d'économiser le temps du personnel et d'éviter les erreurs d'identification des échantillons.

Le stockage de l'ADN et de l'ARN doit être soigneusement contrôlé.

Des registres d'accès et un étiquetage des flacons à code-barres sont utiles pour éviter les erreurs d'identification des échantillons.

**g) Les problèmes analytiques dans NGS :**

Les facteurs de confusion analytiques les plus courants dans le NGS incluent les substitutions C:G > T:A lors de l'amplification, résultant de la désamination des bases de la cytosine. La désamination de la cytosine est un phénomène fréquent dans la nature, et des systèmes spécifiques de réparation de l'ADN existent pour corriger cette altération [80].

Un autre problème analytique important se produit lors de l'utilisation de NGS basé sur la PCR multiplex. Il s'agit du désamorçage d'amplicon, qui peut conduire à la détection de mutations faussement positives. Généralement, les faux positifs dus à un mauvais amorçage sont facilement identifiés par une bonne analyse bioinformatique [81].

**Tableau N° VII : Recommandations pour un séquençage NGS en analytique**

**Recommandation 8 :** Eviter d'utiliser les échantillons tissulaires fixés qui ont été préalablement congelés.

**Recommandation 9 :** Marquer les zones de section contenant le néoplasme sur la lame H&E.

**Recommandation 10 :** Estimer le pourcentage des cellules néoplasiques présentes dans chaque échantillon.

**Recommandation 11 :** Prendre en charge l'échantillon dès que possible (idéalement dans les 30 minutes) après le prélèvement.

**Recommandation 12 :** Indiquer sur le tube le temps écoulé entre le prélèvement et sa prise en charge.

**Recommandation 13 :** Réaliser de coupes colorées coupées dans des blocs de paraffine à 4-6 µm.

**Recommandation 14 :** Remplacer les lames régulièrement, idéalement avant de couper chaque nouveau FFPE, pour éviter la contamination des échantillons.

**Recommandation 15 :** Séparer pour les prélèvements cytologiques les cellules du plasma par centrifugation à 1000-2000 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée.

**Recommandation 16 :** Stocker les échantillons d'ADN et d'ARN extraits, clairement étiquetés, à -20°C ou -80°C.

**Recommandation 17 :** Conserver les produits PCR dans un congélateur séparé à -20°C ou -80°C.

**Recommandation 18 :** Stocker les bibliothèques de séquençage dans un congélateur séparé à -20°C ou à -80°C.

**Recommandation 19 :** Adopter des normes strictes d'assurance qualité en termes de traçabilité des échantillons, validation des techniques et de l'analyse bio-informatique.

### 1.3 En post-analytique :

#### a) L'analyse bio-informatique :

L'analyse des données NGS doit être effectuée à l'aide de pipelines bioinformatiques robustes. Un pipeline bioinformatique consiste en un large éventail de différents types d'algorithmes logiciels qui traitent les données brutes générées et fournissent une liste de variantes des séquences qui sont annotées[78],[82].

L'identification des véritables altérations et variantes génétiques, le traitement des données brutes et l'alignement de base, ainsi que l'annotation des variations génétiques identifiées dans le test, jouent un rôle majeur dans l'élaboration de solutions de diagnostic à l'aide du test NGS.[28]

Cette étape est présidée par l'alignement des lectures de la séquence à un génome de référence. En général, pour le séquençage basé sur un panel, les régions ciblées d'intérêt dans le génome sont spécifiées pour l'alignement, ce qui simplifie le processus.[28]

Cependant, il est extrêmement important pour les laboratoires offrant des diagnostics basés sur le NGS de faire valider le pipeline bioinformatique conformément aux lignes directrices recommandées. [82]

La validation du pipeline bioinformatique devrait être précise et facilement utilisable pour l'utilisation clinique et le spécimen, et les types de variantes qui ont été conçus pour être détectés par le test.[77],[78],[82] Les données bioinformatiques NGS ne doivent être analysées et interprétées que par un professionnel de la santé qualifié, après avoir obtenu une formation et une certification appropriées.[28]

#### b) Le rapport de séquençage NGS :

Une fois les données analysées, la publication du rapport est une étape importante. Le format du rapport doit être statique et la date de publication du rapport doit être explicitement mentionnée. Le rapport doit clairement mentionner le panel de gènes utilisé, les détails pré- et

post-analytiques, la méthodologie utilisée et les paramètres de performance (limite de détection du test, limitation du test, couverture de profondeur de séquençage et annotations utilisées) [28]

Le rapport d'anatomopathologie doit transmettre avec précision les informations dont le clinicien a besoin pour traiter le patient sur lequel le test a été réalisé, avec suffisamment d'informations. La clé est donc une communication précise.

Divers organismes ont défini ce qui doit figurer dans un rapport de pathologie moléculaire.[83]. La Commission on Cancer (ACS-CoC), de concert avec le CAP, a élaboré des listes de contrôle contenant tous les éléments nécessaires à l'élaboration d'un rapport de pathologie moléculaire. Ce document contient tous les éléments validés scientifiquement qui doivent être rapportés pour les spécimens de cancer.[84] La société européenne de pathologie a produit des directives pour ces rapports, ce qui déterminera la réponse des laboratoires.

Des systèmes d'évaluation externe de la qualité de la pathologie moléculaire dans toute l'Europe notent le rapport ainsi que le résultat du test, aident à guider et à éduquer les laboratoires sur ce qui doit être inclus dans un rapport. [85] Les laboratoires européens sont, généralement, tenus d'être accrédités.

Les 4 zones clés qui doivent être présentes dans les rapports sont les suivantes :

➤ **Identification du patient :**

Le patient doit être identifié correctement. Les laboratoires exigent un minimum de deux identifiants uniques du patient et un identifiant unique de l'échantillon sur le formulaire de demande et le rapport.

En général, le rapport devra contenir les éléments suivants : [53]

- Le nom du patient (nom de famille),
- Le prénom

- La date de naissance,
- Le service référent
- Son médecin traitant
- L'hôpital (le cas échéant)
- La date de la biopsie

➤ **Style et contenu du rapport : [53]**

Les rapports longs sont rarement lus en entier. Les rapports d'une page ou, mieux encore, d'un seul écran sont préférables, à condition qu'ils soient lisibles. Si les rapports font plus d'une page, chaque page doit comporter des identifiants de patients appropriés afin d'être relié au bon patient, et les pages doivent être numérotées, c'est-à-dire la page 1 sur 3, afin que le lecteur du rapport sache s'il manque des pages.

La présentation des résultats doit être claire du ou des tests réalisés ainsi que les limites éventuelles des tests (par exemple, toutes les mutations possibles ont-elles été testées, ou seulement une sélection des plus courantes ?).

Le nom de la personne responsable de l'analyse et ses coordonnées sont importants, avec la date de réalisation.

Dans plusieurs pays européens ; et en raison des réglementations légales en vigueur, le pathologiste est responsable du rapport combiné "rapport morphologique-moléculaire". Il doit être clairement identifiable.

➤ **Interprétation : [53]**

Le résultat de l'examen doit être correctement rapporté et une interprétation doit être fournie, en particulier lorsqu'il s'agit d'une décision de traitement.

Les résultats du génotypage doivent être donnés conformément à la nomenclature standard avec une référence appropriée aux résultats du test. Les systèmes externes



d'assurance de la qualité exigent que les laboratoires doivent fournir une interprétation précise du ou des résultats obtenus et qu'ils incluent tout conseil pertinent.

Il faut veiller à ce que ces conseils soient aussi à jour autant que possible, compte tenu de l'essor des tests de diagnostic compagnons en pathologie moléculaires,

Le type et l'étendue de l'analyse moléculaire utilisée doivent clairement être décrits pour permettre aux oncologues de demander d'autres tests si la situation clinique le justifie.

➤ **Rapports intégrés : [53]**

La nécessité d'un rapport intégré des résultats est largement reconnue, et à mesure que l'introduction des tests de panel de gènes se répand, les résultats des différents tests génétiques devraient être rapportés sur un seul rapport. De même, les résultats de plusieurs pathologies sur des patients individuels doivent être intégrés dans le même rapport.

Par exemple, un patient présentant une pathologie X peut avoir une biopsie et un échantillon sanguin fournissant des rapports d'histopathologie, de microbiologie, d'immunologie, pathologie moléculaire, hématologie et biochimie. Le clinicien traitant le patient doit les intégrer aux examens radiologiques et cliniques pour prendre les meilleures décisions.

Bien qu'il soit utile d'avoir tous les résultats pathologiques dans un seul rapport, tous les pays ne disposent pas de services de pathologie intégrés. Les différences de délais et de systèmes d'établissement des rapports peuvent également rendre cet objectif très difficile à atteindre. La meilleure solution semble être un système de rapport combiné ou un dossier électronique du patient, qui permet au clinicien ou à l'équipe pluridisciplinaire de déterminer s'ils disposent de tous les éléments nécessaires à la prise de décision.[53]

**Tableau VIII : Les exigences minimales en matière de contenu dans un rapport NGS.[27]**

<b>Table 3. The NGS report: minimal content requirements</b>	
Laboratory/patient/sample identifier	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patient's name, date of birth, sex</li> <li>• ID number</li> <li>• Date specimen collected</li> <li>• Date specimen received</li> <li>• Date results reported</li> <li>• Ordering physician</li> <li>• Laboratory name</li> </ul>
Specimen used for NGS testing	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Specimen type (FFPE, frozen tissue, liquid biopsy)</li> <li>• in case of tumor tissue:               <ul style="list-style-type: none"> <li>o Tissue information with diagnosis</li> <li>o Tumor cell content</li> </ul> </li> </ul>
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Results with test name</li> <li>• Range</li> <li>• Use standard gene nomenclature</li> <li>• For variants also VAF (variant allele frequency)</li> </ul>
Methodology/procedure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Target description</li> <li>• Specimen-enrichment method</li> <li>• Limit of detection</li> <li>• Additional assay limitations</li> </ul>
Procedure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type of procedure (e.g. NGS)</li> <li>• Defined target (e.g. name of target tested such as gene, locus, or genetic defect; use HUGO-approved gene nomenclature, HGVS nomenclature)</li> <li>• Analytic interpretative comment</li> <li>• Clinical interpretative comment</li> <li>• Pathologist/designee signature</li> <li>• LDT reporting language</li> <li>• ASR language</li> </ul>
Comments	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Significance of the result in general or in relation to this patient</li> <li>• Correlate with prior test results</li> <li>• Recommend additional measures (further testing, genetic counseling)</li> <li>• Condition of specimen that may limit adequacy of testing</li> <li>• Pertinent assay performance characteristics or interfering substances</li> <li>• Cite peer-reviewed medical literature or reliable web sites on the assay and its clinical utility</li> <li>• Document intradepartmental consultation</li> <li>• Document to whom preliminary results, verbal results, or critical values were reported and when</li> <li>• Incorporate information specifically requested on requisition</li> <li>• Answer specific questions posed by the requesting clinician</li> <li>• Reason specimen rejected or not processed to completion</li> <li>• If the report is an amended or addendum report, describe the changes or updates</li> <li>• Describe discrepancies between preliminary and final reports</li> <li>• Name of testing laboratory, if transmitting or summarizing a referral laboratory's results</li> </ul>

**Tableau IX :** exemple de rapport NGS des coréens.[27]

Table 5. Sample report				
Patient XY, DOB 01.01.1950, male				
Date of report: 07.12.2021				
Ordered by: Doctor X				
Specimen used for NGS testing				
Sample ID: B2020.24987				
Sample received: 01.01.2020				
Specimen type: Biopsy specimen				
Diagnosis: Poorly differentiated lung adenocarcinoma				
Tumor cell content: 70%				
Gene Variant	Reference sequence	VAF (%)	OncoKB level/ ESCAT	Drug
EGFR P.L858R (c.2573T>G)	NM_005228.4	69	1/Tier I	Afatinib, dacomatinib, erlotinib, gefitinib, osimertinib
EGFR P.T790M (c.2369C>T)	NM_005228.4	38	1/Tier I	Osimertinib
			R1/Tier I	Afatinib, erlotinib, gefitinib
MET Amplification (copy number: 17)			2/Tier I	Crizotinib
<b>Methodology</b>				
Test material: Tumor DNA/RNA				
Gene panel: Oncomine™				
Comprehensive Assay v3 (ThermoFisher) (see detailed list gene).				
Instrument: Ion Torrent S5 platform (ThermoFisher).				
Data analysis: Ion Reporter Software (Filter: Oncomine Variants, 5% CI, CNV ploidy ≥ gain of 2 over normal).				
Reference genome: GRCh37 (hg19).				
Databases used for variant annotation: dsSNP, 1000 Genomes, ClinVar, COSMIC, OncoKB. Reporting: Limited to genomic alterations with level 1, 2, or R1 evidence according to OncoKB and ESCAT Therapeutic Levels of Evidence V2 classification at the time of reporting.				
<b>Gene list</b>				
Sequence variants (hotspot regions): AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AR, ARAF, AXL, BRAF, BTK, CBL, CCND1, CDK4, CDK6, CHEK2, CSF1R, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, ERCC2, ESR1, EZH2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, FOXL2, GATA2, GNA11, GNAQ, H3F3A, HIST1H3B, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KNSTRN, KRAS, MAGOH, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAPK1, MAX, MDM2, MED12, MET, MTOR, MYC, MYCN, MYD88, NFE2L2, NRAS, NTRK1, NTRK2, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3CB, PPP2R1A, PTPN11, RAC1, RAF1, RET, RHEB, RHOA, ROS1, SF3B1, SMAD4, SMO, SPOP, SRC, STAT3, TERT, TOP1, U2AF1, XPO1.				
Sequence variants (all coding regions): ARID1A, ATM, ATR, ATRX, BAP1, BRCA1, BRCA2, CDK12, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CHEK1, CREBBP, FANCA, FANCD2, FANCI, FBXW7, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, NF1, NF2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, PALB2, PIK3R1, PMS2, POLE, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RB1, RNF43, SETD2, SLX4, SMARCA4, SMARCB1, STK11, TP53, TSC1, TSC2.				
Copy number alterations (amplification): AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AR, AXL, BRAF, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2B, EGFR, ERBB2 (HER2), ESR1, FGF19, FGF3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, IGF1R, KIT, KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYC, MYCL, MYCN, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3CB, PPARG, RICTOR, TERT, TSC1, TSC2.				
Fusion transcripts: AKT2, ALK, AR, AXL, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, EGFR, ERBB2, ERBB4, ERG, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGR, FLT3, JAK2, KRAS, MDM4, MET, MYB, MYBL1, NF1, NOTCH1, NOTCH2, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PRKACA, PRKACB, PPARG, PTEN, RAD51B, RAF1, RB1, RELA, RET, ROS1, RSPO2, RSPO3, TERT.				

CI, confidence interval; CNV, copy number variant; COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer; dsSNP, ; ESCAT, ESMO scale of clinical actionability for molecular targets; NGS, next-generation sequencing; VAF, variant allele frequency.

#### 1.4 La réunion de concertation pluridisciplinaire ( Tumor board ) :

L'arrivée du NGS en clinique a révolutionné la médecine de précision, surtout en oncologie. Cependant, l'interprétation des données moléculaires, l'association du patient au bon traitement ou à un essai clinique et la prise en compte de la résistance primaire ou acquise aux médicaments restent un défi. Ainsi, la complexité croissante de la prise en charge du cancer indique la nécessité de mettre en place des comités de tumeurs moléculaires (MTB) à grande échelle. Les MTB sont des réunions de concertation pluridisciplinaire moléculaire (RCP moléculaire) qui doivent inclure des médecins de différentes spécialités (c'est-à-dire des oncologues médicaux, des chirurgiens, des radiothérapeutes, des pathologistes, des généticiens cliniques), ainsi que des bio-informaticiens, des pharmaciens et des coordinateurs d'essais cliniques [86].

Plusieurs disciplines médicales (par exemple, la chirurgie, l'oncologie ou la pathologie) peuvent demander une analyse moléculaire afin de définir une stratégie de traitement pour les patients individuels. En pratique, ce sera, généralement, l'oncologue médical qui s'en chargera. La communication et l'entente sur une attitude thérapeutique est souvent un défi, étant donné les différents groupes de cliniciens impliqués et les capacités variables des systèmes de communication. La RCP moléculaire représente le cadre de communication accrue entre les scientifiques, les pathologistes, les oncologistes et les chirurgiens.

Cette RCP moléculaire est, forcément, une équipe multidisciplinaire qui prendra, d'abord, la décision de demander un test puis analysera le résultat avant de prendre une décision thérapeutique.

Le processus de demande doit permettre de s'assurer qu'elle est appropriée, et que chaque patient qui a besoin d'un test l'aura en temps voulu. C'est l'un des aspects les plus difficiles du fonctionnement d'un laboratoire de pathologie moléculaire : de s'assurer que les tests sont demandés pour tous les patients qui en ont besoin, mais également que les tests inutiles ne soient pas réalisés. En effet, ces tests moléculaires sont coûteux.[87]

La décision de mettre en œuvre le test des réflexes doit être basée sur un plan d'affaires, en tenant compte des coûts en temps et en argent., d'extraction des spécimens des archives de pathologie lorsque les résultats deviennent cliniquement nécessaires [87]. De plus, la quantité de tissu qui peut être obtenue par rapport à celle requise pour la pathologie moléculaire doit être prise en compte dans la réflexion sur la stratégie d'échantillonnage. Il est nécessaire également d'adopter une attitude de flexibilité : la technologie et les exigences évoluent rapidement et une réévaluation fréquente des besoins cliniques est essentielle. [53]

Une bonne communication est nécessaire entre le laboratoire, les oncologues et les chirurgiens afin de s'assurer que les examens nécessaires soient demandés en temps utile. Un traitement antérieur (par exemple, une chimiothérapie) peut modifier l'expression des gènes[88] et le statut des mutations [89]-[91]. Ils doivent être documentés sur le formulaire de demande.

Il a été récemment prouvé que les MTB permettaient d'obtenir des résultats cliniques nettement meilleurs pour les patients dont les médecins ont suivi les recommandations de la discussion MTB, notamment une survie sans progression et une survie globale plus longues, par rapport aux patients ayant reçu le régime thérapeutique choisi par le médecin [92]. De ce fait, un soin particulier doit-être donné à ce que tous les groupes soient formés à l'utilisation et à l'interprétation des tests, de leurs résultats et des traitements associés.[85]

Un exemple de compte rendu de la RCP moléculaire est présenté dans la figure suivante telle que adopté par la « Korean Precision Medicine Networking Group » (KPMNG).

**[KOSMOS] Molecular Tumor Board Report**  
**DD-MM-YYYY**

<b>Writer</b>	
<b>Confirmer</b>	
<b>Participants</b>	
<b>Patient information</b>	
<b>Subject ID / Sex / Age</b>	
<b>Type of cancer</b>	
<b>Sample information</b>	
<b>Type of sample</b>	<input type="checkbox"/> Tumor tissue <input type="checkbox"/> Plasma sample for circulating tumor DNA <input type="checkbox"/> Tumor tissue and white blood cells
<b>Tumor cellularity</b>	
<b>Mean target depth</b>	
<b>Liability of result</b>	<input type="checkbox"/> Appropriate <input type="checkbox"/> Inappropriate
<b>Reason for inappropriateness</b>	<input type="checkbox"/> Aged tissue <input type="checkbox"/> Low tumor cellularity <input type="checkbox"/> Others:
<b>Actionable genetic alterations</b>	
<b>Actionable genetic alterations</b>	<input type="checkbox"/> Yes: <input type="checkbox"/> No
<b>Number of actionable genetic alterations</b>	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> ≥3 <input type="checkbox"/> No
<b>K-CAT classification</b>	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3A <input type="checkbox"/> 3B <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> R-A <input type="checkbox"/> R-B

**Figure 47:** Modèle de rapport de la RCP moléculaire adopté par la Korean Precision Medicine Networking Group (KPMNG) – partie 1/2

<p><b>OncoKB level of evidence</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 1</li> <li><input type="checkbox"/> 2</li> <li><input type="checkbox"/> 3A</li> <li><input type="checkbox"/> 3B</li> <li><input type="checkbox"/> 4</li> <li><input type="checkbox"/> R1</li> <li><input type="checkbox"/> R2</li> <li><input type="checkbox"/> Not assessable</li> </ul>
<p><b>Treatment recommendation</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Standard treatment</li> <li><input type="checkbox"/> Off-label treatment (HIRA approved)</li> <li><input type="checkbox"/> Clinical trial (clinicaltrial.gov NCT# )</li> <li><input type="checkbox"/> Investigational new drug application</li> <li><input type="checkbox"/> Others (palliative care, radiotherapy, etc.)</li> </ul>
<p><b>Discussion</b></p>	
<p><b>Evidence of treatment recommendation</b></p>	
<p><b>Final recommendation of treatment</b></p>	

**Figure 48:** Modèle de rapport de la RCP moléculaire adopté par la Korean Precision Medicine Networking Group (KPMNG) – partie 2 /2

**Tableau N° X : Recommandations pour un séquençage NGS en post-analytique**

**Recommandation 20 :** Les laboratoires offrant des diagnostics basés sur le NGS doivent faire valider le pipeline bioinformatique

**Recommandation 21 :** Les données bioinformatiques NGS doivent être analysées et interprétées par un professionnel de la santé qualifié.

**Recommandation 21 :** Le format du rapport doit être statique et la date de publication du rapport doit être explicitement mentionnée.

**Recommandation 22 :** Le rapport doit être fait préférentiellement d'une seule page, bien lisible.

**Recommandation 23 :** Le rapport doit contenir l'identification du patient, avec deux identifiants uniques du patient et un identifiant unique de l'échantillon.

**Recommandation 24 :** Le rapport doit clairement mentionner le panel de gènes utilisé, les détails pré- et post-analytiques, le type et l'étendu de l'analyse, les paramètres de performance, et des résultats bien expliqués avec une interprétation clinique.

**Recommandation 25 :** Les résultats du génotypage doivent être donnés conformément à la nomenclature en vigueur avec une référence appropriée aux résultats du test.

**Recommandation 26 :** Le rapport doit contenir le nom de la personne responsable de l'essai et ses coordonnées.

**Recommandation 27 :** Le pathologiste responsable du rapport combiné "rapport morphologique-moléculaire" doit être clairement identifiable.

**Recommandation 28 :** Les résultats des différents tests génétiques devraient être rapportés, autant que possible, sur un seul rapport intégré

**Recommandation 29 :** Le laboratoire doit être accrédité avec un contrôle interne de la qualité et une participation continue à des programmes d'évaluation externe.

**Recommandation 30 :** La RCP moléculaire doit indiquer la demande d'examen moléculaire, analyser le résultat et émettre un rapport concernant la conduite à tenir

**Recommandation 31 :** Les membres de la RCP moléculaire doivent s'engager dans un processus de formation et constituer un système de veille moléculaire à l'affût des dernières mises à jour en termes de prise en charge diagnostique et thérapeutique



## **2. Recommandations cliniques ESMO**

Le diagnostic moléculaire est devenu d'une importance cruciale dans le traitement des patients atteints de cancers métastatiques. Avec le développement continu des techniques de séquençage haut débit, il est envisageable d'imaginer son rôle capital dans la classification des tumeurs, la détermination du pronostic, le suivi et la découverte de cibles thérapeutiques. [93]

Le NGS a changé la manière dont les professionnels de santé analysent le génome humain. Cette technologie permet des améliorations considérables dans le diagnostic du cancer, ainsi que la capacité de séquencer des quantités importantes d'ADN plus rapidement que la méthode standard de séquençage de Sanger. De plus, le NGS fournit des résultats fiables avec des échantillons de tissus plus petits, tels que ceux obtenus par biopsie guidée ou la ponction à l'aiguille fine. Cette approche réduit les coûts et les risques pour le patient.

Le NGS a considérablement amélioré la détection de mutations spécifiques en fonction du type de cancer, permettant aux cliniciens d'identifier les patients présentant un risque élevé d'échec du traitement et de décès. En outre, le NGS peut être utilisé pour identifier des signatures moléculaires spécifiques au moment du diagnostic, ce qui permet de prédire la réponse du patient à certains traitements. Cette approche réduit les délais dans l'administration de ces traitements et améliore leur efficacité. [94]

Plusieurs sociétés savantes ont élaborés des recommandations pour l'utilisation du séquenceur dont la société européenne d'oncologie médicale en 2021.[95]

TABLEAU XII : Recommandations et guidelines de standardisation de l'utilisation du NGS

Table 1. Recommendations and guidelines for the standardisation of multigene sequencing	
Society guidelines	Author/journal
Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists	Roy S, et al. <i>J Mol Diagn.</i> 2018. <sup>136</sup>
Canadian College of Medical Geneticists	Hume S, et al. <i>J Med Genet.</i> 2019. <sup>137</sup>
College of American Pathologists	<a href="http://www.cap.org">www.cap.org</a> 2020. <sup>138</sup>
	Szymanski J, et al. <i>J Pathol Inform.</i> 2018. <sup>139</sup>
	Burke W, et al. <i>Curr Protoc Hum Genet.</i> 2014. <sup>140</sup>
US FDA	Kaul K, et al. <i>J Mol Diag.</i> 2001. <sup>141</sup>
IQN Path	Deans Z, et al. <i>Virchows Arch.</i> 2017. <sup>142</sup>
	Matthijs G, et al. <i>Eur J Hum Genet.</i> 2015. <sup>143</sup>
A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists	Jennings L, et al. <i>J Mol Diagn.</i> 2017. <sup>144</sup>
College of American Pathologists	Aziz N, et al. <i>Arch Pathol Lab Med.</i> 2015. <sup>145</sup>

FDA, Food and Drug Administration; IQN Path, International Quality Network for Pathology.

En pratique, le diagnostic moléculaire en oncologie peut être vu selon différentes modalités. La première possibilité est selon le but recherché. Dans ce cas, on distingue 3 possibilités :

- A but diagnostic : De plus en plus, la biologie moléculaire s'impose comme incontournable dans le diagnostic des tumeurs en hématologie, neuropathologie, pathologie des tissus mous....
- A but pronostic : Pareillement, il existe de plus en plus de facteurs à valeur pronostique
- A but thérapeutique : Par la recherche de biomarqueurs « actionnables » pouvant bénéficier d'un traitement.

La deuxième approche est selon les grandes utilisations courantes en oncologie[96]

Dans le cas de cancers familiaux d'une aide capitale, notamment, pour le dépistage et la prévention

- Comme marqueur prédictif à la réponse au traitement
- Dans la maladie résiduelle, principalement, par la biopsie liquide
- Dans le cas des cancers à primitifs inconnus malgré l'importance de l'immunohistochimie ; celle-ci peut s'avérer défailante. Les protéines peuvent avoir un niveau d'expression faible et être, de ce fait, non détectable. Les tests de diagnostic ciblant l'ADN et l'ARN corrigent cette situation. [96]

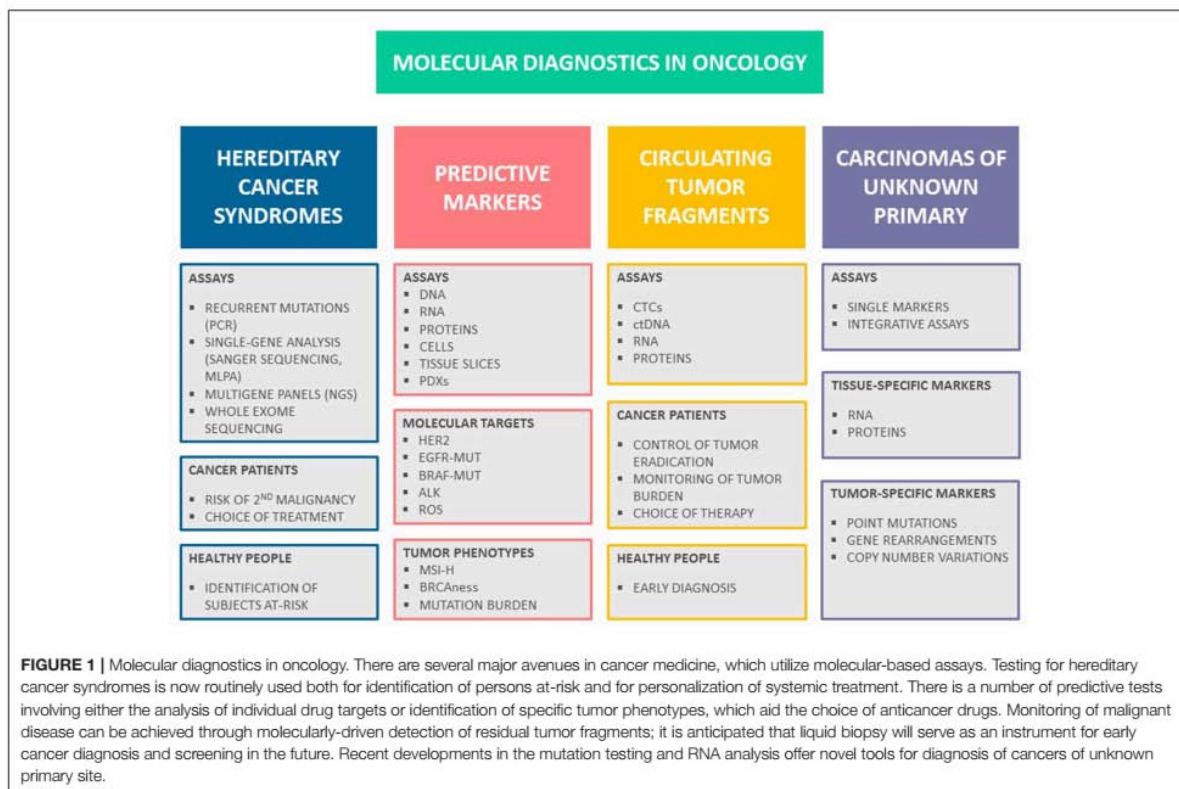
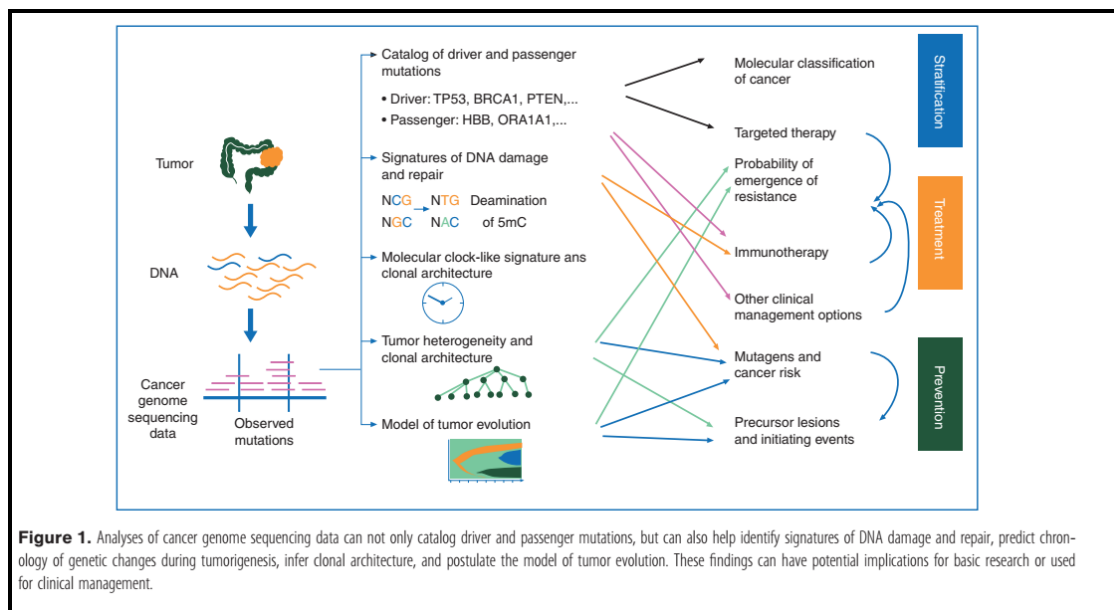


Figure 49: Bases du diagnostic moléculaire en oncologie [96]



**Figure 50: Bases du diagnostic moléculaire en oncologie [97]**

**TABLEAU XIII : Liste de quelques altérations génétiques retrouvées dans les cancers héréditaires**

TABLE 1   Hereditary cancer syndromes: selected examples.				
Syndrome	Gene	Tumors	Comments	References
Hereditary breast-ovarian cancer (HBOC)	<i>BRCA1, BRCA2, PALB2</i>	Breast, ovarian, pancreatic, prostate, gastric cancer	Tumors are deficient for double-strand break DNA repair by homologous recombination	Miki et al., 1994; Moiseyenko et al., 2013; Antoniou et al., 2014; Cavanagh and Rogers, 2015
Hereditary breast cancer: novel and/or moderately penetrant genes	<i>CHEK2, ATM, BARD1, BLM, BRIP1, NBS/NBN, MRE11, RAD50, RAD51C, RAD51D, FANCC, FANCM</i>	Breast cancer		Sokolenko et al., 2012; Thompson et al., 2012; Bogdanova et al., 2013; Kiiski et al., 2014; Cybulski et al., 2015; Easton et al., 2015
Lynch syndrome, or hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>	Colon, endometrial, breast, urothelial, small intestine, gastric cancer	High-level microsatellite instability in tumors	Lynch et al., 2015
Hereditary colorectal cancer	<i>POLE, POLD1</i>	Polyposis, colorectal cancer	Very high mutation burden in tumors	Bellido et al., 2016
Familial adenomatous polyposis (FAP)	<i>APC</i>	Multiple (>100) colonic adenomas, desmoid tumors, colorectal cancer		Fishel et al., 1993
MUTYH-associated polyposis (MAP)	<i>MUTYH</i>	Moderate number of colonic adenomas, colorectal cancer	Autosomal-recessive inheritance	Kanth et al., 2017
NTHL1-associated polyposis (NAP)	<i>NTHL1</i>	Polyposis, colorectal cancer	Autosomal-recessive inheritance	Weren et al., 2015
Juvenile polyposis	<i>SMAD4, BMPR1A</i>	Colorectal polyps, colorectal cancer, other gastrointestinal cancers		Kanth et al., 2017
Peutz-Jeghers syndrome	<i>STK11</i>	Hamartomatous polyps, gastrointestinal cancers		Kanth et al., 2017
Hereditary diffuse gastric cancer	<i>CDH1</i>	Gastric cancer		Oliveira et al., 2009
Li-Fraumeni syndrome	<i>TP53</i>	Soft tissue sarcomas, breast cancer, brain tumors, adrenal gland cancer		Ruijs et al., 2010
Multiple endocrine neoplasia type 1	<i>MEN1</i>	Parathyroid, pituitary gland, gastroenteropancreatic tumors		Norton et al., 2015
Multiple endocrine neoplasia type 2	<i>RET</i>	Medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma	Gain-of-function germ-line mutations	Norton et al., 2015
Von Hippel-Lindau disease	<i>VHL</i>	Clear cell renal cell carcinoma, hemangioblastomas of the brain, other tumors		Latif et al., 1993; Friedrich, 1999
Cowden syndrome	<i>PTEN</i>	Multiple hamartomas, breast cancer, thyroid cancer		Kanth et al., 2017
Familial retinoblastoma	<i>RB1</i>	Retinoblastoma		Lohmann, 1999
Familial melanoma	<i>CDKN2A, CDK4, TERT, POT1</i>	Melanoma		FitzGerald et al., 1996; Horn et al., 2013; Robles-Espinoza et al., 2014

*Comprehensive cataloging of hereditary cancer syndromes is beyond the scope of this review. Some of the described tumor diseases have a relatively high prevalence, e.g., hereditary breast-ovarian cancer syndrome or Lynch syndrome. Other examples represent orphan diseases; however, some of them, e.g., familial retinoblastoma or Li-Fraumeni syndrome, are widely known in medical and research community because their identification resulted in significant breakthrough in basic understanding of cancer pathogenesis. This table does not include severe multiorgan maladies, in which cancer serves only as part of clinical manifestation, i.e., some primary immune deficiencies, DNA repair abnormalities etc. The list of cancer syndromes is constantly expanding due to discovery of novel causative genes (Sokolenko et al., 2015). The catalog of cancer syndromes can be found in the OMIM database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>).*

**Tableau XIV :** regroupant quelques biomarqueurs prédictifs « actionnables »[98]

Table 1. Selected targetable biomarkers in solid tumours				
Biomarker	Alteration	Targeted therapies	Drug type	Tumour types with licensed indication
<i>ALK</i>	Rearrangement	Alectinib, brigatinib, lorlatinib, crizotinib	SM	NSCLC
<i>BRAF</i> V600E	Point mutation	Dabrafenib + trametinib (MEK inhibitor), vemurafenib + cobimetinib, encorafenib + binimetinib	SM	Melanoma, NSCLC, tumour agnostic (dabrafenib + trametinib)
<i>EGFR</i>	Deletion, point mutation	Erlotinib, gefitinib, afatinib, osimertinib	SM	NSCLC
<i>FGFR2</i>	Rearrangement	Pemigatinib, infigratinib <sup>b</sup>	SM	BTC
<i>FGFR3</i>	Rearrangement	Erdaftinib	SM	Urothelial <sup>b</sup>
FR $\alpha$	Overexpression <sup>a</sup>	Mirvetuximab soravtansine	ADC	Ovarian
<i>HER2/ERBB2</i>	Amplification, overexpression	Trastuzumab, pertuzumab Tucatinib, neratinib, lapatinib Trastuzumab deruxtecan	mAb SM ADC	Breast, oesophagogastric (trastuzumab only) Breast Breast, gastric/GOJ <sup>b</sup> , NSCLC <sup>b</sup>
HRD	Numerous alterations lead to this phenotype e.g. <i>BRCA1</i> loss, <i>ATM</i> loss	PARP inhibitors e.g. olaparib, niraparib, rucaparib, talazoparib	SM	Ovarian, breast, prostate
<i>IDH1</i>	Point mutation	Ivosidenib	SM	BTC <sup>b</sup>
<i>KIT</i>	Point mutation, deletion	Imatinib, sunitinib, avapritinib, regorafenib	SM	GIST
<i>KRAS</i> G12C	Point mutation	Sotorasib, adegrasib <sup>b</sup>	SM	NSCLC
<i>MET</i>	Amplification, skip mutation	Capmatinib <sup>b</sup> , tepotinib	SM	NSCLC
MSI-H	Point mutation, deletion, epigenetic	Immune checkpoint inhibitors eg nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab,	mAb	Tumour-agnostic
Nectin-4	Overexpression <sup>a</sup>	Enfortumab vedotin	ADC	Urothelial
<i>NTRK</i>	Rearrangement	Entrectinib, larotrectinib	SM	Agnostic
<i>PDGFRA</i>	Point mutation	Avapritinib	SM	GIST
<i>PIK3CA</i>	Point mutation	Alpelisib	SM	Breast
<i>RET</i>	Rearrangement	Selpercatinib, pralsetinib	SM	Thyroid, NSCLC
<i>ROS1</i>	Rearrangement	Crizotinib, entrectinib	SM	NSCLC
TF	Overexpression <sup>a</sup>	Tisotumab vedotin	ADC	Cervical <sup>b</sup>
Trop-2	Overexpression <sup>a</sup>	Sacituzumab govitecan	ADC	Breast, urothelial <sup>b</sup>
<i>VHL</i>	Point mutation, insertion/deletion, rearrangement, epigenetic	Belzutifan (blocks downstream HIF2 $\alpha$ )	SM	RCC in Von Hippel Lindau disease

ADC = antibody–drug conjugate; BTC = biliary tract cancer; CRC = colorectal cancer; FR $\alpha$  = folate receptor alpha; GIST = gastrointestinal stromal tumour; HCC = hepatocellular carcinoma; HNSCC = head/neck squamous cell carcinoma; HRD = homologous recombination repair deficiency (genomic signature); mAb = monoclonal antibody; MSI-H = microsatellite instability-high (genomic signature); MMR = mismatch repair; NSCLC = non-small cell lung cancer; SM = small-molecule inhibitor; TF = tissue factor.

<sup>a</sup>Targeted therapy approved regardless of biomarker status. Biomarker not routinely tested.

<sup>b</sup>Approved by US Food and Drug Administration.

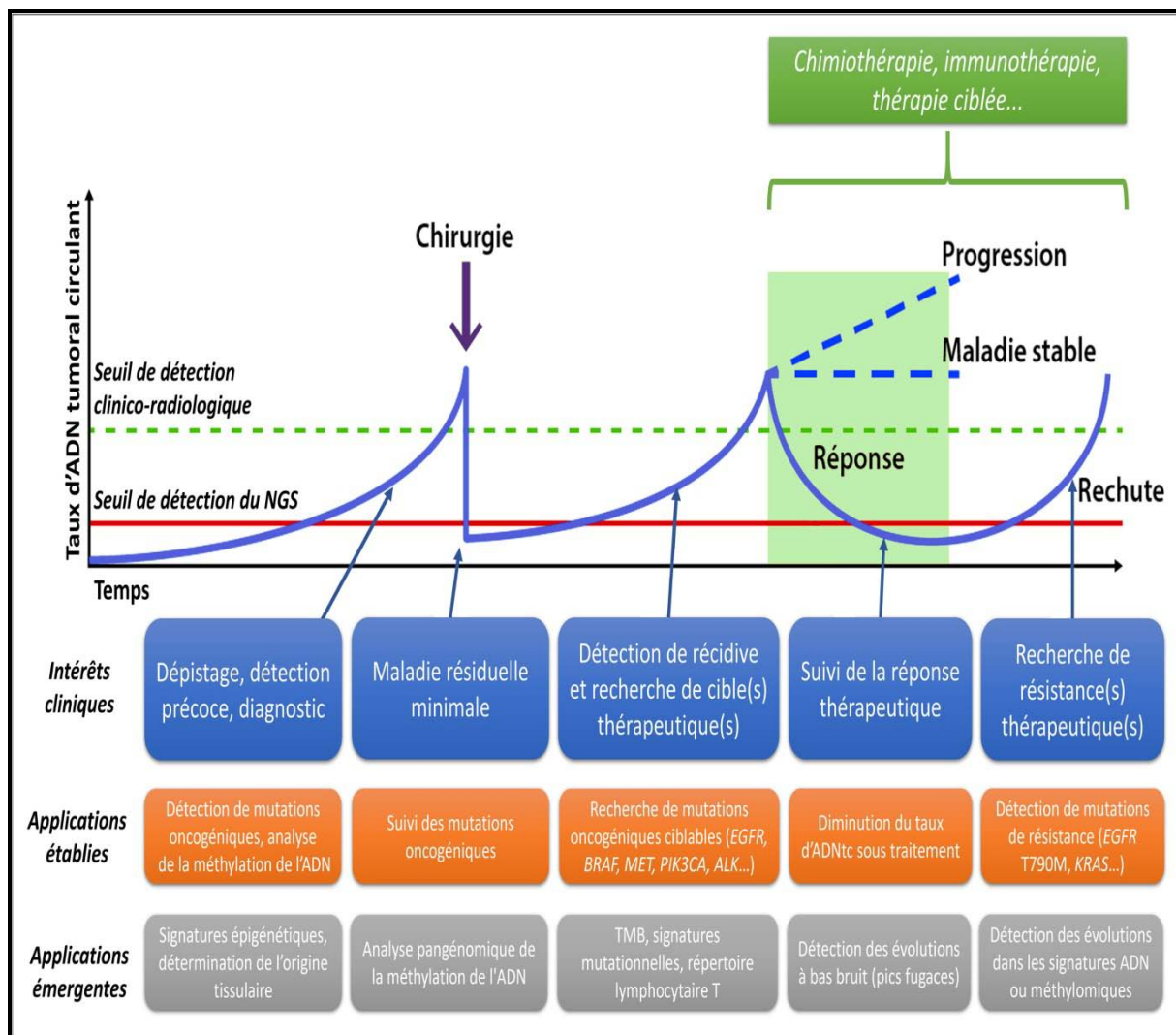


Figure 51: Exemple d'applications cliniques des biopsies liquides au cours de la maladie cancéreuse. [99]



# CONCLUSION





Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a un rôle crucial dans l'anatomie pathologique, en particulier dans le domaine de la pathologie moléculaire. Les avancées technologiques dans le domaine du NGS ont permis une analyse rapide et fiable de milliers de gènes, offrant ainsi une approche plus précise et complète de l'évaluation de la génomique tumorale.

En utilisant le NGS, les chercheurs peuvent identifier des biomarqueurs qui peuvent aider à la classification des tumeurs et à la prédiction du pronostic de la maladie. Le NGS peut également aider à la médecine de précision, en permettant une approche personnalisée du traitement, en fonction des caractéristiques moléculaires spécifiques de chaque patient. Ainsi qu'à la surveillance post-thérapeutique, ce qui permettra une intervention précoce en cas de récurrence.

Cependant, pour garantir la qualité et l'exactitude des résultats de séquençage, il est important de respecter les bonnes pratiques recommandées, telles que le choix des panels de séquençage appropriés, l'utilisation de contrôles de qualité, la validation des résultats et l'interprétation appropriée des données.

En tenant compte également, que pour une utilisation optimale du NGS en anatomie pathologique, il est essentiel de mettre en place une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). La RCP permet une collaboration étroite entre les pathologistes, les oncologues, les généticiens et d'autres spécialistes, pour discuter et interpréter les résultats de séquençage, et pour prendre des décisions de traitement éclairées et personnalisées pour chaque patient.

En somme, le NGS continuera d'être une pierre angulaire de la médecine de précision, qui peut contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la maladie, améliorer la classification des tumeurs et guider les choix thérapeutiques pour une médecine personnalisée.

Le potentiel futur du séquençage par WES et WGS est immense. Les avancées technologiques en matière de séquençage et de bioinformatique permettront d'améliorer la qualité des données générées et de réduire les coûts, rendant ces techniques plus accessibles à un plus grand nombre de patients, et permettront également de réaliser de nouvelles découvertes passionnantes en matière de compréhension, de prévention et de traitement des maladies, ouvrant la voie à des progrès importants dans le domaine de la santé.



# RESUMES



## Résumé

**Introduction** : le séquençage de nouvelle génération est une technologie révolutionnaire qui a un grand impact sur la médecine moderne. En pathologie moléculaire, cette technologie permet une meilleure compréhension des maladies et une identification plus rapide et précise des mutations génétiques associées à ces maladies. De même, l'identification de biomarqueurs à l'aide du NGS peut aider les médecins à prendre des décisions de traitement plus précises et efficaces, tout en permettant une meilleure prédiction de l'évolution de la maladie.

La médecine de précision tire parti de la technologie NGS pour personnaliser les traitements en fonction des caractéristiques génétiques individuelles des patients, ce qui permet de maximiser les chances de succès du traitement tout en réduisant les effets secondaires. En somme, le NGS est un outil clé pour la recherche et la pratique médicale moderne, et son potentiel pour améliorer la prise en charge des malades atteints de certains cancers est immense.

**Matériels et méthodes** : Il s'agit d'une étude bibliographique de type transversale, nous avons mené une enquête, sur une période de 10 mois (de Avril 2022 à février 2023), au cours de laquelle 32 médecins pathologistes exerçant dans la région de Marrakech-Safi ont été interrogés. Le recueil des données a été fait sur la plateforme électronique « Google formulaire », et en format papier ; visant à préciser les aspects sociodémographiques et les connaissances des jeunes pathologistes en matière du séquençage de nouvelle génération.

**Résultats** : La prédominance des médecins pathologistes interrogés revenait aux résidents exerçant au CHU. La majorité des participants soit 75% trouvaient que le séquençage est devenu indispensable dans la pratique de l'anatomie pathologique, en revanche uniquement 16% ont déjà bénéficié d'une formation dans ce domaine et 53% n'avaient pas

d'informations par rapport aux domaines d'utilisations du séquençage de nouvelle génération, tandis que la majorité soit 78% des pathologistes interrogés sont informés sur la notion d'exon.

Cependant, un séquenceur est disponible dans les lieux d'exercice de 65% de nos pathologistes.

Les deux types de prélèvements choisis par la plupart de nos médecins étaient biopsie liquide et le tissu fixé. Alors que la durée inférieure à un an est perçue comme la durée maximale de conservation des blocs utilisés dans 41% des cas.

Plus que la moitié des participants, soit 53% n'ont pas d'informations par rapport aux anomalies que nous pouvons détecter par le séquençage de nouvelle génération. Ainsi, la grande majorité des participants à notre questionnaire soit 91% trouvaient qu'une formation en NGS est primordiale dans la pratique en anatomie pathologique.

**Conclusion** : Le NGS est de plus en plus utilisé en anatomie pathologique, grâce à son analyse des données génomiques, cette technique peut fournir plusieurs informations précieuses sur les marqueurs moléculaires de la maladie, permettant une meilleure classification des tumeurs et une évaluation précise du pronostic. Cela peut aider les médecins à personnaliser les traitements en fonction des caractéristiques moléculaires spécifiques de chaque patient.

## **Abstract**

**Introduction** : Next-generation sequencing is a revolutionary technology that is having a major impact on modern medicine. In molecular pathology, this technology allows a better understanding of diseases and a faster and more accurate identification of genetic mutations associated with these diseases. Similarly, the identification of biomarkers using NGS can help physicians make more accurate and effective treatment decisions, while allowing for better prediction of disease progression.

Precision medicine takes advantage of NGS technology to personalize treatments based on individual patient genetic characteristics, maximizing the chances of successful treatment while minimizing side effects. In sum, NGS is a key tool for modern medical research and practice, and its potential to improve the management of patients with certain cancers is immense.

**Materials and methods** : This is a bibliographic study of a transversal type, we conducted a survey over a period of 10 months (from April 2022 to February 2023), during which 32 pathologists practicing in the region of Marrakech–Safi were interviewed. The data collection was done on the electronic platform "Google form", and in paper format; aiming at specifying the socio-demographic aspects and the knowledge of the young pathologists as regards the new generation sequencing.

**Results** : The predominance of pathologists surveyed was among residents practicing at the university hospital. The majority of the participants (75%) found that sequencing has become indispensable in the practice of pathological anatomy, but only 16% had already received training in this field and 53% had no information on the areas of use of new generation sequencing, while the majority (78%) of the pathologists questioned were informed about the concept of exon.

However, a sequencer is available at the practice sites of 65% of our pathologists.

The two types of specimens chosen by most of our physicians were liquid biopsy and fixed tissue. While the duration of less than 1 year is perceived as the maximum shelf life of blocks used in 41% of cases.

More than half of the participants (53%) did not have any information about the abnormalities that can be detected by next-generation sequencing. Thus, the vast majority of participants to our questionnaire (91%) felt that training in NGS is essential in the practice of pathological anatomy.

**Conclusion :** NGS is increasingly used in pathological anatomy, thanks to its analysis of genomic data, this technique can provide several valuable information on molecular markers of disease, allowing a better classification of tumors and an accurate evaluation of prognosis. This can help physicians to personalize treatments according to the specific molecular characteristics of each patient.

## ملخص

**مقدمة:** تسلسل الجيل التالي هو تقنية ثورية لها تأثير كبير على الطب الحديث. في علم الأمراض الجزيئي ، تتيح هذه التقنية فهمًا أفضل للأمراض وتحديدًا أكثر سرعة ودقة للطفرات الجينية المرتبطة بهذه الأمراض. وبالمثل ، فإن تحديد المؤشرات الحيوية باستخدام NGS يمكن أن يساعد الأطباء على اتخاذ قرارات علاجية أكثر دقة وفعالية ، مع تمكين التنبؤ بشكل أفضل بمسار المرض. يستخدم الطب الدقيق تقنية NGS لتخصيص العلاجات بناءً على الخصائص الوراثية الفردية للمريض ، مما يزيد من فرص نجاح العلاج مع تقليل الآثار الجانبية. باختصار ، NGS هي أداة رئيسية للبحث والممارسة الطبية الحديثة ، وقدرتها على تحسين رعاية المرضى الذين يعانون من بعض أنواع السرطان هائلة.

**المواد والطرق:** هذه دراسة ببيوغرافية مقطعية ، أجرينا مسحًا على مدى 10 أشهر (من أبريل 2022 إلى فبراير 2023) ، تم خلاله استجواب 32 اختصاصيًا في علم الأمراض في منطقة مراكش-أسفي. تم جمع البيانات على النظام الأساسي الإلكتروني ، وفي شكل ورقي ؛ يهدف إلى توضيح الجوانب الاجتماعية والديموغرافية ومعرفة علماء الأمراض الشباب من حيث تسلسل الجيل القادم كانت غلبة علماء الأمراض الذين تمت مقابلتهم للمقيمين الممارسين في CHU ،. وجد غالبية المشاركين ، أي 75٪ ، أن التسلسل أصبح ضروريًا في ممارسة التشريح المرضي ، ولكن 16٪ فقط استفادوا بالفعل من التدريب في هذا المجال و 53٪ ليس لديهم معلومات عن مجالات استخدام تسلسل الجيل التالي ، في حين أن الغالبية ، أي 78٪ من أخصائيي علم الأمراض الذين تم استجوابهم ، على علم بمفهوم exon. ومع ذلك ، يتوفر جهاز التسلسل في مواقع ممارسة 65٪ من أخصائيي علم الأمراض لدينا كان نوعا العينات التي اختارها معظم أطبائنا هما الخزعة السائلة والأنسجة الثابتة. بينما يُنظر إلى المدة التي تقل عن عام واحد على أنها أقصى مدة صلاحية للكتل المستخدمة في 41٪ من الحالات

أكثر من نصف المشاركين ، أو 53٪ ، ليس لديهم معلومات حول التشوهات التي يمكننا اكتشافها من خلال تسلسل الجيل التالي. وبالتالي ، فإن الغالبية العظمى من المشاركين في استبياننا ، أي 91٪ ، وجدوا أن NGS ضروري في ممارسة علم التشريح المرضي التدريب في.

**خاتمة:** يتم استخدام NGS بشكل متزايد في علم التشريح المرضي ، وذلك بفضل تحليلها للبيانات الجينومية ، ويمكن أن توفر هذه التقنية العديد من المعلومات القيمة حول العلامات الجزيئية للمرض ، مما يسمح بتصنيف أفضل للأورام وتقييم دقيق للتشخيص. يمكن أن يساعد هذا الأطباء على تخصيص العلاجات بناءً على الخصائص الجزيئية المحددة لكل مريض.







# ANNEXES



ANNEXES :

ANNEXE :

**Questionnaire :**

Etat de connaissance des jeunes pathologistes en séquençage de nouvelle génération (NGS)

**1– Statut professionnel**

- Résident
- Spécialiste

**2– Structure d'exercice**

- CHU
- CHP

**3– En 2023, pensez– vous que le séquençage génomique soit indispensable dans la pratique de l'anatomie pathologique au Maroc ?**

- Oui
- Non

**4– Avez–vous déjà reçu une formation en NGS ?**

- Oui
- Non

**5– Existe–t–il un séquenceur dans votre région d'exercice ?**

- Oui
- Non

**6– Connaissez–vous les domaines d'utilisation du NGS ?**

- Oui
- Non

**7– Savez–vous ce que c'est que l'exon ?**

- Oui
- Non
-

8– Sur quel type de prélèvement peut-on réaliser un séquençage ?

- Biopsie liquide
- Cytologie
- Tissu frais
- Tissu fixé
- Tissu congelé
- Autres

9– Si vous souhaitez réaliser un séquençage sur vos blocs stockés ( FFIP). Quelle est la durée maximale de conservation du bloc à utiliser ?

- < 1 an
- 1 – 5 ans
- 5 – 10 ans
- >10 ans

10– Connaissez-vous quelques anomalies à rechercher par séquençage ?

- Oui
- Non

11– Si oui, citez quelques exemples

12–Selon vous, une formation en NGS est-elle nécessaire dans la pratique en anatomie pathologique?

- Oui
- Non

*Toutes les réponses sont anonymes Sincères remerciements pour votre participation*

## Annexe II :

### RECAPITULATIF DES RECOMMANDATIONS :

#### 1. EN PRE-ANALYTIQUE :

- ✓ Identifier le patient et étiqueter l'échantillon à l'aide de quatre identifiants.
- ✓ Préciser le type et l'origine du spécimen.
- ✓ Choisir un type de conteneur adéquat. L'utilisation de diagrammes et des check-lists de contrôle dans les salles d'opération peuvent aider à garantir une utilisation correcte.
- ✓ Veiller au respect et le contrôle du temps et de température qui doit être à 4°C.
- ✓ Respecter les exigences de fixation au formol tamponné neutre à 4%.
- ✓ Procéder à l'Incision des grandes masses, en respectant les marges de résection pour permettre la pénétration du formol.
- ✓ L'utilisation des tubes EDTA pour les échantillons de biopsie liquide, pour préserver l'ARN.

#### 2. EN ANALYTIQUE :

- ✓ Eviter d'utiliser les échantillons tissulaires fixés qui ont été préalablement congelés.
- ✓ Marquer les zones de section contenant le néoplasme sur la lame H&E.
- ✓ Estimer le pourcentage des cellules néoplasiques présentes dans chaque échantillon.
- ✓ Prendre en charge l'échantillon dès que possible (idéalement dans les 30 minutes) après le prélèvement.
- ✓ Indiquer sur le tube le temps écoulé entre le prélèvement et sa prise en charge.
- ✓ Réaliser de coupes colorées coupées dans des blocs de paraffine à 4–6 µm.
- ✓ Remplacer les lames régulièrement, idéalement avant de couper chaque nouveau FFPE, pour éviter la contamination des échantillons.
- ✓ Séparer pour les prélèvements cytologiques les cellules du plasma par centrifugation à 1000–2000 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée.
- ✓ Stocker les échantillons d'ADN et d'ARN extraits, clairement étiquetés, à –20°C ou –80°C.

- ✓ Conserver les produits PCR dans un congélateur séparé à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Stocker les librairies de séquençage dans un congélateur séparé à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Adopter des normes strictes d'assurance qualité en termes de traçabilité des échantillons, validation des techniques et de l'analyse bio-informatique.

### **3. EN POST-ANALYTIQUE :**

- ✓ Les laboratoires offrant des diagnostics basés sur le NGS doivent faire valider le pipeline bioinformatique
- ✓ Les données bioinformatiques NGS doivent être analysées et interprétées par un professionnel de la santé qualifié.
- ✓ Le format du rapport doit être statique et la date de publication du rapport doit être explicitement mentionnée.
- ✓ Le rapport doit être fait préférentiellement d'une seule page, bien lisible.
- ✓ Le rapport doit contenir l'identification du patient, avec deux identifiants uniques du patient et un identifiant unique de l'échantillon.
- ✓ Le rapport doit clairement mentionner le panel de gènes utilisé, les détails pré- et post-analytiques, le type et l'étendue de l'analyse, les paramètres de performance, et des résultats bien expliqués avec une interprétation clinique.
- ✓ Les résultats du génotypage doivent être donnés conformément à la nomenclature en vigueur avec une référence appropriée aux résultats du test.
- ✓ Le rapport doit contenir le nom de la personne responsable de l'essai et ses coordonnées.
- ✓ Le pathologiste responsable du rapport combiné "rapport morphologique-moléculaire" doit être clairement identifiable.
- ✓ Les résultats des différents tests génétiques devraient être rapportés, autant que possible, sur un seul rapport intégré
- ✓ Le laboratoire doit être accrédité avec un contrôle interne de la qualité et une participation continue à des programmes d'évaluation externe.

- ✓ La RCP moléculaire doit indiquer la demande d'examen moléculaire, analyser le résultat et émettre un rapport concernant la conduite à tenir
- ✓ Les membres de la RCP moléculaire doivent s'engager dans un processus de formation et constituer un système de veille moléculaire à l'affut des dernières mises à jour en termes de prise en charge diagnostique et thérapeutique

## Annexe III : Tableaux des différentes recommandations de l'ESMO.

Tableau I : Liste des altérations génomiques dans le CPNPC selon ESCAT

Table 3A. List of genomic alterations level I/II/III according to ESCAT in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NSCLC)				
Gene	Alteration	Prevalence	ESCAT	References
EGFR	Common mutations ( <i>Del19, L858R</i> )	15% (50%–60% Asian)	IA	Midha A, et al. <i>Am J Cancer Res.</i> 2015 <sup>26</sup>
	Acquired <i>T790M</i> exon 20	60% of <i>EGFR</i> mutant	IA	Mok T, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>27</sup>
	Uncommon <i>EGFR</i> mutations ( <i>G719X</i> in exon 18, <i>L861Q</i> in exon 21, <i>S768I</i> in exon 20)	NSCLC	IB	Soria J-C, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2018 <sup>28</sup>
	Exon 20 insertions	10%	IIB	Ramalingam S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020 <sup>29</sup>
		2%		Mok T, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2017 <sup>30</sup>
				Yang J-C-H, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2015 <sup>31</sup>
				Cho J, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2018 <sup>32</sup>
				Cardona A, et al. <i>Lung Cancer.</i> 2018 <sup>33</sup>
				Heymach J, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2018 <sup>34</sup>
ALK	Fusions (mutations as mechanism of resistance)	5%	IA	Solomon B, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>35</sup>
				Soria J-C, et al. <i>Lancet.</i> 2017 <sup>36</sup>
				Peters S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2017 <sup>37</sup>
				Zhou C, et al. <i>Ann Oncol.</i> 2018 <sup>38</sup>
				Camidge D, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2018 <sup>39</sup>
MET	Mutations <i>ex 14 skipping</i>	3%	IB	Tong J, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2016 <sup>40</sup>
	Focal amplifications (acquired resistance on EGFR TKI in <i>EGFR</i> -mutant tumours)	3%	IIB	Drilon A, et al. <i>Nat Med.</i> 2020 <sup>41</sup>
				Camidge D, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>52</sup>
BRAF <sup>V600E</sup>	Mutations	2%	IB	Planchard D, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2016 <sup>42</sup>
				Planchard D, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2017 <sup>43</sup>
				Planchard D, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2017 <sup>44</sup>
ROS1	Fusions (mutations as mechanism of resistance)	1%–2%	IB	Shaw A, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2014 <sup>45</sup>
				Shaw A, et al. <i>Ann Oncol.</i> 2019 <sup>46</sup>
				Drilon A, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>47</sup>
NTRK	Fusions	0.23%–3%	IC	Drilon A, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2018 <sup>48</sup>
				Hong D, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>49</sup>
				Doebele RC, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>50</sup>
RET	Fusions	1%–2%	IC	Drilon A, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2019 <sup>51</sup>
KRAS <sup>G12C</sup>	Mutations	12%	IIB	Barlesi F, et al. <i>Lancet.</i> 2016 <sup>53</sup>
				Fakih M, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2019 <sup>54</sup>
ERBB2	Hotspot mutations	2%–5%	IIB	Hyman D, et al. <i>Nature.</i> 2018 <sup>55</sup>
	Amplifications			Wang Y, et al. <i>Ann Oncol.</i> 2018 <sup>56</sup>
				Tsurutani J, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2018 <sup>57</sup>
BRCA 1/2	Mutations	1.2%	IIIA	Balasubramaniam S, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2017 <sup>63</sup>
PIK3CA	Hotspot mutations	1.2%–7%	IIIA	Cancer Genome Atlas Research Network. <i>Nature.</i> 2014 <sup>60</sup>
				Vansteenkiste J, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2015 <sup>62</sup>
NRG1	Fusions	1.7%	IIB	Duruiseaux M, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2019 <sup>59</sup>

Table 3B. List of genomic alterations level I/II/III according to ESCAT in advanced squamous NSCLC				
Gene	Alteration	Prevalence	ESCAT	References
NTRK	Fusions	0.23%–3%	IC	Drilon A, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2018 <sup>48</sup>
				Hong D, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>49</sup>
				Doebele RC, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>50</sup>
PIK3CA	Hotspot mutations	16%	IIIA	Cancer Genome Atlas Research Network. <i>Nature.</i> 2012 <sup>61</sup>
				Vansteenkiste J, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2015 <sup>62</sup>
BRCA 1/2	Mutations	1.2%	IIIA	Balasubramaniam S, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2017 <sup>63</sup>

ESCAT, European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale for Clinical Actionability of molecular Targets.



**Tableau II : Liste des altérations génomiques dans le cancer du sein métastatique selon ESCAT.**

<b>Table 4. List of genomic alterations level I/II/III according to ESCAT in metastatic breast cancer (mBC)</b>				
<b>Gene</b>	<b>Alteration</b>	<b>Prevalence</b>	<b>ESCAT</b>	<b>References</b>
<i>ERBB2</i>	Amplifications	15%–20%	IA	Slamon D, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2001 <sup>65</sup> Swain S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2015 <sup>66</sup> Verma S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2012 <sup>67</sup> Krop I, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2014 <sup>68</sup> Murthy R, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020 <sup>69</sup>
	Hotspot mutations	4%	IIB	Hyman D, et al. <i>Nature.</i> 2018 <sup>55</sup>
<i>PIK3CA</i>	Hotspot mutations	30%–40%	IA	André F, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2019 <sup>72</sup>
<i>BRCA1/2</i>	Germline mutations	4%	IA	Robson M, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2017 <sup>70</sup> Litton J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2018 <sup>71</sup>
	Somatic mutations	3%	IIIA	Balasubramaniam S, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2017 <sup>63</sup>
	MSI-H	1%	IC	Marcus L, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2019 <sup>73</sup>
<i>NTRK</i>	Fusions	1%	IC	Doebele RC, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>50</sup>
<i>ESR1</i>	Mutations (mechanism of resistance)	10%	IIA	Fribbens C, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2016 <sup>74</sup>
<i>PTEN</i>	Mutations	7%	IIA	Schmid P, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>75</sup>
<i>AKT1<sup>E17K</sup></i>	Mutations	5%	IIB	Hyman D, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2017 <sup>76</sup>
<i>NF1</i>	Mutations (resistance biomarker)	6%	Not applicable	Pearson A, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2020 <sup>77</sup>
<i>MDM2</i>	Amplifications	~1%	IIIA	Dembla V, et al. <i>Oncotarget.</i> 2018 <sup>78</sup>
<i>ERBB3</i>	Mutations	2%	IIB	Hyman D, et al. <i>Nature.</i> 2018 <sup>55</sup>

ESCAT, European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale for Clinical Actionability of molecular Targets; MSI-H, microsatellite instability-high.

**Tableau III : Liste des altérations génomiques dans le cancer colorectal selon ESCAT.**

**Table 5. List of genomic alterations level I/II/III according to ESCAT in metastatic colorectal cancer (mCRC)**

Gene	Alteration	Prevalence	ESCAT	References
<i>KRAS</i> <i>NRAS</i>	Mutations (resistance biomarker)	44% 4%	Not applicable	Van Cutsem E, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2015 <sup>79</sup> Douillard J-Y, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2013 <sup>80</sup> Sorich M, et al. <i>Ann Oncol.</i> 2015 <sup>81</sup>
<i>BRAF</i> <sup>V600E</sup>	Mutations	8.5%	IA	<a href="https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235">https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235</a> Kopetz S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2019 <sup>82</sup>
	MSI-H	4%–5%	IA	Overman M, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2017 <sup>83</sup> Le DT, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2020 <sup>84</sup>
<i>NTRK1</i>	Fusions	0.5%	IC	Demetri G, et al. <i>Ann Oncol.</i> 2018 <sup>85</sup> Doebele RC, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020 <sup>50</sup>
<i>ERBB2</i>	Amplifications	2%	IIB	Meric-Bernstam F, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2019 <sup>86</sup> Sartore-Bianchi A, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2016 <sup>87</sup>
<i>PIK3CA</i>	Hotspot mutations	17%	IIIA	Juric D, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>90</sup>
<i>ATM</i>	Mutations	5%	IIIA	Wang C, et al. <i>Transl Oncol.</i> 2017 <sup>92</sup> De Bono J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020 <sup>93</sup>
<i>MET</i>	Amplifications	1.7%	IIIA	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03592641">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03592641</a> <sup>94</sup>
<i>AKT1</i> <sup>E17K</sup>	Mutations	1%	IIIA	Hyman D, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2017 <sup>76</sup>
	TMB-high in MSS	1%	IIIA	Fabrizio D, et al. <i>J Gastrointest Oncol.</i> 2018 <sup>89</sup>
<i>RET</i>	Fusions	0.3%	IIIA	Drilon A, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>91</sup>
<i>ALK</i>	Fusions	0.2%	IIIA	Yakirevich E, et al. <i>Clin Cancer Res</i> 2016 <sup>88</sup>

ESCAT, European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale for Clinical Actionability of molecular Targets; MSI-H, microsatellite instability-high; MSS, microsatellite stable.

**Tableau IV : Liste des altérations génomiques dans le cancer de prostate selon ESCAT.**

<b>Table 6. List of genomic alterations level I/II/III according to ESCAT in advanced prostate cancer</b>				
<b>Gene</b>	<b>Alteration</b>	<b>Prevalence</b>	<b>ESCAT</b>	<b>References</b>
<i>BRCA1/2</i>	Somatic mutations/deletions	9%	IA	De Bono J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020 <sup>93</sup>
	MSI-H	1%	IC	Cortes-Ciriano I, et al. <i>Nat Commun.</i> 2017 <sup>96</sup> Abida W, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018 <sup>97</sup> Marcus L, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2019 <sup>97</sup>
<i>PTEN</i>	Deletions/mutations	40%	IIA <sup>a</sup>	Abida W, et al. <i>Proc Natl Acad Sci.</i> 2019 <sup>98</sup> De Bono J, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2019 <sup>99</sup> NCT03072238 <sup>100</sup>
<i>ATM</i>	Mutations/deletions	5%	IIA	De Bono J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020 <sup>93</sup>
<i>PALB2</i>	Mutations	1%	IIB	Mateo J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2015 <sup>95</sup> De Bono J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020 <sup>93</sup>
<i>PIK3CA</i>	Hotspot mutations	3%	IIIA	Crumbaker M, et al. <i>Cancers.</i> 2017 <sup>101</sup>
<i>AKT1<sup>E17K</sup></i>	Mutations	1%	IIIA	Crumbaker M, et al. <i>Cancers.</i> 2017 <sup>101</sup>

ESCAT, European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale for Clinical Actionability of molecular Targets; MSI-H, microsatellite instability-high; *PTEN*, phosphatase and tensin homologue.

<sup>a</sup> A press release suggests that AKT inhibitors could work specifically in *PTEN*-mutant prostate cancers. *PTEN* could be upgraded to IA depending on the magnitude of benefit and peer review assessment of the report.



# BIBLIOGRAPHIE



1. **Survol de la technologie de séquençage PGM Ion Torrent | biorigami ».**  
<http://www.biorigami.com/?p=4643> (consulté le 13 octobre 2022).
2. **M. Jean-Louis**  
« Les biomarqueurs moléculaires en oncologie. »,
3. **Sunil Badve, George Louis Kumar**  
Predictive Biomarkers in Oncology\_ Applications in Precision Medicine–Springer International Publishing (2019).pdf », *Google Docs*.  
[https://drive.google.com/file/d/1PViE5LTTxiFb15VqSp6PggkP5CqoscXI/view?usp=drive\\_web&usp=embed\\_facebook](https://drive.google.com/file/d/1PViE5LTTxiFb15VqSp6PggkP5CqoscXI/view?usp=drive_web&usp=embed_facebook) (consulté le 18 février 2023).
4. **Nagwa,**  
« Fiche explicative de la leçon : Mutations génétiques et chromosomiques | Nagwa ». <https://www.nagwa.com/fr/explainers/804197616949/> (consulté le 17 février 2023).
5. **A. Collura, J. H. Lefevre, M. Svrcek, D. Tougeron, A. Zaanan, et A. Duval.**  
« Instabilité des microsatellites et cancer: De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée », *médecine/sciences*, vol. 35, n° 6-7, p. 535-543, juin 2019, doi: 10.1051/medsci/2019093.
6. **AquaPortail.**  
« Aneuploïdie : définition et explications », <https://www.aquaportail.com/definition-11232-aneuploidie.html> (consulté le 17 février 2023).
7. **Anonyme.**  
« Cell Biology Promotion ». <https://www.cellbiol.net/ste/alpHERCEPTIN2.php> (consulté le 17 février 2023).
8. **Caris Life Sciences**  
« Loss of Heterozygosity », <https://www.carislifesciences.com/products-and-services/molecular-profiling/profiling-technologies/whole-exome-sequencing/loss-of-heterozygosity-loh/> (consulté le 17 février 2023).
9. **Anonyme.**  
« Translocation ALK et cancer du poumon ». <https://www.roche.fr/fr/patients/info-patients-cancer/diagnostic-cancer/diagnostic-cancer-poumon/translocation-alk-cancer-poumon.html> (consulté le 17 février 2023).
10. « **The IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer** », *IASLC*.  
<https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-alk-and-ros1-testing-lung-cancer> (consulté le 17 février 2023).

**11. C. Teixidó *et al.***

« RNA Analysis as a Tool to Determine Clinically Relevant Gene Fusions and Splice Variants », *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 142, n° 4, p. 474-479, avr. 2018, doi: 10.5858/arpa.2017-0134-RA.

**12. R. Ferrara, N. Auger, E. Auclin, et B. Besse.**

« Clinical and Translational Implications of RET Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 13, n° 1, p. 27-45, janv. 2018, doi: 10.1016/j.jtho.2017.10.021.

**13. David Jonathan Duncan , Michel Erminio Vandenberghe , Marietta Louise Juanita Scott , Craig Barker**

<< Fast fluorescence in situ hybridisation for the enhanced detection of MET in non-small cell lung cancer | PLOS ONE ».

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223926> (consulté le 17 février 2023).

**14. C. Beadling *et al.***

« A Multiplexed Amplicon Approach for Detecting Gene Fusions by Next-Generation Sequencing », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 18, n° 2, p. 165-175, mars 2016, doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.10.002.

**15. K. K. Shukla, P. Sharma, et S. Misra, Éd.**

*Molecular Diagnostics in Cancer Patients*. Singapore: Springer Singapore, 2019. doi: 10.1007/978-981-13-5877-7.

**16. S. E. McClelland**

« Role of chromosomal instability in cancer progression », *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 24, n° 9, p. T23-T31, sept. 2017, doi: 10.1530/ERC-17-0187.

**17. Y. Zhao *et al.***

« A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening », *Mol. Cell. Probes*, vol. 26, n° 2, p. 66-72, avr. 2012, doi: 10.1016/j.mcp.2012.01.003.

**18. Microbiologie médicale**

« Amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) ».

<https://microbiologiemedicale.fr/biologie-moleculaire-amplification-genique-pcr/> (consulté le 19 février 2023).

**19. George J Netto , Rana D Saad, Peter A Dysert 2nd**

« Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16278751/> (consulté le 17 février 2023).

20. **Philip S Bernard , Carl T Wittwer .**  
« Real-time PCR technology for cancer diagnostics – PubMed ».  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12142370/> (consulté le 17 février 2023).
21. **Nicolas Goossens , Shigeki Nakagawa , Xiaochen Sun , Yujin Hoshida**  
« Cancer biomarker discovery and validation – PubMed ».  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26213686/> (consulté le 17 février 2023).
22. **Lilit Garibyan , Nidhi Avashia**  
« Polymerase chain reaction – PubMed ».  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399825/> (consulté le 17 février 2023).
23. **Peter McInerney, Paul Adams and Masood Z. Hadi**  
« Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase ».  
<https://www.hindawi.com/journals/mbi/2014/287430/> (consulté le 17 février 2023).
24. **érôme D Robin , Andrew T Ludlow , Ryan LaRanger , Woodring E Wright , Jerry W Shay**  
« Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing | Scientific Reports ». <https://www.nature.com/articles/srep24067> (consulté le 17 février 2023).
25. **Rajyalakshmi Luthra**  
« Figure 1. Advantages and challenges of clinical NGS: The advantages and... », *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/figure/Advantages-and-challenges-of-clinical-NGS-The-advantages-and-challenges-associated\\_fig1\\_282911895](https://www.researchgate.net/figure/Advantages-and-challenges-of-clinical-NGS-The-advantages-and-challenges-associated_fig1_282911895) (consulté le 31 octobre 2022).
26. **Pasquale Pisapia , Vincenzo L'Imperio , Francesca Galuppini , Elham Sajjadi , Alessandro Russo , Bruna Cerbelli et al.**  
« The evolving landscape of anatomic pathology », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 178, p. 103776, oct. 2022, doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103776.
27. **S. S et al.**  
« How to read a next-generation sequencing report-what oncologists need to know », *ESMO Open*, vol. 7, n° 5, oct. 2022, doi: 10.1016/j.esmoop.2022.100570.
28. **O. Shetty et al.**  
« Moving Next-Generation Sequencing into the Clinic », *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.*, vol. 42, n° 03, p. 221-228, juin 2021, doi: 10.1055/s-0041-1732854.
29. **Debra G. B. Leonard.**  
*Diagnostic molecular pathology.*

**30. M. Ilie *et al.***

« Les méthodes de séquençage de « nouvelle génération » (NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2014, n° 458, p. 51-58, janv. 2014, doi: 10.1016/S1773-035X(14)72315-9.

**31. T. Hu, N. Chitnis, D. Monos, et A. Dinh**

« Next-generation sequencing technologies: An overview », *Hum. Immunol.*, vol. 82, n° 11, p. 801-811, nov. 2021, doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.

**32. E. R. Mardis**

« Next-Generation Sequencing Platforms », *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 6, n° 1, p. 287-303, 2013, doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.

**33. T. Tucker, M. Marra, et J. M. Friedman**

« Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 85, n° 2, p. 142-154, août 2009, doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022.

**34. J. Shendure et H. Ji**

« Next-generation DNA sequencing », *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, n° 10, p. 1135-1145, oct. 2008, doi: 10.1038/nbt1486.

**35. A. Desai et A. Jere**

« Next-generation sequencing: ready for the clinics? », *Clin. Genet.*, vol. 81, n° 6, p. 503-510, juin 2012, doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x.

**36. N. J. Loman *et al.***

« Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms », *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, n° 5, p. 434-439, mai 2012, doi: 10.1038/nbt.2198.

**37. S. Goodwin, J. D. McPherson, et W. R. McCombie**

« Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 17, n° 6, p. 333-351, mai 2016, doi: 10.1038/nrg.2016.49.

**38. ProfileXpert.**

« Séquençage NGS (séquences courtes, Illumina) », *ProfileXpert*.  
<http://profilexpert.fr/equipements/sequencage-ngs/> (consulté le 11 novembre 2022).

**39. Sijun Liu, Diveena Vijayendran**

« Comparison of the most commonly used next generation sequencing platforms. | Download Table ». [https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-the-most-commonly-used-next-generation-sequencing-platforms\\_tbl1\\_51785299](https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-the-most-commonly-used-next-generation-sequencing-platforms_tbl1_51785299) (consulté le 12 octobre 2022).



40. John Eid , Adrian Fehr, Jeremy Gray, Khai Luong, John Lyle, Geoff Otto, et al .  
« Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19023044/> (consulté le 20 février 2023).
41. F. Cappello *et al.*  
« FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint », *J. Pers. Med.*, vol. 12, n° 5, p. 750, mai 2022, doi: 10.3390/jpm12050750.
42. G. Matthijs *et al.*  
« Guidelines for diagnostic next-generation sequencing », *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, vol. 24, n° 1, p. 2-5, janv. 2016, doi: 10.1038/ejhg.2015.226.
43. E. Masson  
« Le séquençage d'ADN à haut débit en pratique clinique », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/1107813/alertePM> (consulté le 20 février 2023).
44. « Roche FMI landing page ».  
[https://www.foundationmedicine.ro/content/websites/rfm/ro\\_v2/ro/home](https://www.foundationmedicine.ro/content/websites/rfm/ro_v2/ro/home) (consulté le 18 février 2023).
45. Findlay Bewicke-Copley , Emil Arjun Kumar , Giuseppe Palladino , Koorosh Korfi , Jun Wang  
« Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31762958/> (consulté le 18 février 2023).
46. C. Meldrum, M. A. Doyle, et R. W. Tohill  
« Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective », *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 32, n° 4, p. 177-195, nov. 2011.
47. L. Dong *et al.*  
« Clinical Next Generation Sequencing for Precision Medicine in Cancer », *Curr. Genomics*, vol. 16, n° 4, p. 253-263, août 2015, doi: 10.2174/1389202915666150511205313.
48. L. E. MacConaill  
« Existing and emerging technologies for tumor genomic profiling », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 31, n° 15, p. 1815-1824, mai 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.46.5948.

**49. B. A. Weaver et D. W. Cleveland**

« Does aneuploidy cause cancer? », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 18, n° 6, p. 658-667, déc. 2006, doi: 10.1016/j.ceb.2006.10.002.

**50. V. Angerilli, F. Galuppini, F. Pagni, N. Fusco, U. Malapelle, et M. Fassan**

« The Role of the Pathologist in the Next-Generation Era of Tumor Molecular Characterization », *Diagn. Basel Switz.*, vol. 11, n° 2, p. 339, févr. 2021, doi: 10.3390/diagnostics11020339.

**51. M. Fassan**

« Molecular Diagnostics in Pathology: Time for a Next-Generation Pathologist? », *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 142, n° 3, p. 313-320, mars 2018, doi: 10.5858/arpa.2017-0269-RA.

**52. M. Salto-Tellez, J. A. James, et P. W. Hamilton**

« Molecular pathology – the value of an integrative approach », *Mol. Oncol.*, vol. 8, n° 7, p. 1163-1168, oct. 2014, doi: 10.1016/j.molonc.2014.07.021.

**53. I. A. Cree *et al.***

« Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients », *J. Clin. Pathol.*, vol. 67, n° 11, p. 923-931, nov. 2014, doi: 10.1136/jclinpath-2014-202404.

**54. S. Susman *et al.***

« The role of the pathology department in the preanalytical phase of molecular analyses », *Cancer Manag. Res.*, vol. 10, p. 745-753, avr. 2018, doi: 10.2147/CMAR.S150851.

**55. Y. Bai *et al.*,**

« Quantitative assessment shows loss of antigenic epitopes as a function of pre-analytic variables », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 91, n° 8, p. 1253-1261, août 2011, doi: 10.1038/labinvest.2011.75.

**56. M. B. Freidin, N. Bhudia, E. Lim, A. G. Nicholson, W. O. Cookson, et M. F. Moffatt,**

« Impact of collection and storage of lung tumor tissue on whole genome expression profiling », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 14, n° 2, p. 140-148, 2012, doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.002.

**57. N. S. Goldstein, S. M. Hewitt, C. R. Taylor, H. Yaziji, D. G. Hicks,**

et Members of Ad-Hoc Committee On Immunohistochemistry Standardization,  
« Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry », *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM*, vol. 15, n° 2, p. 124-133, juin 2007, doi: 10.1097/PAI.0b013e31804c7283.

58. **D. G. Hicks et B. F. Boyce,**  
« The challenge and importance of standardizing pre-analytical variables in surgical pathology specimens for clinical care and translational research », *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.*, vol. 87, n° 1, p. 14-17, janv. 2012, doi: 10.3109/10520295.2011.591832.
59. **Febe Van Maldegem et al.**  
« Effects of processing delay, formalin fixation, and immunohistochemistry on RNA Recovery From Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18303406/> (consulté le 16 février 2023).
60. **G. Bussolati, L. Annaratone, E. Medico, G. D'Armento, et A. Sapino,**  
« Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity », *PLoS One*, vol. 6, n° 6, p. e21043, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0021043.
61. **A. J. Nuovo, M. Garofalo, A. Mikhail, A. F. Nicol, C. Vianna-Andrade, et G. J. Nuovo,**  
« The effect of aging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on the in situ hybridization and immunohistochemistry signals in cervical lesions », *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B*, vol. 22, n° 3, p. 164-173, sept. 2013, doi: 10.1097/PDM.0b013e3182823701.
62. **Danielle Mercatante Carrick et al.**  
« Robustness of Next Generation Sequencing on Older Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26222067/> (consulté le 18 février 2023).
63. **O. C. J. Schuurbijs, M. G. Looijen-Salamon, M. J. L. Ligtenberg, et H. F. M. van der Heijden,** « A brief retrospective report on the feasibility of epidermal growth factor receptor and KRAS mutation analysis in transesophageal ultrasound- and endobronchial ultrasound-guided fine needle cytological aspirates », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 5, n° 10, p. 1664-1667, oct. 2010, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f0bd93.
64. **P. Bruno et al.,**  
« Reliability of direct sequencing of EGFR: comparison between cytological and histological samples from the same patient », *Anticancer Res.*, vol. 31, n° 12, p. 4207-4210, déc. 2011.
65. **P.-L. Sun, Y. Jin, H. Kim, C.-T. Lee, S. Jheon, et J.-H. Chung,**  
« High concordance of EGFR mutation status between histologic and corresponding cytologic specimens of lung adenocarcinomas », *Cancer Cytopathol.*, vol. 121, n° 6, p. 311-319, juin 2013, doi: 10.1002/cncy.21260.
66. « **Mitiushkina NV, Iyevleva AG, Poltoratskiy AN, et al.**

Detection of EGFR mutations and EML4–ALK rearrangements in lung adenocarcinomas using archived cytological slides. *Cancer Cytopathol* 2013;121:370–6.

67. **E. Vigliar, U. Malapelle, C. de Luca, C. Bellevicine, et G. Troncione,**  
« Challenges and opportunities of next-generation sequencing: a cytopathologist's perspective », *Cytopathol. Off. J. Br. Soc. Clin. Cytol.*, vol. 26, n° 5, p. 271-283, oct. 2015, doi: 10.1111/cyt.12265.
68. **Aldo Scarpa et al.**  
« Molecular Typing of Lung Adenocarcinoma on Cytological Samples Using a Multigene Next Generation Sequencing Panel – PMC ».  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827450/> (consulté le 18 février 2023).
69. **Ferga C Gleeson et al.**  
« Targeted next generation sequencing of endoscopic ultrasound acquired cytology from ampullary and pancreatic adenocarcinoma has the potential to aid patient stratification for optimal therapy selection – PMC ».  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5342360/> (consulté le 18 février 2023).
70. **C. Astaras, A. Dolcan, B. Bisig, et K. Zaman,**  
« La biopsie liquide, une nouvelle opportunité pour l'oncologie personnalisée », *Rev Med Suisse*, vol. 607, p. 1028-1032, mai 2018.
71. **C. L. Wickham et al.,**  
« Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies », *Mol. Pathol. MP*, vol. 53, n° 1, p. 19-23, févr. 2000, doi: 10.1136/mp.53.1.19.
72. **D. de Jong, S. L. Verbeke, D. Meijer, P. C. Hogendoorn, J. V. Bovee, et K. Szuhai,**  
« Opening the archives for state of the art tumour genetic research: sample processing for array–CGH using decalcified, formalin–fixed, paraffin–embedded tissue–derived DNA samples », *BMC Res. Notes*, vol. 4, p. 1, janv. 2011, doi: 10.1186/1756-0500-4-1.
73. **V. M. Singh et al.,**  
« Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies », *Ann. Diagn. Pathol.*, vol. 17, n° 4, p. 322-326, août 2013, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2013.02.001.
74. **G. Marceddu et al.,**

« appMAGI: A complete laboratory information management system for clinical diagnostics », *Acta Bio Medica Atenei Parm.*, vol. 91, n° Suppl 13, p. e2020015, 2020, doi: 10.23750/abm.v91i13-S.10521.

**75. S. Glaysher *et al.*,**

« Molecular basis of chemosensitivity of platinum pre-treated ovarian cancer to chemotherapy », *Br. J. Cancer*, vol. 103, n° 5, p. 656-662, août 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605817.

**76. Salli Schwartz**

« The-Power-of-biomarkers ». <https://emea.illumina.com/destination/Power-Biomarkers.html?scid=2021-271PPC5114&catt=Online%20Advertising%20-%20Google%20Adwords> (consulté le 16 février 2023).

**77. Marilyn M Li *et al.***

« Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27993330/> (consulté le 16 février 2023).

**78. Heng Li *et al.***

« Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20080505/> (consulté le 16 février 2023).

**79. L. J. Jennings *et al.*,**

« Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 19, n° 3, p. 341-365, mai 2017, doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.01.011.

**80. Hongdo Do *et al.***

« Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase – PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22643842/> (consulté le 16 février 2023).

**81. C. M. McCall *et al.*,**

« False positives in multiplex PCR-based next-generation sequencing have unique signatures », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 16, no 5, p. 541-549, sept. 2014, doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.06.001.

**82. S. Roy *et al.*,**

« Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 20, n° 1, p. 4-27, janv. 2018, doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.003.

**83. J. H. J. M. van Krieken *et al.*,**

« Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936 », *Leukemia*, vol. 21, n° 2, p. 201-206, févr. 2007, doi: 10.1038/sj.leu.2404467.

**84. E. Thunnissen *et al.*,**

« The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group », *Lung Cancer Amst. Neth.*, vol. 76, n° 1, p. 1-18, avr. 2012, doi: 10.1016/j.lungcan.2011.10.017.

**85. L. Tembuysen, M. J. L. Ligtenberg, N. Normanno, S. Delen, J. H. van Krieken,**

et E. M. C. Dequeker, « Higher quality of molecular testing, an unfulfilled priority: Results from external quality assessment for KRAS mutation testing in colorectal cancer », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 16, n° 3, p. 371-377, mai 2014, doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.01.003.

**86. C. Rolfo *et al.*,**

« Multidisciplinary molecular tumour board: a tool to improve clinical practice and selection accrual for clinical trials in patients with cancer », *ESMO Open*, vol. 3, n° 5, p. e000398, 2018, doi: 10.1136/esmoopen-2018-000398.

**87. W. Sullivan, D. G. Evans, W. G. Newman, S. C. Ramsden, H. Scheffer, et K. Payne,**

« Developing national guidance on genetic testing for breast cancer predisposition: the role of economic evidence? », *Genet. Test. Mol. Biomark.*, vol. 16, n° 6, p. 580-591, juin 2012, doi: 10.1089/gtmb.2011.0236.

**88. F. Di Nicolantonio *et al.*,**

« Cancer cell adaptation to chemotherapy », *BMC Cancer*, vol. 5, n° 1, p. 78, juill. 2005, doi: 10.1186/1471-2407-5-78.

**89. E. Crowley, F. Di Nicolantonio, F.**

Loupakis, et A. Bardelli, « Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 10, n° 8, p. 472-484, août 2013, doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.

**90. Luis A Diaz Jr *et al.***

« The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in

colorectal cancers | Nature ». <https://www.nature.com/articles/nature11219> (consulté le 15 février 2023).

**91. S. Misale *et al.*,**

« Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer », *Nature*, vol. 486, n° 7404, p. 532-536, juin 2012, doi: 10.1038/nature11156.

**92. S. Kato *et al.*,**

« Real-world data from a molecular tumor board demonstrates improved outcomes with a precision N-of-One strategy », *Nat. Commun.*, vol. 11, n° 1, p. 4965, oct. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18613-3.

**93. E. Masson,**

« Place du NGS (Next Generation Sequencing) et de l'ADN tumoral circulant dans le testing moléculaire des cancers bronchiques », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/1029694/place-du-ngs-next-generation-sequencing-et-de-l-ad> (consulté le 13 octobre 2022).

**94. M. Chen et H. Zhao,**

« Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection », *Hum. Genomics*, vol. 13, n° 1, p. 34, déc. 2019, doi: 10.1186/s40246-019-0220-8.

**95. M. M. Li *et al.*,**

« Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 19, n° 1, p. 4-23, janv. 2017, doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.

**96. A. P. Sokolenko et E. N. Imyanitov,**

« Molecular Diagnostics in Clinical Oncology », *Front. Mol. Biosci.*, vol. 5, p. 76, 2018, doi: 10.3389/fmolb.2018.00076.

**97. S. De et S. Ganesan,**

« Looking beyond drivers and passengers in cancer genome sequencing data », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 28, n° 5, p. 938-945, mai 2017, doi: 10.1093/annonc/mdw677.

**98. C. Morton, D. Sarker, et P.**

Ross, « Next-generation sequencing and molecular therapy », *Clin. Med. Lond. Engl.*, vol. 23, n° 1, p. 65-69, janv. 2023, doi: 10.7861/clinmed.2022-0514.

**99. A. Perrier *et al.*,**

« En marche vers une oncologie personnalisée : l'apport des techniques génomiques et de l'intelligence artificielle dans l'usage des biomarqueurs tumoraux circulants », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 109, n° 2, p. 170-184, févr. 2022, doi: 10.1016/j.bulcan.2021.12.005.



## قسم الطبيب

### أقسم بالله العظيم

أن أراقب الله في مهنتي.

وأن أصون حياة الإنسان في كافة أطوارها في كل الظروف

والأحوال باذلة وسعي في انقاذها من الهلاك والمرض

والألم والقلق.

وأن أحفظ للناس كرامتهم، وأستر عورتهم، وأكتم سرهم.

وأن أكون على الدوام من وسائل رحمة الله، باذلة رعايتي الطبية للقريب والبعيد،

للصالح والطالح، والصديق والعدو.

وأن أثابر على طلب العلم، وأسخره لنفع الإنسان لا لأذاه.

وأن أوقر من علمني، وأعلم من يصغرنني، وأكون أختا لكل زميل في المهنة

الطبية متعاونين على البر والتقوى.

وأن تكون حياتي مصداق إيماني في سري وعلانيتي،

نقية مما يشينها تجاه الله ورسوله والمؤمنين.

والله على ما أقول شهيد

سنة 2023

أطروحة رقم 045

أساليب التسلسل المتقدمة في علم التشريح المرضي :  
الفوائد - التقنيات - التوصيات في عام 2022

الأطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم 2023/02/28

من طرف

الآنسة سلمى القباچ

المزداة في 17 غشت 1997 بمراكش

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية

علم الأمراض الجزيئي - العلامات الحيوية - الطب الدقيق

اللجنة

الرئيسة

ح.الرايس

السيدة

أستاذة في علم التشريح المرضي

أ.بلباشير

السيد

المشرف

أستاذ في علم التشريح المرضي

غ.بلبركة

السيدة

أستاذة في علم الأورام الطبية

أ.لقميشي

السيد

أستاذ في جراحة المسالك البولية

أ.فخري

السيد

الحكام

أستاذ مبرز في علم الأنسجة والأجنة و الخلايا الجينية

