



MARS 2016

OUTILS POUR LA PRATIQUE

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION D'UN PANEL DE GÈNES POUR L'ANALYSE EN GÉNÉTIQUE SOMATIQUE */Validation de la méthode*

e-cancer.fr

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION D'UN PANEL DE GÈNES POUR L'ANALYSE EN GÉNÉTIQUE SOMATIQUE /VALIDATION DE MÉTHODE

Dans le cadre de la réforme de la biologie médicale, tous les laboratoires des plateformes de génétique moléculaire devront être partiellement accrédités selon la norme ISO 15189 par le Comité français d'accréditation (COFRAC) d'ici à 2016. L'objectif de cette démarche est de garantir la fiabilité des examens réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un laboratoire de biologie médicale. Ce processus impose notamment la constitution de dossiers de validation de méthode pour chaque analyse réalisée par les laboratoires.

Aussi, afin d'accompagner les laboratoires dans leur démarche, des groupes de travail ont été constitués pour les techniques d'analyse les plus courantes, sous l'égide de l'INCa, à partir du printemps 2013. Chaque groupe de travail était constitué de représentants des plateformes de génétique moléculaire utilisant la technique concernée en routine diagnostique et disposant d'une expertise dans le domaine. Les personnes participantes ont un profil de biologistes, pathologistes, ingénieurs ou qualitatifs. Ce travail a permis la rédaction d'un document d'aide à la validation de méthode pour la génétique somatique¹.

Actuellement, la plupart des laboratoires des plateformes de génétique moléculaire sont en train d'implémenter les nouvelles techniques de séquençage (NGS). Ces technologies posent de nombreux défis. Aussi, afin de faciliter le partage d'expérience et d'accompagner les laboratoires, un groupe de travail dédié a été constitué par l'INCa en 2015. Ce groupe a permis l'élaboration de ce document, qui a été soumis à la relecture de l'ensemble des personnes impliquées. Il est mis à la disposition des professionnels des laboratoires pour les guider dans l'établissement du dossier de validation de méthodes pour la recherche de mutations somatiques dans le cadre de l'accréditation COFRAC selon la norme ISO 15189 des laboratoires de biologie médicale. Selon la classification du COFRAC (SH-INF 50), ces analyses constituent une sous-famille de tests au sein de la portée d'accréditation pour les analyses génétiques.

Ce document met en exergue les points critiques à maîtriser pour le recours aux techniques de NGS.

¹ Voir « Validation de méthodes pour la recherche de mutations en génétique somatique », INCa, 2013

Table des matières

PORTÉE D'ACCREDITATION	3
DÉFINITIONS	3
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.....	5
TECHNIQUE DE CAPTURE.....	5
TECHNIQUE HALOPLEX	5
AMPLICON.....	6
MAÎTRISE DES RISQUES	6
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS	8
MATÉRIEL DE RÉFÉRENCE / CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE	8
VALIDATION DES AMORCES ET DES BIAIS DE CAPTURE	9
QUELS VARIANTS VALIDER PENDANT LA VALIDATION DE MÉTHODE?.....	9
PARAMÈTRES À VALIDER.....	10
ANALYSE DES RÉSULTATS EN ROUTINE	13
ÉVOLUTIONS DU PROTOCOLE (PORTÉE B)	14

PORTÉE D'ACCRÉDITATION

Les méthodes utilisées en génétique somatique donnent en général une information sur la présence ou non d'une mutation. En ce sens, elles peuvent être considérées comme qualitatives. Étant donné que, dans certains cas, la détermination du statut mutationnel est dépendante de valeurs quantitatives, il peut être utile d'inclure la validation des critères de répétabilité, de reproductibilité et de limite de détection au dossier, afin d'estimer la sensibilité analytique de la méthode.

Le dossier de validation des méthodes doit donc contenir les paramètres de la validation quantitative. Pour valider spécifiquement les différents panels de gènes utilisés, il est possible de proposer :

- une approche de validation globale de la technique ;
- des dossiers de vérifications complémentaires.

En portée flexible étendue (B), il est possible de faire un dossier général pour valider la méthode dans son ensemble. Ce dossier pourra être réalisé à partir d'un ou de plusieurs paramètres, par exemple des gènes ou des loci cibles. Des dossiers spécifiques à chaque locus ou gène étudié devront également être réalisés. Dans ces dossiers spécifiques, il sera nécessaire de vérifier des paramètres tels que la spécificité des amorces ou du design d'enrichissement. Cette vérification pourra être réalisée par la validation de la couverture des régions à étudier. Les paramètres pourront être validés selon le formulaire SH-FORM 43 en vigueur actuellement.

La méthode de séquençage de nouvelle génération (NGS) appliquée à la génétique somatique est une méthode complexe composée de processus multiples. Le séquençage peut être divisé en plusieurs étapes : enrichissement, séquençage et analyse bio-informatique. Le dossier de validation doit comporter l'ensemble des différents processus nécessitant des validations spécifiques.

DÉFINITIONS

❖ DÉFINITIONS GÉNÉRALES

Blanc d'essai : il s'agit d'une analyse comprenant l'ensemble des réactifs sans ADN. L'ADN est remplacé par de l'eau.

Blanc d'extraction : il s'agit du produit d'extraction obtenu avec les seuls réactifs sans échantillon tumoral.

Contrôle interne de qualité (CIQ) : le CIQ est réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons contrôle lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction des limites de tolérance préétablies.

Limite de détection (LOD) :

1) Techniques quantitatives : la limite de détection correspond au plus petit signal qui peut être distingué d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions.

2) Techniques qualitatives : la limite de détection correspond au seuil de détection du test qui permet de définir la sensibilité analytique du test. En pratique en biologie moléculaire, elle correspond à la plus faible valeur limite (% de cellules tumorales) permettant de distinguer un signal muté d'un signal non muté.

Matériaux de référence : il s'agit d'échantillons pouvant être utilisés soit au cours de la validation de méthode, soit pour assurer le suivi de la qualité. Ils doivent avoir une stabilité dans le temps pour permettre des comparaisons. Ils peuvent servir de contrôle de qualité interne.

Robustesse : capacité d'une technique à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité des mesures dans les conditions normales d'utilisation d'un test. La robustesse peut être évaluée sur les résultats de l'analyse de risque et de la reproductibilité.

Sensibilité diagnostique : probabilité qu'un dispositif donne un résultat positif en présence du marqueur cible. Elle se calcule selon la formule suivante :

$$\text{sensibilité diagnostique} = \frac{\text{nb}_{\text{vrais positifs}}}{\text{nb}_{\text{vrais positifs}} + \text{nb}_{\text{faux négatifs}}}$$

Spécificité diagnostique : probabilité qu'un dispositif rende un résultat négatif en l'absence d'un marqueur cible. Elle se calcule par la formule suivante :

$$\text{spécificité diagnostique} = \frac{\text{nb}_{\text{vrais négatifs}}}{\text{nb}_{\text{vrais négatifs}} + \text{nb}_{\text{faux positifs}}}$$

❖ DÉFINITIONS PARTICULIÈRES À LA TECHNIQUE DE SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION

NGS : Next Generation Sequencing / séquençage de nouvelle génération.

Reads : succession de bases lues par le séquenceur dans chaque cluster, ou puits, selon la technologie utilisée. Le séquenceur génère autant de reads qu'il y a de clusters/puits fonctionnels. Chaque read pourra être aligné et positionné sur le génome humain. Un nombre de reads minimum peut être exigé pour éliminer le bruit de fond inhérent à la technique. Pour une base donnée, on peut évaluer le nombre de reads portant un variant. Le nombre de reads est également utilisé pour calculer la fréquence d'allèles mutés.

Profondeur : pour une base donnée, la profondeur de séquençage correspond au nombre de fois où cette base est séquencée. La profondeur de séquençage est fonction du nombre de reads à chaque position. On définit souvent une « profondeur moyenne » qui correspond à la moyenne des profondeurs observées sur l'ensemble du panel de gènes. On peut également fixer une « profondeur minimale » à atteindre, comme un seuil de qualité pour valider le résultat sur une base donnée.

Couverture : la couverture représente le pourcentage du panel pour lequel la profondeur de séquençage dépasse une valeur minimale prédéfinie.

Panel de gène : ensemble des gènes/exons séquencés lors d'une analyse par NGS.

Pipeline : l'analyse bioinformatique des données générées par le NGS nécessite le recours à un ensemble d'outils d'analyse complémentaires. Cela comprend notamment des outils pour l'alignement des séquences, la détection et l'annotation des variants. L'ensemble des outils utilisés constitue le pipeline d'analyse.

Run : un run correspond à un passage sur séquenceur NGS. Il regroupe donc l'ensemble des échantillons ayant été séquencés en même temps.

SNP : single nucleotide polymorphism : variation d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce, dans une population.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

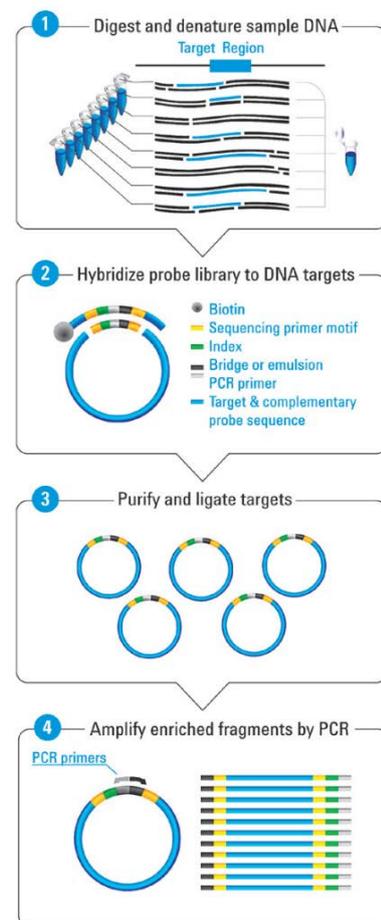
❖ MÉTHODES D'ENRICHISSEMENT

Technique de capture

L'enrichissement par capture consiste à utiliser des sondes nucléotidiques (ARN ou ADN, en fonction des fournisseurs) d'une centaine de bases complémentaires des régions d'intérêts. Ces sondes sont souvent dessinées de manière chevauchante afin qu'une base de la région d'intérêt soit capturée par plusieurs sondes différentes (« tailing »). Le dessin des sondes prend en compte les régions de faible complexité et les régions répétées du génome cible afin d'assurer la spécificité de l'hybridation sur les régions d'intérêt. Il est aussi possible, lors du dessin des sondes, de dupliquer certains groupes de sondes spécifiques complémentaires de régions connues comme difficilement couvertes au séquençage (ex : « balancing » des régions GC et AT riches, sondes orphelines). Les sondes synthétisées sont généralement couplées à un résidu biotinylé et sont hybridées sur l'ADN à séquencer au cours de la fabrication des bibliothèques. Comme les sondes sont longues, elles peuvent s'hybrider en tolérant de nombreux « mismatches ». En conséquence, les régions génomiques variantes sont également capturées. Les sondes hybridées sur les régions d'intérêt sont ensuite capturées par un système magnétique. Après purification des fragments d'ADN enrichis, une PCR est généralement réalisée afin d'augmenter les quantités de bibliothèques enrichies. Les bibliothèques enrichies sont indexées par des codes-barres oligonucléotidiques (uniques par patient au sein d'un même séquençage) avant séquençage. Les produits d'amplification sont ensuite mélangés pour réaliser le séquençage.

Technique HaloPlex

L'HaloPlex (Agilent Technologies) est une technique d'enrichissement de gènes cibles (panel de gènes) à l'aide de sondes de capture sur une région déterminée du génome. Cette méthode permet de cibler quelques gènes et jusqu'à 5Mb (ou 200 000 amplicons) à partir de 200ng d'ADN. Le protocole technique se déroule en cinq étapes prenant environ 8h. La première étape comprend une fragmentation de l'ADN génomique total de chaque patient, dans 8 tubes différents, par double digestion enzymatique (8 couples d'enzymes définis par le fournisseur en fonction du design). Il y a ensuite une capture des gènes d'intérêt par des sondes biotinylées, spécifiques des extrémités 5' et 3' des fragments d'intérêt préalablement digérés, ce qui entraîne une circularisation des ADN cibles. La partie centrale des sondes est complémentaire des adaptateurs spécifiques du séquenceur et des codes-barres oligonucléotidiques ou index (selon le séquenceur de l'utilisateur). Les codes-barres/index sont ajoutés à cette étape d'hybridation. Une purification est réalisée à l'aide de billes magnétiques capturant par la streptavidine les fragments d'ADN. Il y a ensuite amplification des fragments capturés par PCR universelle. Les banques ainsi préparées pour chaque échantillon doivent être quantifiées, qualifiées et normalisées avant séquençage.



Cette technique offre notamment la possibilité d'avoir, pour un locus donné, une couverture par des amplicons différents et donc, de pouvoir éliminer lors de l'analyse les biais introduits par la PCR et les mutations liées à des artefacts de séquençage. Les limites de cette stratégie sont la quantité initiale d'ADN nécessaire. Bien qu'elle puisse être limitée à 100 ng d'ADN, ceci peut être incompatible avec des échantillons tumoraux. Le nombre d'étapes reste supérieur aux techniques dites d'amplicons basées uniquement sur l'amplification par PCR.

Amplicon

L'approche par amplicon se fait par une PCR initiale multiplex pour chaque échantillon. Le nombre de multiplex dépend de la taille des loci étudiés et du chevauchement des amorces. Les produits d'amplification sont ensuite code-barrés. Les produits d'amplification sont purifiés et rassemblés pour réaliser le séquençage. Cette approche pose le problème de l'homogénéité de la profondeur, qui dépend de l'efficacité de PCR et des multiplex. Elle permet de travailler sur des plus petites quantités d'ADN (10 ng). Elle expose au risque d'allèle drop out (biais technique résultant de l'amplification d'un seul brin d'ADN) s'il y a la présence de variant en 3' des amorces. Elle est limitante sur le design des amorces car toute modification nécessite de revalider l'ensemble du positionnement des amorces.

REMARQUE Chaque méthode d'enrichissement doit faire l'objet d'une analyse de risque et son efficacité ne pourra être déterminée qu'à la fin du processus, lors de l'analyse des résultats. Les paramètres à étudier pourront être la couverture, la profondeur et la détection des mutations attendues.

❖ TECHNIQUES DE SÉQUENÇAGE

Les approches de séquençage devront être intégrées dans l'analyse de risque. Les spécificités des méthodes participent à la qualité du séquençage, au bruit de fond et à la limite de détection des méthodes.

❖ PIPELINE D'ANALYSE

Les pipelines d'analyse utilisés en NGS doivent obligatoirement être validés. Vu la complexité des pipelines utilisés, il semble approprié de réaliser un travail similaire spécifique au pipeline d'analyse. Les pipelines d'analyse utilisés en NGS doivent faire partie du dossier de validation de méthode car ils font partie intégrante du processus (production, séquençage et analyse). **En effet, c'est le pipeline qui participe à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.**

MAÎTRISE DES RISQUES

Tous les éléments dont la variation peut influencer sur le résultat rendu au patient doivent être considérés comme **critiques** si aucun moyen de contrôle n'existe. Les témoins peuvent permettre cette maîtrise.

REMARQUE Tout élément critique doit faire l'objet d'une traçabilité permettant d'identifier *a posteriori* toute analyse réalisée avec cet élément, afin de permettre de revenir vers les patients concernés si une anomalie est détectée. Si ces points induisent des variabilités importantes des résultats, un test de robustesse doit être envisagé pour ces éléments.

Comme pour toute technique d'analyse, une attention particulière doit être apportée aux points suivants :

- **Congélateurs** : la stabilité des réactifs considérés comme critiques étant fonction des bonnes conditions de stockage, la vérification et le suivi des congélateurs utilisés pour leur conservation à l'aide de sondes certifiées sont indispensables. Les autres congélateurs ne sont pas aussi sensibles et ne sont pas obligatoirement à considérer comme critiques.
- **Thermocycleurs** : les thermocycleurs sont un élément essentiel dans les étapes du séquençage haut débit. La présence d'un témoin positif sur chaque plaque peut permettre de valider son bon fonctionnement. Toutefois, le témoin positif ne garantit pas l'homogénéité de la température sur l'ensemble de la plaque. Aussi, une validation et un suivi régulier de l'homogénéité sont conseillés au moyen d'une vérification annuelle.
- **Pipettes** : les résultats d'analyse étant qualitatifs, la précision des prélèvements n'est pas systématiquement critique. Une vérification de la robustesse du test vis-à-vis d'une variation du volume des prélèvements peut permettre de vérifier si un écart dans le prélèvement est critique ou non. Dans tous les cas, un étalonnage ou une vérification régulière des pipettes du laboratoire est préconisé.
- **Séquenceurs** : ils doivent faire l'objet d'une maintenance préventive comme indiqué par le fournisseur. Tout dysfonctionnement doit être tracé.

Exemple de dossier de maîtrise des risques (cf. SH-FORM 43)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Echantillon primaire (urine, sang...) ou secondaire Type de récipient (tubes...)	1-Inversion de tubes 2-Contamination de l'échantillon par des amplicons : -risque de faux négatifs si contamination par amplicons non mutés - risque de faux positifs si contamination par amplicons mutés	1-Traçabilité des échantillons 2-Plateforme de génétique moléculaire sectorisée pré-post PCR à accès réglementé 3- Postes techniques sécurisés sous hottes équipées de rampes UV 4-Pointes de prélèvement à filtre à toutes les étapes de l'analyse
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution...)	Erreur de dilution	1-Fiches de calcul des dilutions préformatées sécurisées. 2- Robustesse du test : test peu sensible à des variations de concentration ADN (tests de dilution des ADN des lignées cellulaires mutées)
Main-d'œuvre (habilitation du personnel) : préciser les références des procédures et enregistrements	Manque de formation spécifique théorique et pratique des techniciens de laboratoires réalisant les analyses	1-Formation théorique : assurée par le biologiste responsable 2-Formation pratique : assurée par les techniciens 3-Traçabilité précise de la formation (premières manipulations réalisées sous contrôle d'un formateur et les premiers tests réalisés en autonomie doivent être tracés) 4-Accès aux appareils tracé par code d'identification du personnel
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage...)	1- Contamination des zones de travail 2- Climatisation 3- Respect des conditions de stockage	1- Entretien des locaux et respect de la charte d'utilisation de la plateforme de génétique moléculaire 2- Entretien de la climatisation 3- Surveillance des températures par sondes certifiées 4- Cartographie des enceintes +4°C et -20°C
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Condition de stockage et validation des lots de sondes	1- Congélateur (-20°C), aliquotage et conservation selon procédure <i>ad hoc</i> 2- Réfrigérateur (+4°C) aliquotage et conservation selon procédure <i>ad hoc</i> ; validation des lots de sondes selon procédure <i>ad hoc</i> 3-Gestion de la dérive et traçabilité des réactifs
Matériau de référence (témoins) :	1-Lignées cellulaires 2-ADN commerciaux 3-Échantillons mutés	Points 1 et 2 : matériel constant, gold standard/témoins positifs Point 3 : validation du typage sur deux amplifications indépendantes (+/- séquençage)
Équipements : Exigences métrologiques (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques spécifiques	1-Métrologie 2-Fichiers informatiques	Point 1 : vérification de la métrologie par le fournisseur et procédure de vérification générale Point 2 : - Accès tracé par code d'identification du personnel. - Procédure de gestion et stockage des données - Validation des logiciels d'analyse - Vérification des données d'export automatique de résultats avec la lecture visuelle des tracés pour les techniques utilisant la qPCR - Stockage sécurisé des données brutes et des données analysées

Outre les critères habituels, il existe des points spécifiques identifiés pour le NGS qui doivent être pris en compte dans cette analyse :

- risques liés au défaut de qualité des échantillons : comprenant le risque de faux négatifs et de faux positifs ;
- risque de contamination inter-runs ;
- risque de contamination inter-échantillon (intra-run) lié au multiplexage des échantillons et aux nombreuses étapes de purification ;
- risque d'erreur dans les algorithmes d'analyse.

QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

La qualification des échantillons est effectuée à la fois en histologie et en biologie moléculaire. Au niveau histologique sont vérifiées les spécificités préanalytiques (fixation, conservation) et l'estimation du pourcentage de cellules tumorales sur lame HES réalisée avant ou après la coupe des copeaux pour extraction. Ces données sont collectées pour l'interprétation des résultats. Idéalement, la teneur en cellules tumorales devrait être supérieure à la limite de détection du test.

Le laboratoire doit définir des critères de qualification pour les échantillons analysés (cellularité inférieure à la limite de détection de la méthode, faible quantité d'ADN, faible niveau d'amplification). Les valeurs limites peuvent varier selon les techniques utilisées et la limite de détection du laboratoire et ne peuvent donc pas être standardisées. Ces critères seront utilisés dans la rédaction du compte rendu. Il est préconisé de considérer un résultat « sauvage » comme non contributif en cas de négativité de ces critères.

Pour les prélèvements réalisés en dehors du laboratoire, ce dernier n'est pas en mesure de normaliser la qualité des prélèvements (cellularité, temps de fixation, temps d'ischémie froide variable...). En conséquence, le laboratoire doit qualifier les prélèvements sur des critères objectifs et déterminer des règles de décision compatibles avec le type de prélèvement généralement reçu. Le laboratoire doit donc utiliser une technique dont la limite de détection est adaptée aux échantillons à analyser (cf. § « limite de détection »).

Critères de qualité des échantillons à évaluer

- cellularité tumorale
- exclusion de certains fixateurs (Bouin...)
- qualité moléculaire : quantité et qualité d'ADN double brin (dosage par intercalant fluorescent/qPCR), rendement de ligation, par exemple. La méthode de quantification utilisée doit être détaillée.

REMARQUE D'une manière générale, en raison de la rareté des échantillons et de la difficulté à reprélever un patient, il est préconisé d'accepter les échantillons ne remplissant pas les critères de qualification. Dans ce cas, le compte rendu final doit indiquer la nature du problème et les réserves qui en résultent sur l'interprétation des résultats. Ainsi, en cas de négativité de la recherche, le résultat sera considéré comme étant non contributif.

MATÉRIEL DE RÉFÉRENCE / CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Les échantillons de référence utilisés dans ces évaluations peuvent provenir de plusieurs origines. Il est conseillé qu'ils aient été qualifiés de manière indépendante, soit par un fournisseur, soit par un autre laboratoire. La qualification doit comprendre à la fois le type de mutation et la fréquence allélique des mutations. Ces échantillons peuvent être :

- ADN de patient si le statut mutant/sauvage des nucléotides a été vérifié au préalable par une autre technique ;
- ADN extrait de lignées cellulaires mutantes/sauvages au niveau des nucléotides évalués ;
- ADN commerciaux et calibrés mutants/sauvages au niveau des nucléotides évalués.

Les matériaux issus de lignées cellulaires ou d'ADN commerciaux sont préférables car l'ADN est de qualité constante et la présence de la mutation a été validée de manière externe. L'utilisation d'un échantillon tumoral d'un patient doit être, si possible, limitée. Le matériel de référence peut être utilisé à la fois dans la validation et le contrôle qualité interne (CQI). Il est essentiel de s'assurer que le matériel utilisé comme CQI soit stable dans le temps. Il permet aussi d'assurer le suivi d'impact des changements. Au vu de la technologie et de la large couverture génomique, il n'est pas obligatoire d'utiliser un échantillon sauvage sans aucune mutation (« contrôle négatif »).

Il est préconisé d'utiliser au moins un contrôle interne et un blanc. L'utilisation d'un blanc de PCR est nécessaire. Il n'est toutefois pas indispensable de séquencer ce contrôle et de finaliser l'analyse pour celui-ci.

REMARQUE **Contrôle de qualité interne :**

Le suivi de variations de la fréquence allélique du CQI est un bon indicateur de qualité qui permet de suivre la stabilité du processus. Il n'existe cependant pas d'écart limite chiffré à ne pas dépasser à ce jour.

Dans le cas d'un CQI, notamment pour faire de l'analyse de tendance, un mélange d'ADN tumoral préalablement génotypé préparé en grande quantité peut être suffisant si, entre chaque changement de « lot de témoins », le dernier lot est qualifié dans une série couverte et encadrée par le lot précédent. Les CQI permettent de suivre les contaminations (apparition de mutations non attendues sur le CQI). Les CQI ne peuvent pas, à eux seuls, être utilisés pour déterminer la limite de détection. Ils doivent par contre permettre d'évaluer le bruit de fond d'un run.

La stratégie à adopter en cas d'invalidation des résultats du CQI doit être prédéfinie dans le cadre d'un mode opératoire. Il s'agit notamment de définir si les prélèvements de tous les patients passés sur le même run doivent être réanalysés ou s'il est possible de limiter la vérification à certains échantillons (échantillons à faible cellularité, échantillons avec un résultat négatif,...).

VALIDATION DES AMORCES ET DES BIAIS DE CAPTURE

Le laboratoire doit s'assurer que le panel d'amorces utilisé permet de couvrir l'intégralité des régions d'intérêt explorées. Cette validation peut se faire sur l'évaluation de la couverture suite aux premiers résultats analysés et *in silico* sur les amorces utilisés.

Les critères de validation des amorces sont les mêmes que ceux utilisés en PCR classique, comprenant l'analyse de résultats de séquençage :

- absence de polymorphismes (à une fréquence > 1 % de la population) dans les 3 derniers nucléotides. Les recommandations de l'ANPGM², pour les activités de génétique constitutionnelle, sont d'une tolérance maximale de 1 % de polymorphismes sur les 5 dernières bases des amorces. Cette vérification doit être reconduite à intervalles réguliers (tous les 2 ans) car les bases de données évoluent régulièrement ;
- évaluation de la couverture sur les résultats produits : s'assurer que le design s'aligne bien sur les régions ciblées ;
- concernant les librairies commerciales, on ne connaît pas toujours exactement le positionnement des amorces. Il est donc conseillé de demander au fournisseur de fournir le SNPcheck des amorces utilisées ;
- vérifier les tolérances des fournisseurs dans le design des librairies. Il semble que les fournisseurs soient généralement plus tolérants sur les SNP pour les panels de NGS que pour les techniques ciblées. Les logiciels de design des amorces permettent de fixer les limites de tolérance mais avec une borne basse souvent assez élevée (5 % de SNP).

Il est indispensable de prouver que l'on maîtrise son design et qu'on en connaît les limites. Pour les techniques de capture, une vérification des zones couvertes par les designs, qui doit couvrir 100 % des régions d'intérêt, est suffisante. Un contrôle de la couverture et de la profondeur sur les cibles doit être documenté.

QUELS VARIANTS VALIDER PENDANT LA VALIDATION DE MÉTHODE?

Le laboratoire doit réaliser la validation de méthode sur une liste de mutations représentatives de son activité. Ces mutations doivent être réparties sur différents gènes ou exons et doivent prendre en compte les différents types de variants que l'on veut identifier (mutations ponctuelles, indel...).

Il est préconisé de s'assurer que l'on détecte correctement les variants pouvant poser des difficultés particulières avec la technique utilisée (zones riches en bases « GC », mutations situées en limites d'amplicon, insertion/délétion...). Il peut être utile d'avoir une liste d'échantillons d'ADN à utiliser pour les validations.

REMARQUE En cas de changement de panel, il est nécessaire de réaliser au moins un run de validation (cf. § « gestion de portée flexible ») et de revalider l'ensemble des paramètres.

² Association nationale des praticiens de génétique moléculaire

PARAMÈTRES À VALIDER

La recherche de mutations en NGS donne une information sur la présence ou non d'une mutation.

Les paramètres suivants doivent être validés :

- la spécificité diagnostique ;
- la sensibilité diagnostique ;
- les contaminations ;
- la stabilité des réactifs ;
- la robustesse ;
- une comparaison avec une méthode de référence et/ou avec une méthode déjà utilisée au laboratoire.

Par ailleurs, compte tenu des spécificités des méthodes existantes pour la recherche de mutations (utilisation de mesures quantitatives), les **limites de détection (allèle sauvage/allèle muté)**, la **répétabilité** et la **reproductibilité** peuvent faire l'objet d'une évaluation.

Les paramètres de **justesse** et d'**exactitude** ne peuvent pas être évalués compte tenu de la rareté et du coût très élevé des étalons.

REMARQUE Les tests réalisés pour la validation de méthode doivent permettre d'évaluer les limites de la technique avant un passage en routine. Ces tests sont à réaliser après que le laboratoire ait acquis une bonne maîtrise de la technique et ne sont donc pas suffisants pour permettre la mise en place de la technique. Les nombreux tests pour la prise en main de la technique et la formation du personnel doivent être réalisés en amont. Il est important que ces tests soient faits sur un processus complètement stabilisé (protocoles, taille de séries, analyses bio-informatiques).

❖ INTERVALLE DE LA MESURE - LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection minimale à atteindre en génétique somatique est fixée à 10 % d'allèles mutés pour les cibles d'intérêt clinique validé. Cette limite doit toutefois être définie par chaque laboratoire en fonction de la qualité des échantillons à analyser (cf. § « qualification des échantillons »).

Un laboratoire qui reçoit beaucoup de prélèvements pauvres en cellules tumorales doit adapter sa technique d'analyse en conséquence pour permettre la détection de mutations à une fréquence inférieure à 10 %. L'objectif est de réduire le nombre de résultats non contributifs. Un taux de résultats non contributifs acceptable est d'environ 10 %.

Profondeur minimale de séquençage :

Elle ne peut être prédéterminée car elle dépend de la stratégie d'analyse et des procédés en amont tels que :

- la limite de détection définie par le laboratoire ;
- la quantité de copies du génome présente sur la puce ;
- le pourcentage de cellules tumorales de l'échantillon ;
- le bruit de fond. Le bruit de fond doit être évalué. En pratique, son impact est généralement déterminant lorsque la limite de détection fixée par le laboratoire est inférieure à 10 %.

En pratique, la profondeur de séquençage est déterminante pour les résultats négatifs (risque de faux négatifs si la profondeur est insuffisante) ou pour des résultats positifs avec une fréquence allélique très faible.

La profondeur de séquençage nécessaire dépend des protocoles et du niveau de bruit de fond mais, pour une limite de détection de 10 %, une profondeur de 300X semble appropriée pour les protocoles en PCR et de 200X pour les protocoles en capture.

❖ SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUES

Selon le COFRAC³, la spécificité et la sensibilité diagnostiques doivent être calculées pour au moins 15 échantillons non mutés et 15 échantillons mutés représentatifs de l'activité du laboratoire. Dans le cadre des analyses par NGS où plusieurs mutations peuvent être identifiées pour un patient, la notion de vrai ou faux positifs utilisée pour le calcul s'entend en nombre de mutations et non en nombre de patients. Toutes les mutations prises en compte pour le calcul doivent être vérifiées. Ces paramètres peuvent être déterminés à partir des CQI. Le nombre d'échantillons peut être diminué en fonction du nombre de mutations comprises dans ces échantillons.

$$\text{sensibilité diagnostique} = \frac{\text{nb mutations vrais positifs}}{\text{nb mutations vrais positifs} + \text{nb mutations faux négatifs}}$$

$$\text{spécificité diagnostique} = \frac{\text{nb mutations vrais négatifs}}{\text{nb mutations vrais négatifs} + \text{nb mutations faux positifs}}$$

Après stabilisation du protocole d'analyse, il est nécessaire de réaliser une validation sur des données externes et sur des échantillons réels. Le nombre d'échantillons évalués doit être d'au moins 30 patients. Il est important de définir le bruit de fond minimal de la méthode pour avoir des critères objectifs de décision sur le rendu des variants. Le laboratoire doit s'assurer que la sensibilité de sa technique est au moins égale à celle citée dans le compte rendu.

❖ CONTAMINATIONS INTER-RUN ET INTER-ÉCHANTILLONS

Un essai de contamination doit être réalisé pour toute accréditation en portée B afin de s'assurer qu'aucune contamination inter-échantillon ou inter-réactif ne peut avoir lieu dans les conditions normales de réalisation des analyses. Toutefois, cet essai ne garantit pas l'absence de contaminations externes, qui ne peut être contrôlée que par une bonne traçabilité des analyses réalisées en routine.

Points de vigilance particuliers pour le NGS :

- contamination inter-runs : au niveau du séquenceur ou de la préparation des bibliothèques.
- contamination intra-run : ce critère est déterminant dans la mesure où le multiplexage d'échantillons de patients est inhabituel. Il s'agit plus particulièrement de prendre des mesures afin de s'assurer qu'il n'y a pas de mélange d'échantillons de différents patients sur un même run.

REMARQUE Suivi des contaminations :

- changement des jeux de codes-barres entre chaque run pour contrôler la contamination inter-run ;
- il est important de suivre les mutations sur le CQI et de s'assurer qu'il n'y a pas de nouvelles mutations dans les contrôles positifs. Il est conseillé d'utiliser un blanc d'extraction et de PCR. Si celui-ci n'est pas séquencé, une quantification d'ADN peut être réalisée pour vérifier la contamination dans les étapes pré-analytiques. Si un blanc est séquencé, il faut définir une limite du nombre de reads tolérés pour les blancs/codes-barres contaminants.
- lors de la validation d'un run, il faut vérifier qu'on ne retrouve pas une mutation rare sur plusieurs patients d'un même run. Il peut être utile de comparer les SNP entre les patients. Cette comparaison risque cependant d'être difficile en génétique somatique car les panels utilisés ne contiennent généralement pas beaucoup de polymorphismes.

Test de contamination spécifique

Par exemple, pendant la phase de validation, l'ajout de puits contenant de l'eau en alternance avec les puits contenant des échantillons peut être effectué pour évaluer cette contamination.

❖ COMPARAISON DE MÉTHODES

La comparaison de méthodes peut utiliser les résultats produits pour la détermination de la sensibilité et de la spécificité. Elle doit être effectuée pour au moins 15 échantillons non mutés et 15 échantillons mutés représentatifs de l'activité du laboratoire.

³ SH GTA 04 – Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. COFRAC, Avril 2011

La technique de séquençage de Sanger a été considérée comme une méthode de référence. Elle peut être utile pour la qualification de variants à plus de 10 %. Pour des variants avec une fréquence allélique de moins de 10 %, la comparaison avec une autre méthode utilisée dans le laboratoire en routine doit être effectuée. La technique utilisée pour la comparaison de méthodes doit notamment être adaptée à la limite de détection ciblée. Des données antérieures peuvent être reprises. Les données des contrôles de qualité externes peuvent consolider la comparaison de méthodes.

❖ STABILITÉ DES RÉACTIFS ET DES LIBRAIRIES

Des procédures doivent être mises en place dans le laboratoire pour éviter une dégradation de la qualité des résultats obtenus liée à un problème de stabilité des réactifs ou des produits de PCR :

- les réactifs doivent être stockés selon les recommandations du fournisseur ;
- les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption ;
- il faut limiter le nombre de décongélations. Un aliquotage des réactifs doit permettre d'en limiter le nombre ;
- la durée de conservation des produits d'amplification (purifiés ou non) doit être définie et mentionnée dans les modes opératoires. Elle peut être vérifiée lors de l'utilisation en routine ;
- pour des raisons de coûts, chaque nouveau lot de réactifs ne pourra être testé avant une utilisation en routine. Une analyse des CQI et une comparaison rétrospective pourra être faite avant validation du run.

REMARQUE Un suivi de la qualité de séquençage du CQI au cours du temps peut être utilisé pour détecter une dégradation des réactifs.

❖ DÉTERMINATION DU BRUIT DE FOND

La détermination du bruit de fond est une étape importante pour la validation de méthode du NGS. Elle permet en effet de déterminer le nombre de reads minimum pour considérer un variant. La détermination du bruit de fond peut se faire en évaluant les runs utilisés pour la détermination de la sensibilité/spécificité. Il peut aussi utiliser les données de répétabilité/reproductibilité qui sont produits à partir d'échantillons de référence.

❖ RÉPÉTABILITÉ

Ce paramètre n'est pas obligatoire en cas de validation d'une technique qualitative. Il pourra cependant être évalué sur un mode qualitatif (muté/non muté).

Un essai peut être réalisé en comparant les résultats à minima sur un échantillon contenant des mutations représentatives en *triplicata* dans un même run. L'évaluation de la répétabilité se fait sur les paramètres de qualité identifiés pour chaque méthode (valeur quantifiable ou mutée/non mutée).

❖ REPRODUCTIBILITÉ

L'évaluation de la reproductibilité consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes au cours du temps (opérateur, lot de réactif...). D'après les documents COFRAC⁴, elle est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et deux niveaux minimum. Pour des raisons de coût de réactifs, le nombre d'essais peut être limité. Les échantillons utilisés pour la répétabilité peuvent être utilisés pour la reproductibilité à deux niveaux minimum de mutations (un échantillon avec un faible pourcentage d'allèle muté et un échantillon fortement muté). Ces données peuvent aussi être obtenues par un suivi longitudinal des contrôles de qualité interne (CQI).

Le test de reproductibilité peut être complété par les données générées pendant la phase de réalisation des analyses en parallèle avec les techniques de routine du laboratoire.

❖ ROBUSTESSE

En méthode qualitative, la robustesse est approchée par la maîtrise des risques. Des tests spécifiques de robustesse devraient être réalisés si des éléments critiques ont été identifiés (cf. § « maîtrise des risques »). Une comparaison des résultats des CQI peut être utilisée pour vérifier la robustesse, à condition de pouvoir

⁴ SH GTA 04 – Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. COFRAC, Avril 2011

suivre tous les paramètres à évaluer lors de la réalisation des tests (traçabilité des paramètres vérifiés, pipettes, lots, thermocycleurs...). Des données de la littérature peuvent appuyer ces données.

REMARQUE Il est conseillé d'évaluer la robustesse de manière rétrospective par comparaison de la stabilité des résultats dans le temps *via* une comparaison rétrospective des résultats des contrôles qualité internes. Des essais spécifiques peuvent être réalisés dans un deuxième temps si l'on détecte un risque particulier.

❖ INTERFÉRENCES

Des interférences peuvent exister au niveau de la PCR (Wilson et al, 1997 ; Wong et al, 2014) Les interférences fréquentes pour les échantillons étudiés doivent être listées et les mesures prises pour prévenir l'inhibition de la PCR doivent être précisées dans le dossier.

Les conséquences des interférences les plus courantes pour les analyses sont soit l'impossibilité de rendre un résultat, soit l'existence d'artefacts. Les interférences les plus courantes sont :

- les conditions de fixation ;
- la qualité du fixateur ;
- les nécroses ;
- la présence de mucine, de mélanine.

Ces interférences ont un impact sur la qualité de l'ADN et sa capacité à être amplifiable. La présence de ces facteurs ne doit pas empêcher la réalisation de ces analyses. Le rendu du résultat devra prendre en compte ces facteurs, en particulier pour les situations sans mutation détectée, ou au contraire avec trop de mutations détectées.

REMARQUE En l'absence d'informations précises sur la qualité de la fixation des prélèvements, le risque d'interférences ne peut être maîtrisé par le laboratoire en aval. Les interférences peuvent notamment se manifester par :

- une profondeur de séquençage insuffisante ou trop de régions mal séquencées ;
- la présence d'un grand nombre de mutations pour un patient, qui doit alerter sur le risque d'observer des artefacts. Les mutations artefactuelles sont le plus souvent présentes à fréquences alléliques faibles, comprises entre 0 et 10 %. En fonction du seuil de positivité défini par le laboratoire, il peut donc y avoir un risque de considérer une mutation artefactuelle comme de vrai variant. La stratégie d'analyse mise en place par le laboratoire doit prendre en compte le bruit de fond, par exemple en éliminant les variants présents à faible fréquence, en retirant les artefacts récurrents identifiés ou en utilisant des approches de séquençage en double index. .

ANALYSE DES RÉSULTATS EN ROUTINE

❖ VALIDATION D'UN RUN

Vérification :

- des mutations retrouvées dans le contrôle positif (CQI) ;
- de la fréquence des allèles mutés dans le/les CQI ;
- des blancs utilisés s'ils sont séquencés et absence de contamination ;
- de l'absence de défaut global de couverture sur tous les échantillons pour un amplicon donné. Toutes les régions rapportées dans le compte rendu doivent répondre aux critères de qualité fixés par le laboratoire en termes de profondeur de séquençage (minimum de 200X en capture et 300X en amplicon) ;
- de la profondeur globale de tous les échantillons pour détecter d'éventuels résultats aberrants (« outlier »).

❖ VALIDATION DES LIBRAIRIES

Vérification :

- de la profondeur globale de tous les échantillons ;
- de la qualité globale (Q30, Qmapping) des données générées pour chaque échantillon.

❖ VALIDATION DES VARIANTS IDENTIFIÉS EN ROUTINE

- Pour les résultats négatifs, il est important de vérifier la profondeur minimale pour le locus étudié (au moins 300X pour l'enrichissement en PCR, 200X pour les techniques en capture).
- Pour les variants, un nombre minimal de reads mutés doit être défini pour valider une mutation. Celui-ci doit être supérieur au bruit de fond, et peut être exprimé en valeur absolue ou en % du nombre total de reads sur une position. Si le seuil est défini en % du nombre de reads, il est nécessaire que le nombre total de reads sur cette position soit au moins égal à la profondeur minimale définie pour les négatifs.
- Il est important d'identifier tout échantillon avec un nombre important de mutations qui peut alerter sur un risque d'observer des mutations artefactuelles. En général, une augmentation du bruit de fond est associée à un défaut de qualité et expose à des risques de faux positifs / négatifs.

REMARQUE. En cas d'invalidation, une stratégie de recours doit être prédéfinie pour les variants trouvés sur les hotspots.

REMARQUE La confirmation des variants par une technique alternative peut être limitée à la phase de validation. Une fois la technique validée et utilisée en routine, il n'est pas indispensable de continuer à vérifier tous les variants par une autre technique. Des vérifications *in silico* (BAM) peuvent être acceptables.

ÉVOLUTIONS DU PROTOCOLE (PORTÉE B)

L'adoption de portées de type flexible s'accompagne d'une procédure dite de "gestion de la portée flexible" (ou encore "gestion des changements techniques") listant l'ensemble des opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement de méthode ou de réactif ne faisant pas intervenir de compétence nouvelle. Le laboratoire doit mettre en place une procédure spécifique destinée à cadrer une portée B et à maîtriser les changements de méthodes. Cette procédure décrit l'ensemble des étapes en partant du besoin initial du laboratoire (nouvel automate, évolution de méthode,...) jusqu'à la mise à jour de la liste détaillée des examens et la communication au COFRAC⁵, avec les responsabilités associées à chacune des étapes.

Actuellement, pour les techniques de NGS, on observe des évolutions rapides des protocoles. Cela concerne particulièrement les changements de librairies et les modifications des algorithmes d'analyse. En conséquence, il est nécessaire de prédéfinir les modalités de vérification des performances de la méthode pour ces changements de protocole. Ainsi, en cas de changement de la librairie, il est nécessaire de réaliser au moins un run de validation, dont le dessin expérimental doit s'adapter à la modification de protocole (à documenter lors de la mise à jour du dossier de validation ou d'une annexe en fonction des procédures internes).

REMARQUE Il n'est pas nécessaire de refaire une validation complète en cas d'évolution du protocole mais il convient de vérifier les performances de la méthode à chaque changement. Il est également impératif d'assurer la traçabilité et le suivi des versions des protocoles utilisés en routine.

⁵ SH REF 08 – Expression et évaluation des portées d'accréditation. COFRAC, Juin 2010

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANPGM.** Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode Sanger pour la recherche de mutations. **2012**
- Cottrell CE,** Al-Kateb H, Bredemeyer AJ, Duncavage EJ, Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM, Hagemann IS, O'Guin SM, Burcea LC, Sawyer CS, Oschwald DM, Stratman JL, Sher DA, Johnson MR, Brown JT, Cliften PF, George B, McIntosh LD, Shrivastava S, Nguyen TT, Payton JE, Watson MA, Crosby SD, Head RD, Mitra RD, Nagarajan R, Kulkarni S, Seibert K, Virgin HW 4th, Milbrandt J, Pfeifer JD. J Mol Diag. Validation of a Next-Generation Sequencing Assay for Clinical Molecular Oncology. J Mol Diag, **2014** 16(1):89-105
- Ellard S,** Charlton R, Lindsay H, Camm N, Watson C, Abbs S, Mattocks C, Taylor G, the CMGS Executive Committee. Practice guidelines for targeted next Generation sequencing analysis and interpretation. **2012**
- Gargis AS,** Kalman L, Berry MW, Pick DP, Dimmock DP, Hambuch T, Lu F, Lyon E, voelkerding KV, Zhnbauer B, Agarwala R, Bennett SF, Chen B, Chin ELH, Compton JG, Ganova-Raeva SL, Geigenmüller U, Gonselman SJ, Hegde MR, Johnson PLF, Kasarskis A, Kulkarni S, Merker T, Rajeevan MS, Reese MG, Rehm HL, Simen BB, Yeakley JM, Zook JM, Lubin IM. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat biotechnol, **2012** ; 30(11):1033-1036
- Matthijs G,** Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Siermans E, Sturm M, Weiss M, Yntema H, Bakker E, Scheffer H, Bauer P; Eur J Hum Genet. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. **2015.** 226
- Mattocks CJ,** Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A, the EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Human Genetics, **2010** 18:1276-88
- Rehm HL,** Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JZ, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E, the Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Med, **2013** 15:733-747
- Singh RR,** Patel KP, Routbort MJ, Reddy NG, Barkoh BA, Handal B, Kanagal-Shamanna R, Greaves WO, Medeiros LJ, Aldape KD, Luthra R. Clinical Validation of a Next-Generation Sequencing screen for Mutational Hotspots in 46 Cancer-Related Genes. **2013** 15(5):607-622
- Wong SQ,** Li J, Tan AY, Vedururu R, Pang JM, Do H, ellul J, Doig K, Bell A, MacArthur GA, Fox SB, Thomas DM, Fellowes A, Parisot JP, Dobrovic A ; CANCER 2015 Cohort. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. **2014** 13:7:23

PARTICIPANTS AU GROUPE DE TRAVAIL

Nom	Établissement	Fonction
Attignon Valéry	CLCC Lyon	Biologiste
Bezieau Stéphane	CHU Nantes	Biologiste
Blons Hélène	AP-HP – Paris	Biologiste
Castera Laurent	CLCC Caen	Biologiste
Chabane Kaddour	CHU Lyon	Ingénieur
Collet Agnès	Institut Curie – Paris	Biologiste
Cortes Ulrich	CHU Poitiers	Ingénieur
Descarpentries Clotilde	CHRU Lille	Biologiste
Escande Fabienne	CHRU Lille	Biologiste
Gérard Bénédicte	CHRU Strasbourg	Biologiste
Gros Audrey	CHU Bordeaux	Biologiste
Guérin Eric	CHRU Strasbourg	Biologiste
Harlé Alexandre	CLCC Nancy	Pharmacien biologiste
Hayette Sandrine	CHU Lyon	Biologiste
Hostein Isabelle	CLCC Bordeaux	Biologiste
Jones Natalie	CLCC Bordeaux	Ingénieur
Karayan-Tapon Lucie	CHU Poitiers	Biologiste
Lespagnol Alexandra	CHU Rennes	Ingénieur
Morel Alain	CLCC Angers	Biologiste
Mosser Jean	CHU Rennes	Biologiste
Nibourel Olivier	CHRU Lille	Biologiste
Oca Florine	CHU Angers	Biologiste
Pasmant Eric	AP-HP – Paris	Biologiste
Pierron Gaelle	Institut Curie – Paris	Biologiste
Poulain Stéphanie	CHRU Lille	Biologiste
Primois Charlotte	CLCC Bordeaux	Technicien
Prunier Delphine	CHU Angers	Biologiste
Ricou Agathe	CLCC Caen	Biologiste
Rouleau Etienne	Institut Curie – Paris	Biologiste

Pour plus d'informations
e-cancer.fr

Institut National du Cancer
52, avenue André Morizet
92100 Boulogne-Billancourt
France

Tel. +33 (1) 41 10 50 00
Fax +33 (1) 41 10 50 20
diffusion@institutcancer.fr

e-cancer.fr

