

INFORMATION

Séquençage des génomes et médecine personnalisée : perspectives et limites.

MOTS-CLÉS : GÉNOME HUMAIN. GÉNOMIQUE. ANALYSE DE MUTATIONS D'ADN. MODÈLES GÉNÉTIQUES

Genome sequencing and personalized medicine : perspectives and limitations

KEY-WORDS: GENOME, HUMAN. GENOMICS. DNA MUTATIONAL ANALYSIS. MODELS, GENETIC

Jean-Yves LE GALL et Patrice DEBRÉ (Rapporteurs)

Au nom de la commission I (Biologie)

Membres de la Commission I :

Membres titulaires : M^{mes} Adolphe, Marcelli, MM. Ardaillou, Baulieu, Cabanis, Cazenave, Denis, Dreux, Galibert, Hauw, Launois, Le Gall J.Y (Président), Milgrom, Montagnier, Netter, Nezelof, Nicolas J.P., Parodi, Pessac, Ronco, Rosset, Sraer, Tiollais, Vincent.

Membres correspondants : M^{mes} Dejean-Assemat, Évain-Brion, Junien, Morel, Cartier-Lacave, Zitvogel, MM. Bastide, Bioulac, Brice, Debré (Secrétaire), Delmas, Delpéch, Douay, Dussaule, Friedlander, Jeanteur, Le Bouc, Ludes, Maquart, Soubrier, Stoltz, Swynghedauw, Vigneron, Thèze.

Membres invités : M^{me} Lecomte, MM Chouard, Mattéi, Rochefort.

RÉSUMÉ

L'évolution technique du séquençage des ADN s'est faite avec une rapidité exponentielle au cours des dernières années (2001 : première séquence d'un génome humain, résultat de plusieurs années d'efforts de quelques dizaines de laboratoires internationaux et de plusieurs dizaines de millions de dollars ; 2013 : séquençage d'un génome en 24 heures, séquençage d'un exome en quelques heures et pour un coût de l'ordre de quelques centaines d'euros). La diffusion dans les laboratoires hospitaliers des nouveaux appareils de séquençage à haut débit (ou NGS) permet de passer de l'étude ponctuelle d'un gène à une analyse globale portant sur des dizaines ou centaines de gènes ou sur l'ensemble de l'exome ; elle modifie de ce fait les concepts médicaux et les conditions d'exercice, notamment en génétique et en oncologie.

Cette possibilité d'une recherche simultanée de mutations dans la séquence d'un grand nombre de gènes trouve aujourd'hui ses applications dans le diagnostic, éventuellement néonatal, des maladies mendéliennes, dans le dépistage systématique des hétérozygotes et le diagnostic préconceptionnel généralisé ; en outre la sensibilité des NGS est telle qu'elle permet également l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel (cell free fetal DNA ou cffDNA) c'est-à-dire le diagnostic non invasif du sexe fœtal (et des maladies liées à l'X), du rhésus fœtal chez les femmes rhésus négatif, des trisomies et dans un avenir proche des mutations mendéliennes. Dans le cas des maladies multifactorielles, les résultats sont encore préliminaires ; ils devraient conduire à l'identification des facteurs de prédisposition génétique « forts », ayant jusqu'à présent échappé aux études d'associations (« Genome Wide Association Studies ou GWAS »). En oncogénétique constitutionnelle, les NGS réalisent également l'analyse simultanée des gènes impliqués dans les formes « héréditaires » de cancers (21 gènes des cancers du sein, 6 gènes des cancers du colon...). Par ailleurs dans l'ensemble des affections malignes (hémopathies et tumeurs), les NGS identifient l'ensemble des anomalies génomiques (délétions, translocations, mutations) affectant le tissu malade, en s'efforçant de faire la distinction entre mutations « drivers » importantes pour la progression tumorale et mutations « passagers » ou accessoires ; en s'efforçant également d'identifier des mutations « druggable » susceptibles de faire l'objet de thérapeutiques ciblées (imatinib et réarrangement Bcr/Abl, verumafenib et mutation BRAF V600E.....). Enfin le séquençage systématique de l'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse aux médicaments est le support d'une pharmacogénétique individuelle. En définitive, le séquençage des génomes tumoraux et constitutionnels, l'identification des mutations somatiques, la détermination des variants pharmacogénétiques, sont les éléments déterminants d'une médecine dite personnalisée. Les premiers résultats de ces indications thérapeutiques ciblées montrent un gain en termes de durée de rémission et de survie ; reste néanmoins posée la question du coût de ces traitements. Ces énormes capacités de séquençage des génomes soulèvent également un grand nombre de questions réglementaires et éthiques.

SUMMARY

DNA sequencing technologies have advanced at an exponential rate in recent years: the first human genome was sequenced in 2001 after many years of effort by dozens of international laboratories at a cost of tens of millions of dollars, while in 2013 a genome can be sequenced within 24 hours for a few hundred dollars (exome sequencing takes only a few hours). More and more hospital laboratories are acquiring new high-throughput sequencing devices ("next-generation sequencers", NGS), allowing them to analyze tens or hundreds of genes, or even the entire exome. This is having a major impact on medical concepts and practices, especially with respect to genetics and oncology. This ability to search for mutations simultaneously in a large number of genes is finding applications in the diagnosis of Mendelian diseases (including at birth), routine screening for heterozygotes, and pre-conception diagnosis. NGS is now sufficiently sensitive to analyze circulating fetal DNA in maternal blood (cell-free fetal DNA, cffDNA), enabling applications such as non invasive diagnosis of fetal sex (and X-linked diseases), fetal rhesus among rhesus-negative women, trisomy and, in the near future, Mendelian mutations. Data on multifactorial diseases are still preliminary, but it should soon be possible to identify "strong" factors of genetic predisposition that have so far been beyond the scope of genome-wide association studies (GWAS). In the field of constitutional oncogenetics, NGS can also be used for simultaneous analysis of genes involved in "hereditary" cancers (21 breast cancer genes, 6 colon

cancer genes, etc.). More generally, NGS can identify all genomic abnormalities (deletions, translocations, mutations) in a given malignant tissue (hemopathy or solid tumor), and has the potential to distinguish between important mutations (those that drive tumor progression) from “ bystander ” or accessory mutations, and also to identify “ druggable ” mutations amenable to targeted therapies (e.g. imatinib and Bcr/Abl rearrangement ; vemurafenib and the BRAF V600E mutation). Systematic sequencing of all the genes involved in drug metabolism and responsiveness will lead to individualized pharmacogenetics. Finally, sequencing of the tumoral and constitutional genomes, identification of somatic mutations, and detection of pharmacogenetic variants will open up the era of personalized medicine. The first results of these targeted therapeutic indications show a gain in the duration of remission and survival, although the cost-effectiveness of these approaches remains to be determined. Finally, this huge capacity for genome sequencing raises a number of regulatory and ethical issues.

INTRODUCTION

En biologie, l'évolution technique et technologique est constante et continue, mais dans le cas du séquençage des ADN elle se fait avec une rapidité exponentielle, modifiant en permanence les concepts et les conditions de l'exercice médical, notamment en cancérologie et en génétique, et soulevant ainsi un grand nombre de questions réglementaires et éthiques. Cette évolution a déjà suscité trois rapports récents de l'Académie nationale de médecine [1-3]. L'apparition et la diffusion dans les laboratoires hospitaliers des nouveaux appareillages de séquençage dits à haut débit conduisent aujourd'hui à prendre en compte au cours d'une démarche médicale, l'ensemble du génome ou de ses principaux composants ; de ces moyens analytiques puissants et performants découle pour une large part le concept de médecine personnalisée c'est-à-dire la notion qu'un tableau médical est largement conditionné ou modulé par les caractéristiques génétiques individuelles constitutionnelles ou somatiques. Le présent rapport a pour objet de faire une mise au point sur le séquençage à haut débit et certaines de ses principales applications actuelles. Ces applications ont été sélectionnées, les unes (diagnostics prénataux, préimplantatoires ou préconceptionnels) pour leur importance en prévention et les débats qu'elles ouvrent au niveau sociétal, les autres pour l'aide qu'elles apportent au diagnostic ou à l'identification des maladies mendéliennes, ainsi qu'à la caractérisation des facteurs génétiques en cause dans la survenue de certaines pathologies multifactorielles. Une attention particulière a été apportée à l'oncologie, car ces technologies représentent une aide à la fois au dépistage des cancers héréditaires et à l'identification des mutations somatiques susceptibles de bénéficier de nouvelles interventions thérapeutiques. Le choix de ces applications ne préjuge en rien d'autres indications, telles la pharmacogénétique ou l'épigénétique, où ces technologies sont également déterminantes dans le développement d'une médecine dite personnalisée c'est-à-dire dont les indications thérapeutiques sont adaptées aux caractéristiques génétiques constitutionnelles et somatiques d'un patient donné.

I. TECHNIQUES DE SÉQUENCAGE À HAUT DÉBIT

Les progrès technologiques des dernières années ont fait apparaître une nouvelle génération de séquenceurs dits à haut débit (technologie NGS ou *new generation sequencing*) : Roche 454, Solexa Illumina, Solid Applied Biosystems, Ions Torrent, Proton Technology, Graphen, etc. et dont l'évolution est constante et très rapide ; les appareils Torrent et Proton analysent les résultats d'une réaction classique d'élongation d'une amorce (réaction type Sanger aux didesoxynucléotides) ; en revanche la détection de l'incorporation d'un nucléotide supplémentaire à la matrice ne met pas en jeu la détection d'une fluorescence induite secondairement (Roche) ou directe (Solexa et Solid) mais d'un changement de charge par un semi-conducteur ; le fonctionnement du Graphen est basé sur l'ultra-filtration de fragments d'ADN à travers les nanopores d'une membrane, etc. En fait le marché se différencie en deux grands types de machines en fonction de leurs performances quantitatives : machines haut de gamme, dont le coût est de l'ordre de 500 000 euros, capables de séquencer un génome humain complet dont l'assemblage et l'analyse se fera en 5 à 10 jours (pour un prix de réactifs d'environ 15 000 euros mais auxquels il faut ajouter les frais de personnel, d'analyse bioinformatique et d'amortissement de l'appareillage) et appareils aux capacités beaucoup plus limitées, dont le coût est de 50 à 100 000 euros, mais plus rapides et mieux adaptés à l'utilisation clinique [4]. Le domaine du séquençage haut débit (NGS) est en fait en pleine évolution technologique susceptible même de conduire à la mise au point d'appareils à usage unique. Sur ce marché aux multiples applications potentielles se positionnent de nombreuses entreprises de biotechnologies, en particulier aux États-Unis.

Les méthodes de séquençage classique des ADN de grande taille sont basées sur la technique du *shotgun*, c'est-à-dire sur leur coupure au hasard en petits fragments, suivie habituellement de leur clonage avant leur séquençage ; en revanche les NGS se sont affranchies de cette dernière contrainte grâce à l'ultra parallélisation des réactions de séquençage. L'assemblage des séquences obtenues pour reconstituer la séquence originelle nécessite un traitement bioinformatique performant et impliquant plusieurs étapes : alignement de la séquence brute sur un génome de référence, contrôle de qualité, identification de variants, annotation de ces variants (positionnement dans un exon, un intron), enfin filtrage pour retenir les variants potentiellement candidats dans une pathologie. Les principales difficultés sont dues à l'existence de multiples polymorphismes, de nombreuses séquences répétées, de familles multigéniques et de très nombreuses erreurs dans les bases de données existantes.... En fait les capacités de séquençage des NGS ont progressé beaucoup plus vite que les capacités d'interprétation des résultats obtenus. La précision de cette séquence et de son assemblage dépend en premier lieu de la couverture (71 Mb, soit environ 2 % du génome, pour l'ensemble des exons et des parties 3' et 5' non traduites des ARN messagers) : une couverture trop faible expose au risque de ne pas avoir séquencé la région d'intérêt ; elle dépend par ailleurs en grande partie d'une profondeur suffi-

sante (nombre de séquences effectuées pour une même région) sachant d'une part qu'une profondeur ou redondance de 100 correspond à un taux d'erreur d'environ 1 pour 10 000 (soit 60 000 erreurs pour un génome entier), et d'autre part que la profondeur annoncée est celle d'une valeur moyenne, certaines régions étant couvertes 100 à 200 fois et d'autres ne bénéficiant que de 10 ou 20 lectures [5].

Une question encore controversée est celle des coûts, les chiffres avancés ne prenant habituellement en compte que le prix des réactifs (quelques milliers d'euros pour un génome entier) ; en fait il faut y rajouter celui de l'interprétation bioinformatique, ainsi que l'amortissement de la machine, les frais de personnel et d'entretien. En pratique médicale le prix de revient est largement conditionné par le type de stratégie diagnostique utilisée : séquençage ciblé sur un groupe de gènes (50 à 500, 1Mb), séquençage de l'exome (25 000, 50Mb) ou séquençage de l'ensemble du génome (6000 Mb), et par les conditions de fonctionnement de l'organisme effectuant le séquençage (laboratoire hospitalier ou privé, firme de biotechnologie, etc.).

II. MALADIES GÉNÉTIQUES MENDELIENNES

A. Tests préconceptionnels et dépistage des hétérozygotes

Dans notre pays, le dépistage préconceptionnel des couples à risque de maladies héréditaires monogéniques s'effectue dans le cadre d'un conseil génétique s'il existe un cas index dans la famille. Mais dans quelques populations présentant une forte prévalence de certaines affections héréditaires le dépistage des hétérozygotes est devenu depuis longtemps systématique : β thalassémies dans les pays méditerranéens et maladie de Tays-Sachs dans la communauté juive Ashkénase des États-Unis. À Chypre, le dépistage de la β thalassémie a fait baisser le nombre de cas de 51 en 1974 à simplement 5 entre 1991 et 2001 ; aucun cas n'a été observé entre 2002 et 2007. Aux États-Unis 1379 couples à risque de Tays-Sachs ont été identifiés (aboutissant soit à la non réalisation de l'union projetée, soit à un diagnostic prénatal, soit à un diagnostic préimplantatoire) et l'incidence de la maladie a diminué de 90 % ; dans cette communauté juive le programme de dépistage a été étendu à 16 autres maladies récessives. En Israël, la détection systématique est recommandée pour 8 maladies dont la fréquence des hétérozygotes est supérieure à 1/60 et gratuite pour 4 d'entre elles (mucoviscidose, Tays-Sachs, dysautonomie familiale, thalassémie) ; elle est également encouragée pour des maladies dont la fréquence des hétérozygotes est supérieure à 1/110 (Nieman Pick, glycogénoses, etc.). Aux États-Unis le dépistage des hétérozygotes est recommandé pour des maladies fréquentes comme la mucoviscidose ou l'amyotrophie spinale ; la firme « Genzyme genetics » propose ainsi un test pour 98 des mutations les plus fréquentes du gène CFTR (un couple à risque sur 1 400).

En France, le dépistage néonatal systématique concerne cinq maladies : mucoviscidose, phénylcétonurie, hypothyroïdies, hyperplasies congénitales des surrénales et

drépanocytose ; il s'agit d'un dépistage biologique des homozygotes. L'apparition des techniques de séquençage à haut débit est susceptible d'entraîner le passage à un dépistage neonatal génotypique, identifiant également de ce fait les hétérozygotes et éventuellement étendu à plusieurs centaines de maladies dont les gènes et les mutations pathogènes sont connus et ceci pour moins de 400 dollars [6]. Les NGS rendent ainsi possible le diagnostic préconceptionnel généralisé, ce qui soulève de multiples questions tant éthiques que socio-économiques. Sur un tel marché potentiel se positionnent dès à présent des firmes commercialisant des DTC (Direct Test to Consumer). Ainsi « Amby Screen » propose le dépistage de 75 maladies pédiatriques à transmission récessive ou liée à l'X. « 23 and me » offre un test plus étendu incluant, outre le génotypage de mutations responsables de maladies monogéniques, la recherche de polymorphismes associés à des maladies dites plurifactorielles et un profil pharmacogénétique, et cela pour 99 dollars.

B. Diagnostic prénatal et préimplantatoire

Les diagnostics prénataux ne peuvent être pratiqués dans notre pays que dans un cadre réglementaire strict par des centres pluridisciplinaires et des laboratoires agréés ; dans le cas du diagnostic préimplantatoire seuls quatre centres sont autorisés par l'Agence de Biomédecine : Paris, Strasbourg, Montpellier et Nantes. Les indications diagnostiques sont restreintes puisque la loi n'autorise l'interruption de grossesse que pour une affection d'une particulière gravité et reconnue comme incurable. Le rapport 2010 de l'Agence fait état de 55 000 diagnostics prénataux en cytogénétique (essentiellement recherche de trisomie) dont près de 4 000 positifs et de 2 750 en génétique moléculaire dont 544 positifs. Le diagnostic prénatal est effectué sur biopsie de trophoblaste à 12 semaines d'aménorrhée (entraînant 1 à 2 % d'avortements), sur cellules amniotiques à 16 semaines (0,2 à 0,5 % d'avortements), sur sang fœtal après 20 semaines (3 % d'avortements) ou sur tissu fœtal au troisième trimestre de la grossesse. Un diagnostic préimplantatoire nécessite une stimulation ovarienne hormonale, la collecte d'ovules suivie d'insémination artificielle, une biopsie embryonnaire au troisième jour (J3), un diagnostic en 24-48 heures (caryotype avec hybridation *in situ* ou recherche d'une mutation) et un transfert *in utero* de 1 à 3 embryons sains à J4/J5 ; chacune de ces étapes comporte un pourcentage d'échecs important et en définitive le nombre de grossesses ainsi obtenu est faible [7].

Les pertes fœtales liées aux prélèvements invasifs pratiqués pour le diagnostic prénatal sont estimées entre 300 et 600 par an, d'où l'intérêt majeur d'un diagnostic non invasif par analyse des acides nucléiques fœtaux circulant dans le sang maternel. La présence d'ADN fœtal ou cfDNA (cell free fetal DNA) dans le sang maternel a été démontrée en 1997 et sa concentration estimée à plus de 10 % de l'ADN total circulant ; il disparaît rapidement du sang maternel après l'accouchement, contrairement aux cellules mononuclées fœtales qui pourraient persister plusieurs années. Détectable dès 5 à 6 semaines d'aménorrhée, il a une origine trophoblastique ou placentaire, et provient sans doute de cellules en apoptose ; il est

constitué majoritairement de petits fragments dont la taille moyenne est de 143 bases, ce qui correspond à la longueur d'ADN enroulé sur un nucléosome. La première application de l'analyse de l'ADN fœtal du sang maternel a été la détermination du sexe du fœtus et potentiellement des maladies liées à l'X : il s'agit d'un examen inscrit à la nomenclature des actes de biologie (B500). En 2011 la HAS a également donné un avis favorable à la prise en charge de la détermination du rhésus fœtal chez les femmes rhésus négatif : actuellement environ 6000 examens par an, mais il s'agit d'un « marché » potentiel de 160 à 180 000 tests annuels. En utilisant des « primers » spécifiques il était également possible de faire différents diagnostics ciblés (β thalassémie, hémophilie A...). L'apparition des techniques de séquençage à haut débit, en séquençant à la fois l'ADN circulant maternel et l'ADN fœtal et en déterminant leurs proportions relatives (par détermination des SNPs pour reconstituer les haplotypes), a ouvert de nouvelles perspectives : diagnostic des maladies génétiques et surtout des aneuploïdies [8, 9]. La recherche d'une trisomie repose sur la mise en évidence d'un petit excès de matériel provenant de ce chromosome par rapport à l'ADN maternel ; il implique un séquençage aléatoire des petits fragments d'ADN avec une grande profondeur suivi d'une analyse bioinformatique complexe. Les premiers résultats récemment publiés sont très bons pour la trisomie 21 (sensibilité 100 % et 0,1 % de faux positifs) et la trisomie 18 (sensibilité 100 % et 0,3 % de faux positifs), sensiblement moins performants en cas de trisomie 13 (sensibilité de 91,4 % et 0,9 % de faux positifs). Bien entendu les possibilités offertes par les NGS dans ce domaine vont se multiplier ; elles devraient pouvoir également s'appliquer dans l'avenir au diagnostic préimplantatoire, mais aussi à la détection des petites délétions et des variations du nombre de copies ou CNV (« Copy Number Variation »), restreignant ainsi le champ de la cytogénétique classique [10].

C. Diagnostic des maladies mendéliennes

L'apparition des techniques de séquençage à haut débit a fait changer d'échelle la stratégie diagnostique des maladies monogéniques, en substituant à la recherche ponctuelle des mutations connues ou les plus fréquentes dans un ou quelques gènes, la détection simultanée de quasiment toutes les mutations dans des centaines de gènes et ceci avec une réduction considérable des temps d'analyse et donc des coûts.

En pratique médicale le séquençage NGS est habituellement mis en œuvre, non pas sur le génome entier pour des raisons de prix et surtout des difficultés d'interprétation, mais soit sur un groupe de gènes dont les mutations sont à l'origine d'un même phénotype pathologique (paraplégie spasmodique : plus de 50 gènes, cardiomyopathies : plus de 15 gènes, rétinopathies...) soit sur l'exome [11, 12]. Un bon exemple illustrant ces deux situations est celui des paraparésies spastiques familiales : il s'agit d'un groupe de maladies neurologiques rares (prévalence de 1 à 10 pour 100 000) caractérisées par une spasticité des membres inférieurs en raison d'un syndrome pyramidal ; elles se présentent sous deux grands types de formes : des formes pures sans signes neurologiques additionnels et avec une imagerie cérébrale (IRM, scan-

ner) normale et des formes complexes associées avec différents autres signes neurologiques et dans certains cas une imagerie cérébrale anormale. Les paraparésies spastiques sont également hétérogènes sur le plan génétique avec des formes à transmission autosomique dominante ou récessive et quelques formes à transmission liée à l’X, et cela sous la dépendance d’une cinquantaine de gènes dont 24 ont été identifiés à ce jour. Dans les formes à transmission dominante les anomalies des gènes SPG4 et SPG3A expliquent plus de la moitié des cas ; dans les formes récessives le gène SPG11 est le plus fréquemment en cause (21 %) mais plus de 60 % des cas sont encore d’origine inconnue. Sur le plan physiopathologique la maladie est due à une dégénérescence progressive du faisceau pyramidal ; l’identification partielle des gènes impliqués éclaire les mécanismes en cause qui peuvent être classés en cinq grands groupes d’anomalies : trafic intracellulaire, transport axonal, myélinisation, fonctions mitochondriales et métabolisme des lipides complexes [13]. Dans un cadre de recherche, en l’absence d’anomalie d’un gène SPG déjà identifié, la stratégie utilisée combine habituellement des études de liaison et le séquençage haut débit d’une région chromosomique ou surtout de l’exome complet [14, 15]. L’exclusion des gènes connus fait appel de plus en plus au séquençage à moyen débit qui permet de les explorer simultanément par des techniques d’amplification multiplexe ou de capture. L’étape suivante est le séquençage de l’exome qui caractérise en fait par individu 8 à 10 000 variants non synonymes dont 2 à 300 variants d’épissage et 80 à 100 variants générant un codon stop dont une vingtaine à l’état homozygote ; mais dans la quasi-totalité des cas ces gènes avec perte de fonction ne sont pas responsables du phénotype observé, ils appartiennent le plus souvent à des familles multigéniques dont les membres ont une grande similitude de séquence et des fonctions potentiellement redondantes [16]. Quoiqu’il en soit la complexité des résultats bruts obtenus explique la nécessité d’étapes supplémentaires bioinformatiques d’interrogation des banques de données et de tri successif des variants, enfin de validation biofonctionnelle de la mutation retenue. Néanmoins le séquençage de l’exome n’est pas toujours couronné de succès : la mutation pathologique est-elle localisée dans un intron ou dans une zone régulatrice à distance des séquences codantes ? S’agit-il d’une expansion de séquences répétées ? Cette situation d’échec peut relever d’un séquençage du génome entier, dont l’interprétation reste très délicate. Les connaissances acquises en recherche peuvent maintenant être utilisées pour améliorer le diagnostic. Dans des pathologies très hétérogènes comme les paraparésies spastiques, la tendance actuelle est au développement des outils de moyen débit qui couvrent l’ensemble des gènes connus responsables d’une ou d’un groupe de maladies. Même si l’aspect technique est bien contrôlé (couverture de la région, profondeur et qualité du séquençage), le défi reste d’identifier le variant causal parmi les nombreux variants détectés. En outre il est possible que certaines formes résultent non pas de l’anomalie d’un seul gène mais de di voire de trigénisme. L’analyse directe de l’exome en première intention n’est donc pas encore une option, en raison de son coût et de la couverture inégale des exons ; néanmoins, ces limitations risquent d’évoluer rapidement dans un avenir proche.

Un autre exemple de l'intérêt du NGS est celui des MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), formes monogéniques les plus fréquentes du diabète de type II : dues à un dysfonctionnement des cellules β des îlots de Langerhans responsable d'une sécrétion insuffisante d'insuline, ces diabètes non auto-immuns sont diagnostiqués avant 25 ans et sont à transmission autosomale dominante. Les anomalies d'une trentaine de gènes (HNF1 α , HNF4 α , ABCC8, KCNJ 11 ou Kir 6-2, glucokinase, etc.) ont été caractérisées, mais environ 30 % des cas de MODY relèvent encore de causes non identifiées ; le diagnostic moléculaire relève donc également d'une stratégie en deux temps : séquençage du groupe de gènes connus, puis éventuellement séquençage de l'exome. En pratique médicale l'identification du gène en cause permet une meilleure prise en charge du patient ; ainsi si les MODY par mutation des facteurs de transcription (HNF) présentent un risque de complications vasculaires identique à celui du diabète de type I et doivent être traités par sulfamides hypoglycémiantes ou insuline, à l'inverse les MODY par mutation de la glucokinase présentent peu de risques de ce type et n'ont habituellement pas besoin d'un traitement médicamenteux mais simplement d'un régime.

III. MALADIES DITES MULTIFACTORIELLES

La grande majorité des maladies communes (cardiovasculaires, nutritionnelles, neurodégénératives, etc.), responsables d'une part importante de la morbidité et de la mortalité dans la population générale, relève de l'interaction entre facteurs génétiques multiples et facteurs environnementaux ou comportementaux. Les études d'association (« Genome Wide Association Studies » ou GWAS), utilisant les polymorphismes nucléotidiques connus (« Single Nucleotide Polymorphism » ou SNP) et menées sur de grandes cohortes, ont finalement donné des résultats décevants en ne caractérisant qu'une faible proportion de ces facteurs et conduisant ainsi à la notion d'une « héritabilité manquante ». L'explication du relatif échec des études GWAS est que les SNPs analysés correspondaient à des polymorphismes trop fréquents (allèle mineur d'au moins quelques pour cent), alors que l'effet pathogène recherché est vraisemblablement le résultat de mutations ou variants beaucoup plus rares [17, 18]. Ainsi, dans le cas du diabète de type II dont 95 % des cas sont polygéniques avec une interaction importante de l'environnement, les premières études GWAS et par puces ADN ont caractérisé une soixantaine de polymorphismes mais n'expliquant au total qu'environ 10 % de l'héritabilité ; les variants rares et « forts » restent donc à identifier : l'un des gènes concernés est celui du récepteur de la mélatonine MTNR1B, les études fonctionnelles établissant par ailleurs un lien entre cette hormone épiphysaire et le métabolisme du glucose. Dans le cas de l'obésité, deux variants non synonymes (R67C et R270H) de GPR 120 c'est-à-dire du récepteur des acides gras à longue chaîne localisé principalement sur l'intestin et le tissu adipeux viennent d'être identifiés, l'importance de ce gène dans la physiopathologie de l'obésité étant prouvée par le fait que les souris invalidées deviennent obèses.

La caractérisation de ces variants « forts », considérés comme d'apparition récente dans l'évolution de l'espèce humaine et donc potentiellement différents d'un groupe ethnique à l'autre, devrait maintenant se généraliser en bénéficiant de la nouvelle technologie de séquençage à haut débit, mais ce travail n'en est encore qu'à son début ; appliqué à l'étude de cohortes correctement annotées, provenant donc de populations et d'ethnies diverses, il ouvre de nouvelles voies de recherche pour comprendre les interactions et effets de multiples gènes, et pour aider aux études physiopathologiques et à l'identification de nouveaux biomarqueurs. Les résultats attendus devraient définir, dans ces pathologies communes, les bases d'une médecine dite personnalisée [19, 20].

IV. ONCOLOGIE

Dans les cancers dits sporadiques les évènements mutationnels ont lieu au niveau de l'ADN somatique, tandis que dans les cancers dits héréditaires, transmis dans les familles de façon mendélienne dominante ou récessive, les mutations sont constitutionnelles de l'ADN et transmises par un gamète parental. Dans l'un et l'autre cas l'apport des NGS est considérable : dans le cas des cancers héréditaires en permettant l'exploration simultanée et rapide d'un vaste « panel » de gènes au moindre coût, dans les affections malignes somatiques en conduisant à une dissection moléculaire des tumeurs susceptible de générer des indications thérapeutiques spécifiques [21, 22].

A. Oncogénétique constitutionnelle

En oncogénétique constitutionnelle, le séquençage haut débit des exons offre donc l'intérêt d'une exploration systématique d'un large éventail de gènes : 21 gènes (BRCA1 et 2, CHEK2, PTEN, STK11, TP53, BALB2, etc.) dans les cancers familiaux du sein ou de l'ovaire, 6 gènes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, APC, MUTYH) dans les cas de polypose adénomateuse et de cancer héréditaire du colon [23-25]. À ce jour cette stratégie n'a encore conduit à l'identification que d'un petit nombre de nouveaux gènes de prédisposition héréditaire aux cancers ; l'un des exemples est celui du gène PALB2, gène de prédisposition au cancer du pancréas : le séquençage comparatif des exomes germinale et tumorale a en outre montré la présence d'une mutation constitutionnelle et d'une mutation somatique acquise (c'est-à-dire l'existence d'un mécanisme en deux temps identique à celui de la théorie des « anti-oncogènes » de Knudson dans le rétinoblastome, appelés ainsi parce que la protéine Rb que la mutation rend déficiente inhibe la multiplication cellulaire) [26].

B. Hémopathies malignes

Dans les hémopathies malignes de très nombreuses translocations chromosomiques sont observées ; elles conduisent soit à la dérégulation d'un oncogène (lymphome de

Burkitt, etc.) soit à l'expression d'une protéine de fusion anormale dont les deux meilleurs exemples sont la leucémie myéloïde chronique (réarrangement BCR/ABL) et la leucémie aiguë à promyélocytes (réarrangements PML/RARA ou PLZF/RARA). La leucémie myéloïde chronique a bénéficié au début des années 90 d'une des premières thérapeutiques ciblées par l'imatinib, inhibant spécifiquement la tyrosine kinase Bcr/Abl. Du fait de sa spécificité et de sa tolérance, l'imatinib a rapidement supplanté toute autre forme de traitement. La majorité des patients a une réponse cytogénétique complète et permanente ; cependant 25 % des malades sont résistants soit primitivement soit secondairement en raison de mutations ponctuelles dans le gène de fusion. Ces échecs ont conduit à la mise au point de nouveaux inhibiteurs (dasatinib, nilotinib, etc.) [27, 28]. De même PML / RARA est ciblé par les agents thérapeutiques de la leucémie aiguë à promyélocytes : l'acide retinoïque, l'arsenic et les agents stabilisant l'AMPc.

De nombreuses autres hémopathies ont également été étudiées [29], et peuvent être citées en exemple : les leucémies myéloïdes aiguës qui présentent une grande diversité clinique et pronostique, sont également caractérisées par une hétérogénéité importante des mutations [30, 31]. Elles ne résultent pas d'une instabilité génomique mais seraient plutôt associées à un faible nombre de mutations oncogéniques « driver », la grande majorité étant des mutations « passagers », qui jouent un rôle passif dans le développement de la maladie. Le défi actuel est donc d'identifier les mutations contribuant réellement à la leucémogénèse. Une étude portant sur 108 génomes a montré des mutations portant sur 23 gènes parmi lesquels des mutations de 3 membres du complexe cohésine (STAG2, SMC3, SMC1A) [32]. Le séquençage génome entier a également montré des mutations des gènes IDH1 et IDH2, ainsi que DNMT3A agissant par la voie de la méthylation [29].

L'étude des myéلودysplasies révèle de façon inattendue des mutations de la machinerie d'épissage de l'ARN, tels que U2AF35, ZRSR2, SRSF2, SF3B1 [33]. les mutations de SF3B1 sont associées aux anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne, alors que les mutations de SRSF2 sont plutôt associées aux leucémies myélomonocytaires chroniques. Les gènes du spliceosome semblent très intéressants à étudier pour améliorer le diagnostic et la classification pronostique des syndromes myéلودysplasiques.

Les leucémies lymphoïdes ont également fait l'objet de travaux de séquençage : concernant les leucémies lymphoblastiques, le séquençage génome entier de 12 cas de LAL-ETP (early T-cell precursor) a été réalisé ainsi que l'évaluation de la fréquence des mutations somatiques identifiées dans 94 cas de LAL-T [34]. Cette étude montre que les LAL-ETP sont caractérisées par les mutations de gènes impliqués dans 3 grandes voies : la voie de signalisation de RAS et des récepteurs de cytokines, le développement hématopoïétique et les modifications des histones. De plus, de nouvelles cibles mutées ont été identifiées : DNM2, ECT2L et RELN [29].

Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) sont les plus fréquentes des leucémies de l'adulte, elles apparaissent habituellement dans la sixième décade de la vie avec

une prédominance masculine ; leur étiologie est inconnue mais l'observation de formes familiales fait supposer l'existence de facteurs génétiques de prédisposition. Dans environ un tiers des cas la maladie a une évolution très lente ne nécessitant pas de traitement, le décès survenant pour une autre cause ; dans un autre tiers l'évolution très lente est suivie d'une brutale aggravation ; enfin le dernier tiers se présente d'emblée sous une forme grave. Dans 80 % des cas des anomalies cytogénétiques sont retrouvées, elles peuvent être associées à des pronostics différents favorables (13qdel, trisomie 12) ou défavorables (11qdel, 17qdel). La mise en œuvre du séquençage à haut débit a montré que le spectre mutationnel des LLC était très limité (10 à 20 gènes) par rapport à ce qui est habituellement observé dans les tumeurs malignes. Cinq gènes sont plus fréquemment mutés : SF3B1 (intervenant dans l'épissage des ARN), TP53, NOTCH1 (activant la différenciation lymphoïde), MYD88 (activant la voie des Toll like récepteurs) et ATM. Les mutations de SF3B1 sont présentes dans environ 10 % des cas, elles ne sont pas spécifiques des LLC car également observées dans différentes autres affections malignes (myéلودysplasies, cancers du sein, mélanomes...) ; elles sont souvent associées à des délétions en 11q et de mauvais pronostic. Les mutations de NOTCH1, présentes dans 5 à 10 % des cas, sont associées à une trisomie 12 et résistantes au traitement. Les mutations de MYD88, également retrouvées dans 85 % des cas de maladie de Waldenström, sont souvent associées à des délétions 13q et à des mutations des IGHV. En fait le séquençage à haut débit montre une hétérogénéité tumorale avec une organisation clonale et sous clonale, souvent secondaire à la chimiothérapie ; en définitive il permet de faire un bilan mutationnel complet des LLC, d'affiner leur pronostic et surtout d'adapter leur traitement. Les leucémies myéloïdes aigües qui présentent une grande diversité clinique et pronostique, sont également caractérisées par une hétérogénéité importante des mutations [29, 30].

C. Tumeur malignes

La classification habituelle des tumeurs repose sur les seules données morphologiques et cytologiques de l'anatomie pathologique ; la mise en œuvre successive des différentes techniques de biologie moléculaire a montré que cette classification était bien entendu insuffisante pour rendre compte de la très grande diversité d'expressions géniques à l'intérieur d'un même type de cancer, diversité correspondant souvent à des différences importantes de pronostic et de réponse à la chimiothérapie. Pour rendre compte de cette diversité et de ses conséquences, le séquençage par les nouvelles méthodes à haut débit tend à s'imposer comme nouvelle méthode d'analyse systématique des tumeurs [35].

Par rapport au génome constitutionnel, le nombre de variations somatiques est très variable d'un type de tumeur à l'autre : les plus mutagènes sont les mélanomes alors que des tumeurs de l'enfant pourtant très agressives comme les rhabdomyosarcomes le sont peu. Les sarcomes sont des tumeurs rares mais d'une considérable variabilité d'un cas à l'autre ; ils sont caractérisés par une très grande fréquence des anomalies

chromosomiques, en particulier des translocations conduisant à la formation de gènes chimériques codant souvent pour des facteurs de transcription. Les neuroblastomes ont des évolutions très différentes d'un malade à l'autre avec des cas de régression et de guérison spontanée, et à l'inverse des formes très agressives et métastatiques ; ces différences sont associées à des anomalies chromosomiques différentes.

Une des grandes difficultés concernant ces mutations est de faire la distinction entre celles qui sont importantes pour la progression tumorale (mutations « drivers ») et celles qui sont seulement accessoires (mutations « passagers »). L'intérêt du séquençage est également thérapeutique : identifier parmi les mutations principales celles susceptibles d'un ciblage médicamenteux (mutations « druggable »). Les gènes « druggables » codent soit des récepteurs membranaires (habituellement des tyrosine ou des sérine kinases) qui peuvent être inhibés par des anticorps monoclonaux agissant sur leur face extracellulaire (ex : Trastuzumab sur HER2, etc.) ou par des produits chimiques agissant sur la face intracellulaire (ex : Imatinib sur cKIT et RET, Lapatinib sur HER2, etc.), soit des facteurs de voies de signalisation intracytoplasmique contrôlant la prolifération cellulaire (ex : Vémurafemib sur RAF, Everolimus sur mTOR, etc.). Par ailleurs le séquençage met en évidence l'extrême hétérogénéité des tumeurs de même type et conduit à des thérapies ciblées : un exemple est celui du cancer colorectal au stade IV où l'existence de mutations de K-RAS rend inefficace le traitement par un anticorps monoclonal anti-EGFR ; à l'inverse dans le mélanome métastaté la mutation V600E du gène BRAF est une indication au traitement par le vemurafinib. En définitive les polymorphismes mutationnels d'un nombre restreint de gènes (APC, BRAF, EGFR, KRAS, HER2, C-KIT, PIK3CA, etc.) sont susceptibles de moduler la thérapeutique de différents types de tumeurs (mélanomes, glioblastomes, cancers du sein, du poumon, de l'estomac, etc.). Jusqu'à présent l'approche est ainsi ciblée sur certains gènes, témoin d'une médecine dite stratifiée (K-RAS muté ou non, BRAF muté ou non, etc.).

Par ailleurs, étant donné la variabilité des réponses individuelles aux médicaments anti-cancéreux, le séquençage haut débit mérite également d'être utilisé pour caractériser, sur l'ADN normal, les polymorphismes génétiques de l'ensemble des acteurs protéiques de leur métabolisme [36], avec trois grands types d'indications : 1) faire la distinction entre répondeurs et non répondeurs, 2) identifier les sujets à risques pour la survenue d'effets indésirables, liés en général à des mutations inhibant les enzymes impliqués dans leur métabolisme (ex : risque de neutropénie par l'irinotecan en fonction du polymorphisme de l'UGT1A1, hypersensibilité à la carbamazépine et HLA-A 3101, allopurinol et HLA-B 5801, etc.) [37], 3) individualiser la posologie (ex : doses de coumadine en fonction des polymorphismes du CYP2D6 et de la vitamine K époxyréductase VKORC1 [38], adaptation de la posologie en tricyclines en fonction du nombre de copies de CYP2D6).

En définitive le développement des NGS devrait rapidement mener à une médecine dite personnalisée impliquant le séquençage des génomes tumoraux et constitutionnels, et conduisant à l'administration, en fonction des mutations identifiées et des caractéristiques pharmacogénétiques individuelles, de thérapies ciblées et éventuel-

lement combinées Les premières études réalisées montrent que ce type de médecine personnalisée, fondée sur l'analyse génomique des tumeurs, se traduit par un gain en termes d'absence de récurrences ou de survie, par rapport aux patients traités par les méthodes standard. Il reste néanmoins à évaluer la capacité de notre système de santé à en supporter les charges financières.

Assez paradoxalement, l'industrie pharmaceutique, confrontée à une augmentation importante des coûts en recherche et développement du fait en particulier d'une réglementation de plus en plus contraignante, et à une diminution des retours sur investissements, est conduite à un changement de stratégie ; elle tend à remplacer les essais randomisés classiques (patients recevant ou non le médicament après tirage au sort) par la comparaison de l'efficacité du médicament dans deux groupes de patients présélectionnés selon qu'ils sont porteurs ou non du marqueur, passant ainsi d'une approche probabiliste à une approche déterministe.

CONCLUSIONS

Le séquençage à haut débit des ADN apparaît comme une avancée technologique majeure, dont les conséquences sur la pratique médicale seront sans aucun doute très importantes. Deux d'entre elles méritent d'être soulignées : la capacité de rechercher simultanément les mutations pathologiques d'un grand nombre de gènes (diagnostic des maladies mendéliennes, dépistage des hétérozygotes, tests préconceptionnels, etc.) et cela au moindre coût par rapport aux méthodes traditionnelles ; la possibilité d'analyser l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel (diagnostic des anomalies chromosomiques et des mutations géniques) évitant de la sorte les risques d'un geste invasif. Des progrès importants sont également attendus dans de nombreuses pathologies ; ainsi en oncologie, outre les prédispositions génétiques, la caractérisation systématique des spectres mutationnels tumoraux devrait conduire à des traitements personnalisés reposant sur un ou une combinaison de médicaments ciblés. En mettant à jour une multitude d'informations génétiques, le séquençage haut débit d'un groupe de gènes mais surtout de l'exome et encore plus du génome entier pose non seulement des problèmes d'interprétation mais également un grand nombre de questions éthiques, dont certaines ont déjà fait l'objet de recommandations à l'occasion de précédents rapports [1, 2]. Une réflexion approfondie sur l'ensemble de ces questions mérite d'être entreprise dès à présent ; elle concerne notamment le dépistage systématique des hétérozygotes, les diagnostics préconceptionnels, prénatals ou préimplantatoires, l'usage des informations retirées du séquençage d'un génome constitutionnel à l'occasion de celui d'une tumeur, par exemple la découverte de mutations récessives.

Par ailleurs il convient d'insister sur le fait que cette technologie demande un encadrement médical et scientifique suffisant et qu'il est ainsi indispensable :

- de créer, en plus des laboratoires correspondant aux disciplines biologiques traditionnelles, des plateformes hospitalières de séquençage dotées de moyens

suffisants en termes de personnel, de crédits de fonctionnement et de matériel, en veillant à éviter des délais de résultats trop longs dans le cas de l'analyse de génomes malins ;

- d'affecter à ces plateformes le personnel bioinformaticien indispensable et les moyens nécessaires au stockage des données recueillies ;
- d'évaluer avec précision les coûts de ces examens, en différenciant ceux relatifs à la recherche ou au diagnostic, en vue de l'inscription de ces derniers à la nomenclature des actes de l'assurance maladie ;
- de compléter cette évaluation par une appréciation médico-économique tenant compte du rapport coût/ bénéfice tel, en oncologie, le rapport entre la durée de survie et le prix des médicaments ciblés.

En outre un large débat, d'information, de communication et d'éducation s'impose afin notamment de mettre en garde le public sur les tests génétiques proposés par des firmes commerciales, appelés à se multiplier, mais dont l'interprétation demande une consultation médicale spécialisée.

Enfin la nécessité d'une formation permanente du corps médical sur les applications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques découlant de ces technologies est indispensable.

RÉFÉRENCES

- [1] LE GALL J.Y., ARDAILLOU R. — Diffusion et validation des tests génétiques en France. *Bull. Acad. Natle Med.* 2009, 193(9), 2093-19.
- [2] LE GALL J.Y. — Techniques d'analyse du génome et de son expression : applications médicales. *Bull. Acad. Natle Med.* 2012, 196(1), 151-71.
- [3] DEBRE P., LE GALL J. Y. — Le contrôle génétique des maladies infectieuses : des lois de Mendel au séquençage de l'exome. *Bull. Acad. Natle Med.*, 2013, 197(1), 157-171.
- [4] JORDAN B. — Séquençage de nouvelle génération : déjà en clinique ? *Med. Sci.*, 2011, 27(12), 1127-30.
- [5] JORDAN B. — Les points critiques du séquençage clinique. *Med. Sci.* 2012, 28(1), 109-11.
- [6] BELL C. J., DINWIDDIE D C., MILLER N. A. *et al.* — Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next generation sequencing. *Sci. Transl. Med.*, 2011, 3, 65ra4.
- [7] STEFFANN J., FRYDMAN N., BURLET Ph. *et al.* Le diagnostic pré-implantatoire couplé au typage HLA: l'expérience française. *Bull. Acad. Natle Med.*, 2011, 195(4-5), 1015-22.
- [8] FAN H. C., GU W., WANG J. *et al.* Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature.* 2012, 487, 320-24.
- [9] SNYDER M.W., SIMMONS L.E., KITZMAN J.O. *et al.* — Noninvasive fetal genome sequencing: a primer. *Prenatal diagnosis.* 2013, 33, 547-54.
- [10] DUGOFF L. — Application of genomic technology in prenatal diagnosis. *N. Engl. J. Med.*, 2012, 367, 2249-50.

- [11] DE LIGT J., WILLEMSSEN M. H., VAN BON B.W.M. *et al.* — Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.*, 2012, 367, 1921-29.
- [12] SAUNDERS C. J., MILLER N. A., SODEN S. E. *et al.* — Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci. Transl. Med.*, 2012, 4, 77-89.
- [13] TESSON C., NAWARA M. N., SALIH M.A.M. *et al.* — Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.*, 2012, 91, 1051-64.
- [14] KLEBE S., LOSSOS A., AZZEDINE H. *et al.* — KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations. *Eur. J. Hum. Mut.*, 2012, 20, 645-49.
- [15] GOIZET C., DEPIENNE C., BENARD G. *et al.* — REEP1 mutations in SPG31: frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction. *Hum. Mut.*, 2011, 32, 1118-27.
- [16] MACARTHUR D.G., BALASUBRAMANIAN S., FRANKISH A. *et al.* — A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science*. 2012, 335, 823-28.
- [17] JORDAN B. — Rare is frequent. *Med. Sci.*, 2012, 28, 893-96.
- [18] TENNESSEN J.A., BIGHAM A.W., O'CONNOR T.D. *et al.* — Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*. 2012, 337, 64-69.
- [19] JORDAN B. — Le véritable genome personnel. *Med. Sci.* 2011, 27, 553-56.
- [20] ROBERTS N.J., VOGELSTEIN J.T., PARMIGIANI G. *et al.* — The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4, 132-36.
- [21] DANCEY J.E., BEDARD PH.L., ONETTO N. et HUDSON T.J. — The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell*. 2012, 148, 409-19.
- [22] LONGO D.L. — Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366, 956-57.
- [23] PRITCHARD C.C., SMITH C., SALIPANTE S.J. *et al.* — Coloseq provides comprehensive Lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massive parallel sequencing. *J. Mol. Diagn.* 2012, 14, 357-65.
- [24] WALSH T., CASADEI S., LEE M.K. *et al.* — Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *PNAS*. 2011, 108, 18032-37.
- [25] WALSH T., LEE M.K., CASADEI S. *et al.* — Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *PNAS*. 2010, 107, 12629-33.
- [26] JONES S., HRUBAN R.H., KAMIYAMA M. *et al.* — Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*. 2009, 234, 17.
- [27] SCHIFFER C.A. — Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2007, 357, 258-64.
- [28] GOLDMAN J.M. — Ponatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367, 2148-49.
- [29] MARCEAU-RENAULT A., RENNEVILLE A., NIBOUREL O. *et al.* — Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a-t-il déjà sa place dans nos laboratoires d'onco-hématologie ? *Hématologie*. 2013, 19, 112-22.
- [30] PATEL J.P., GÖNEN M., FIGUERORA M.E. *et al.* — Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366, 1079-89.
- [31] The cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368(22) 2059-74.

- [32] WELCH J.S., LEY T.J., LINK D.C. *et al.* — The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012, 150 (2), 264-78.
- [33] YOSHIDA K., SANADA M., SHIRAISHI Y. *et al.* — Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011, 478 (7367), 64-9.
- [34] ZHANG J., DING L., HOLMFELDT L. *et al.* — The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012, 481 (7380), 157-63.
- [35] VOGELSTEIN B., PAPADOPOULOS N., VELCULESCU V.E. *et al.* — Cancer genome landscapes. *Science*. 2013, 339, 1546-58.
- [36] WANG L., MCLEOD H.L., WEINSHILBOUM R.M. — Genomics and drug response. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364, 1144-53.
- [37] BECQUEMONT L. — HLA: A pharmacogenomics success story. *Pharmacogenomics*. 2010, 11, 277-81.
- [38] SCHWARZ U.I., RITCHIE M.D., BRADFORD Y. *et al.* — Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 999-1007.

Experts auditionnés :

Professeur F. Galibert (Membre de l'Académie nationale de médecine), Professeur F. Soubrier (Membre correspondant de l'Académie nationale de médecine), Professeur A. Brice (Membre correspondant de l'Académie nationale de médecine), Docteur D. Tregouet (Université Pierre et Marie Curie, Paris), Docteur A. Carrié (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris), Professeur B. Jordan (Directeur de recherches CNRS, Marseille), Professeur Ph. Monteyne (Vice-Président recherche et développement, Sanofi), Professeur J. Steffann (Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris), Professeur O. Delattre (Institut Curie, Paris), Professeur M. Vidaud (CHU Cochin, Paris), Professeur J.M. Dupont (CHU Cochin, Paris), Professeur L. Becquemont (CHU Bicêtre, Paris), Madame C. Le Goff (Présidente de Roche France), Docteur Y. Pletan (Directeur médical de Roche France), Professeur F. Davi (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière), Professeur J.L. Mandel (Collège de France, Académie des Sciences, Académie nationale de médecine), Professeur Ph. Froguel (Institut Pasteur, Lille et Imperial College, Londres).

