



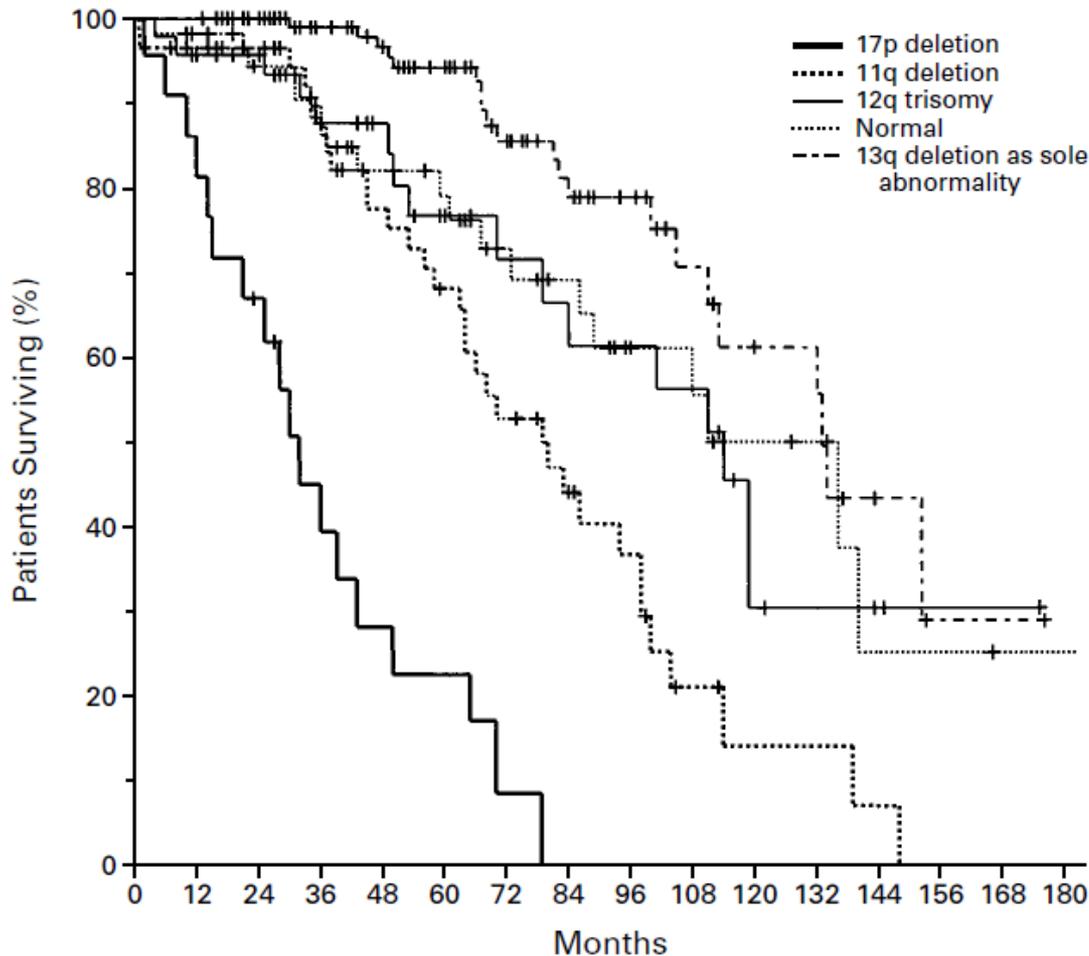
**MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE  
NANOSTRING ET COMPARAISON  
AUX TECHNIQUES DE RÉFÉRENCE  
POUR LA RECHERCHE  
D'ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES  
DANS LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE  
CHRONIQUE ET LE MYÉLOME  
MULTIPLE**

**Béatrice Grange**

Journée du GFCH

11 Octobre 2018

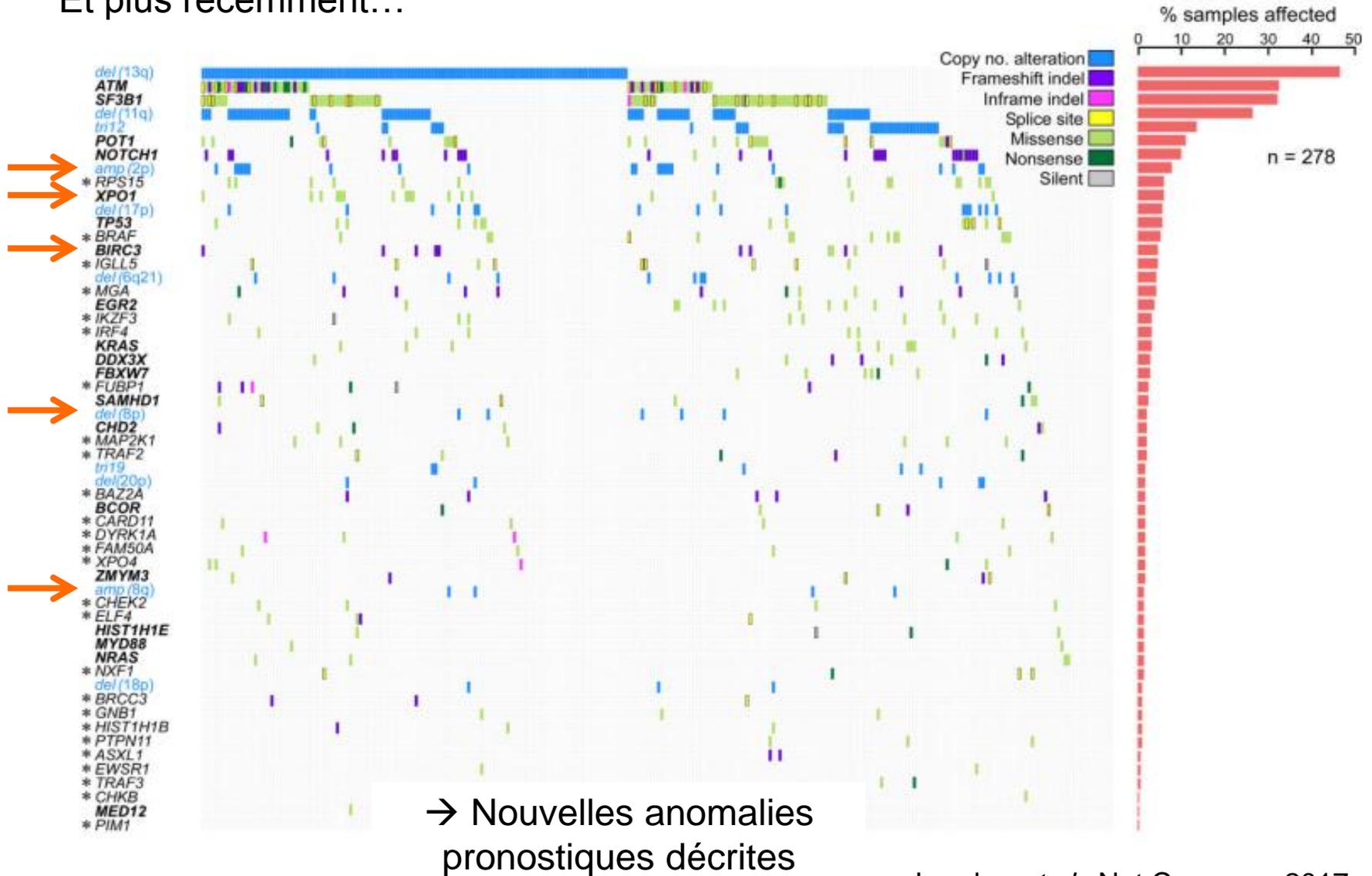
# LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE



→ **Délétion 17p** :  
anomalie de pronostic  
défavorable  
+ valeur théranostique

# LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE

Et plus récemment...



# MYÉLOME MULTIPLE

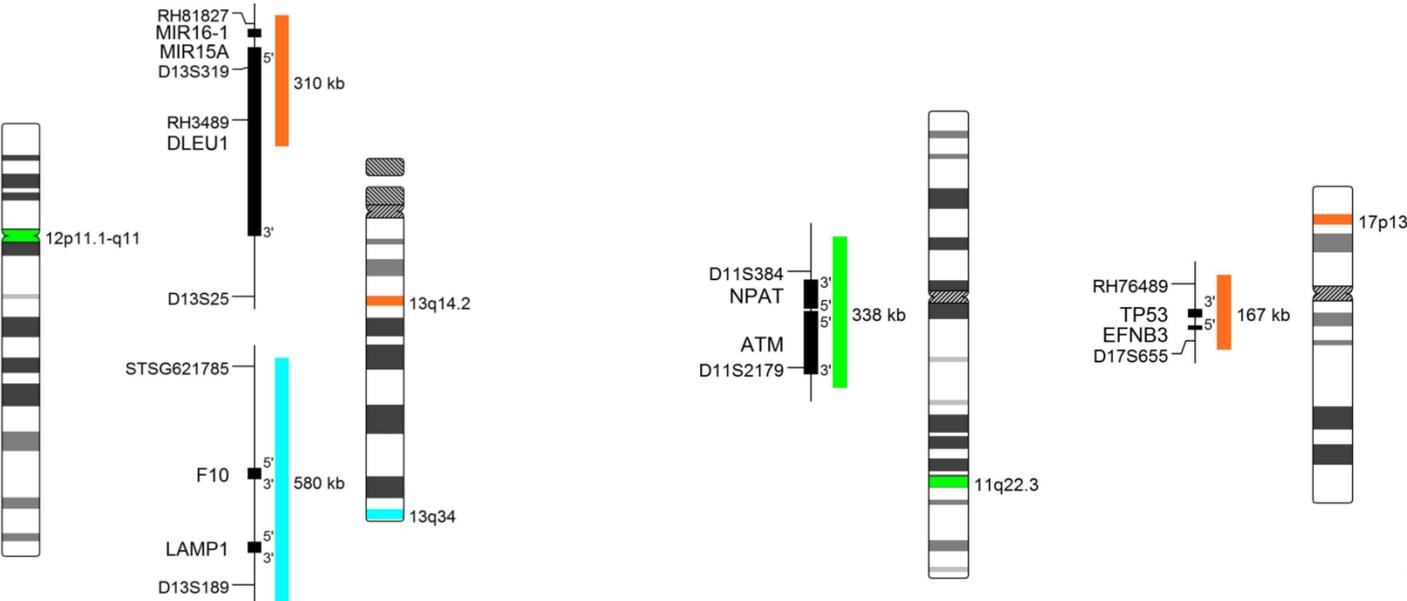
- Nombreuses anomalies chromosomiques décrites :
  - Trisomies 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19
  - Translocations impliquant IgH (14q32) :
    - 4p16 (*FGFR3*), 11q13 (*CCND1*), 16q23, 20q11, 6p21
- Mauvais pronostic : t(4;14)(p16;q32), del 1p32, gain 1q, del 17p

Avet-Loiseau *et al.*, J Clin Oncol 2012



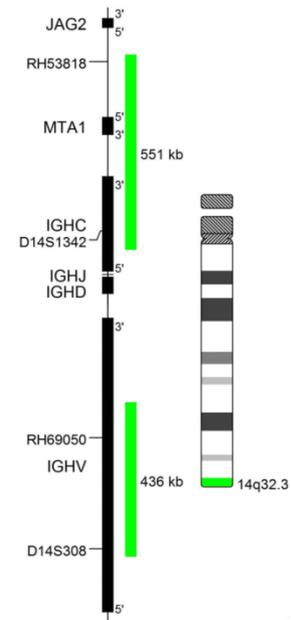
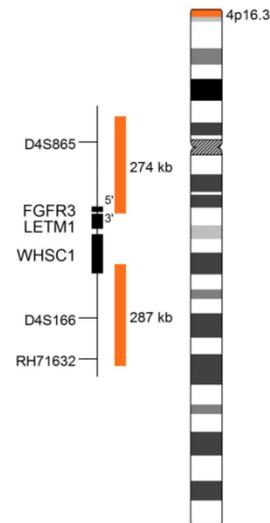
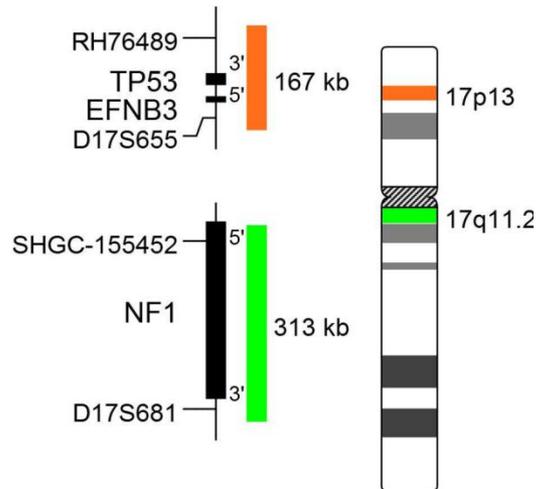
# ACTUELLEMENT DANS LA LLC

→ FISH



# ACTUELLEMENT DANS LE MYÉLOME MULTIPLE

→ FISH



# ET LES AUTRES ANOMALIES ?

- Non détectées actuellement
- Possible ? Oui mais utilisation de sondes de FISH supplémentaires
  - Coût ++
  - Temps d'analyse ++
- Technique alternative ?





# OBJECTIFS

- Evaluation des performances de la technologie Nanostring pour la détection de CNV (gains ou pertes) dans ces deux pathologies



# MATÉRIELS ET MÉTHODES

- 3 cohortes de patients :
  - 1 cohorte LLC (60 patients)
    - FISH (panels LLC, Metasystems)
    - Nanostring
  - 1 cohorte myélome multiple (24 patients)
    - FISH (sonde *TP53/NF1*, Metasystems)
    - CGH-array (puce 8x60K, Agilent)
    - Nanostring
  - 1 cohorte de témoins (19 patients)
    - Nanostring



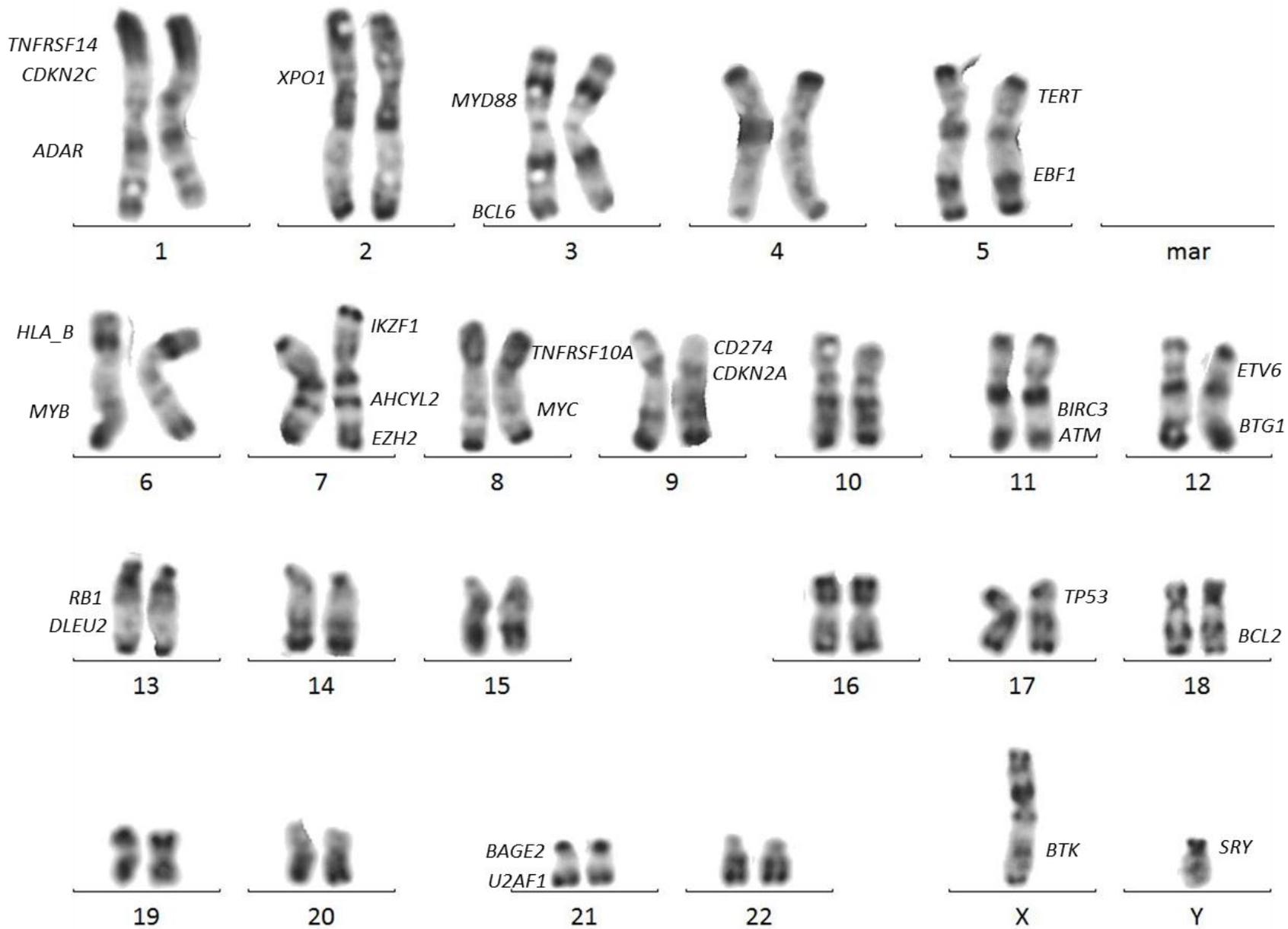
# MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Design panel Nanostring

- 29 gènes, ciblés chacun par 3 sondes

<i>TNFRSF14</i> 1p36.32	<i>IKZF1</i> 7p12.2	<i>BTG1</i> 12q21.33
<i>CDKN2C</i> 1p32.3	<i>AHCYL2</i> 7q32.1	<i>RB1</i> 13q14.2
<i>ADAR</i> 1q21.3	<i>EZH2</i> 7q36.1	<i>DLEU2</i> 13q14.2
<i>XPO1</i> 2p15	<i>TNFRSF10A</i> 8p21.3	<i>TP53</i> 17p13.1
<i>MYD88</i> 3p22.2	<i>MYC</i> 8q24.21	<i>BCL2</i> 18q21.33
<i>BCL6</i> 3q27.3	<i>CD274</i> 9p24.1	<i>BAGE2</i> 21p11.2
<i>TERT</i> 5p15.33	<i>CDKN2A</i> 9p21.3	<i>U2AF1</i> 21q22.3
<i>EBF1</i> 5q33	<i>BIRC3</i> 11q22.2	<i>BTK</i> Xq22.1
<i>HLA_B</i> 6p21.33	<i>ATM</i> 11q22.3	<i>SRY</i> Yp11.2
<i>MYB</i> 6q23.3	<i>ETV6</i> 12p13.2	





# MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Design panel Nanostring
  - 29 gènes, ciblés chacun par 3 sondes
  - 10 sondes invariantes
  - Contrôles positifs et négatifs



# MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Analyse des données de comptes bruts
  - Normalisation inter-patients (sondes invariante, population des témoins)
  - Calcul du Z-score pour chaque sonde :

$$Z = \frac{C - \mu}{\sigma}$$

C : valeur du compte normalisé pour ce locus

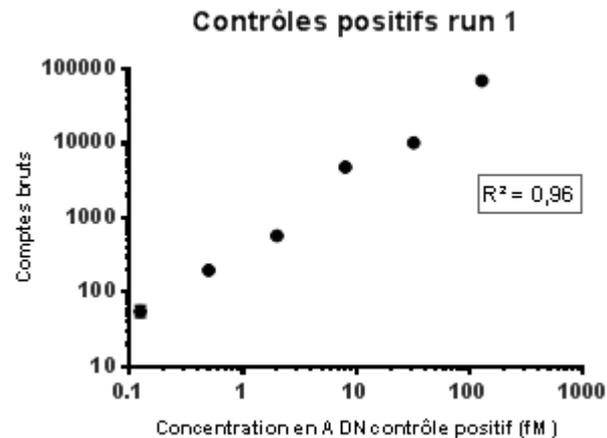
$\mu$  : moyenne de l'ensemble des témoins pour ce locus

$\sigma$  : écart-type de l'ensemble des témoins pour ce locus



# VALIDATION DE LA TECHNIQUE

- Contrôles positifs



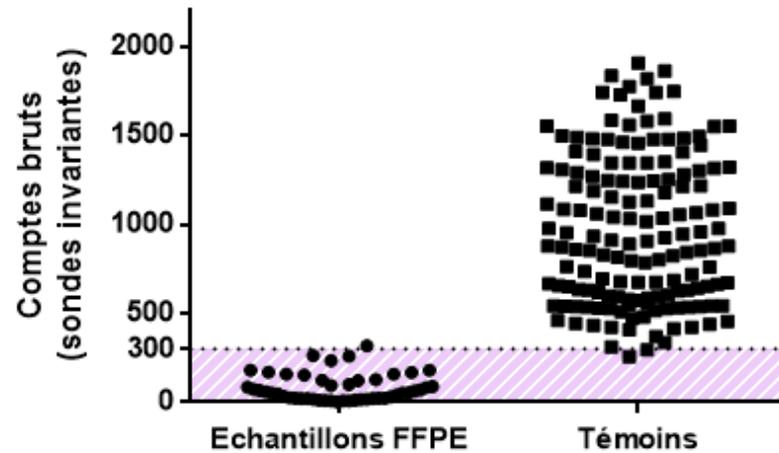
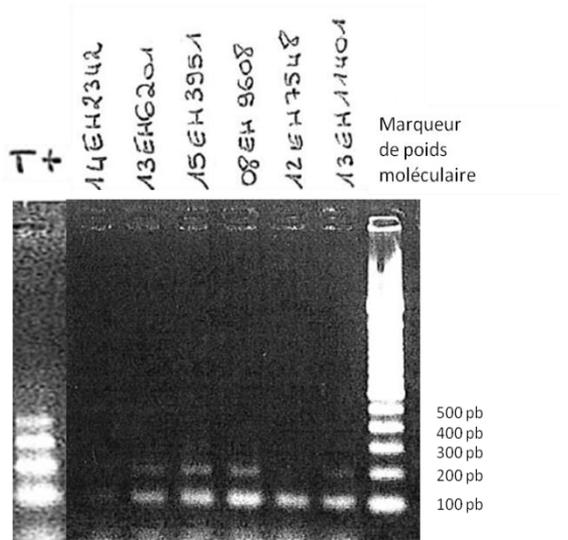
Run	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
R <sup>2</sup>	0,9600	0,9694	0,9689	0,9549	0,9567	0,9577	0,9767	0,9813	0,9746	0,9735	0,9592

- Contrôles négatifs



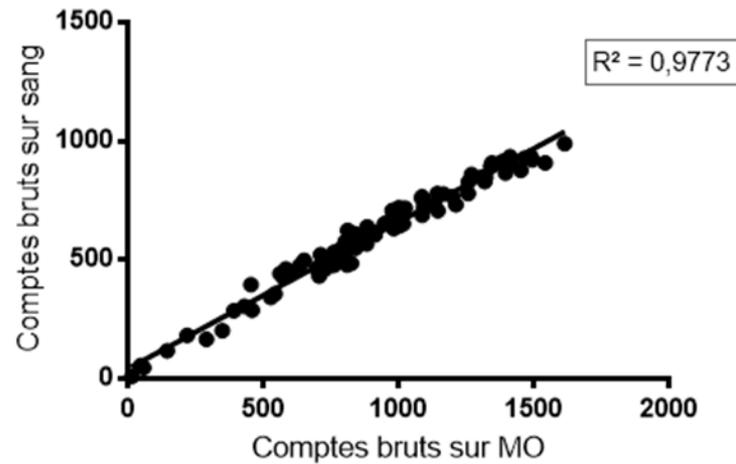
# VALIDATION DE LA TECHNIQUE

- Qualité de l'ADN analysable



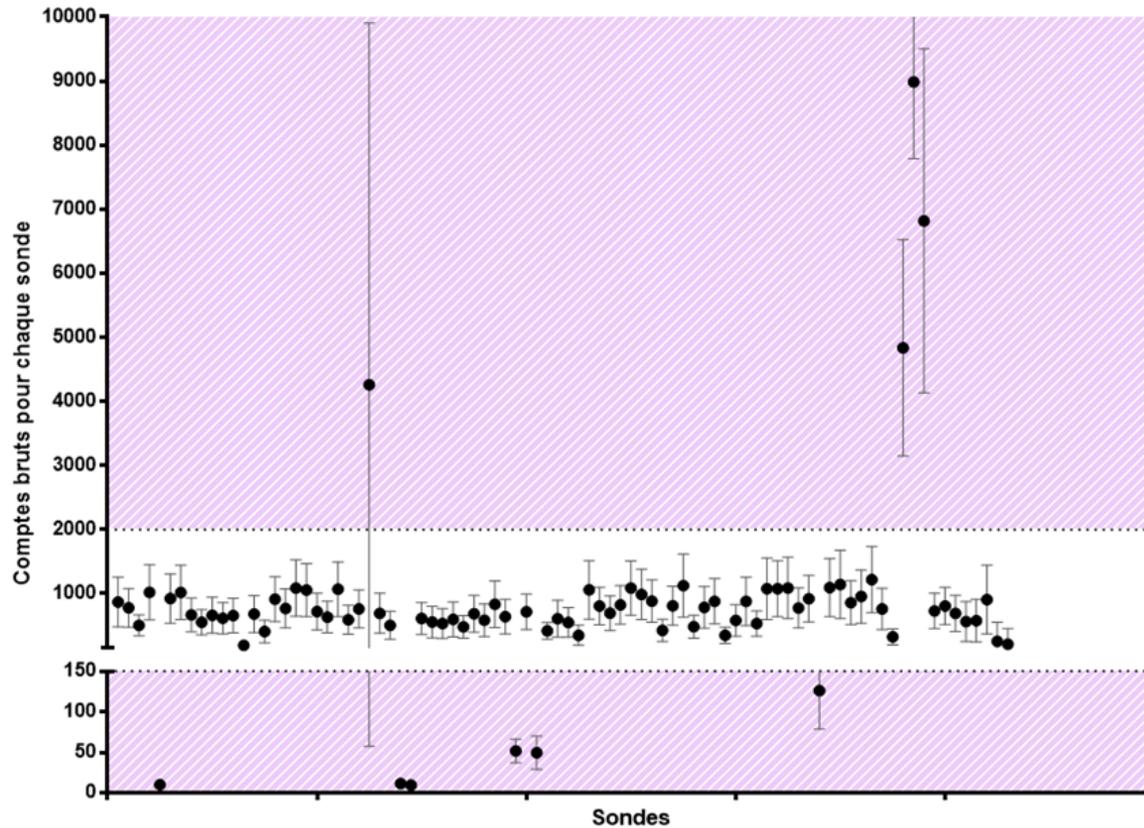
# VALIDATION DE LA TECHNIQUE

- Corrélation entre prélèvements de nature différente



# VALIDATION DE LA TECHNIQUE

- Validation des sondes utilisées



# COMMENT ANALYSER LES Z-SCORES GÉNÉRÉS ?

- Pour un locus donné : les 3 Z-scores (des 3 sondes ciblant le locus) ne sont pas toujours concordants...

Exemples :

CDKN2C 1p32.3	-7,1712416
CDKN2C	1,0660667
CDKN2C	3,9048421

BTG1 12q21.33	-0,2291427
BTG1	3,0201006
BTG1	-6,5313866

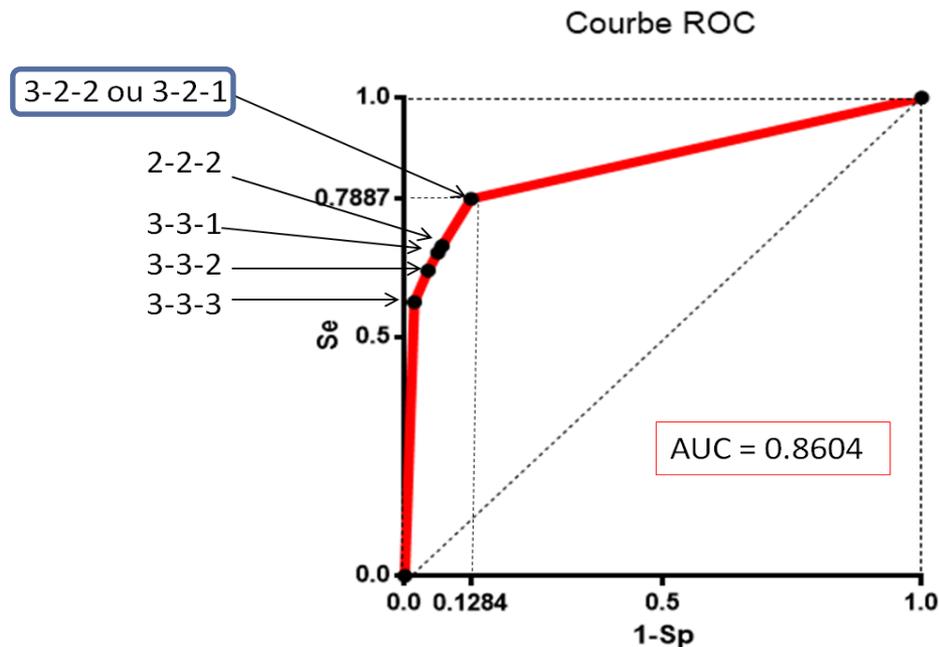
DLEU2 13q14.2	-4,8029953
DLEU2	3,0877824
DLEU2	1,4807073

CDKN2A 9p21.3	1,3279427
CDKN2A	-3,6584923
CDKN2A	4,1147573



# COMMENT ANALYSER LES Z-SCORES GÉNÉRÉS ?

- Cohorte de myélome multiple ; technique de référence : CGH-array
- Plusieurs combinaisons de Z-scores testées

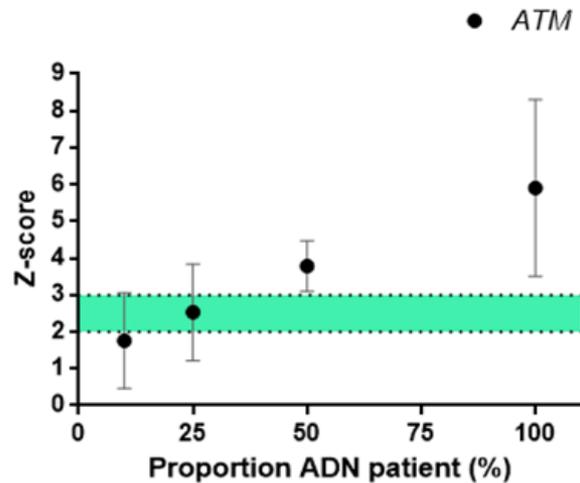


# SEUIL DE POSITIVITÉ

- Cohorte de LLC : choix de patients présentant une anomalie exprimée à fort pourcentage en technique FISH
  - Dilution de l'ADN du patient par l'ADN d'un témoin



# SEUIL DE POSITIVITÉ



Pourcentage de présence du CNV	100%	50%	25%	10%
Z-scores	8,56855	3,608239	1,525419	0,473067
	3,912101	3,192124	2,04995	1,73424
	5,240139	4,546564	4,022045	3,06795
CNV détecté ?	Oui	Oui	Oui	Non

→ Seuil de positivité  $\approx 20\%$



# RÉSULTATS : MYÉLOME MULTIPLE

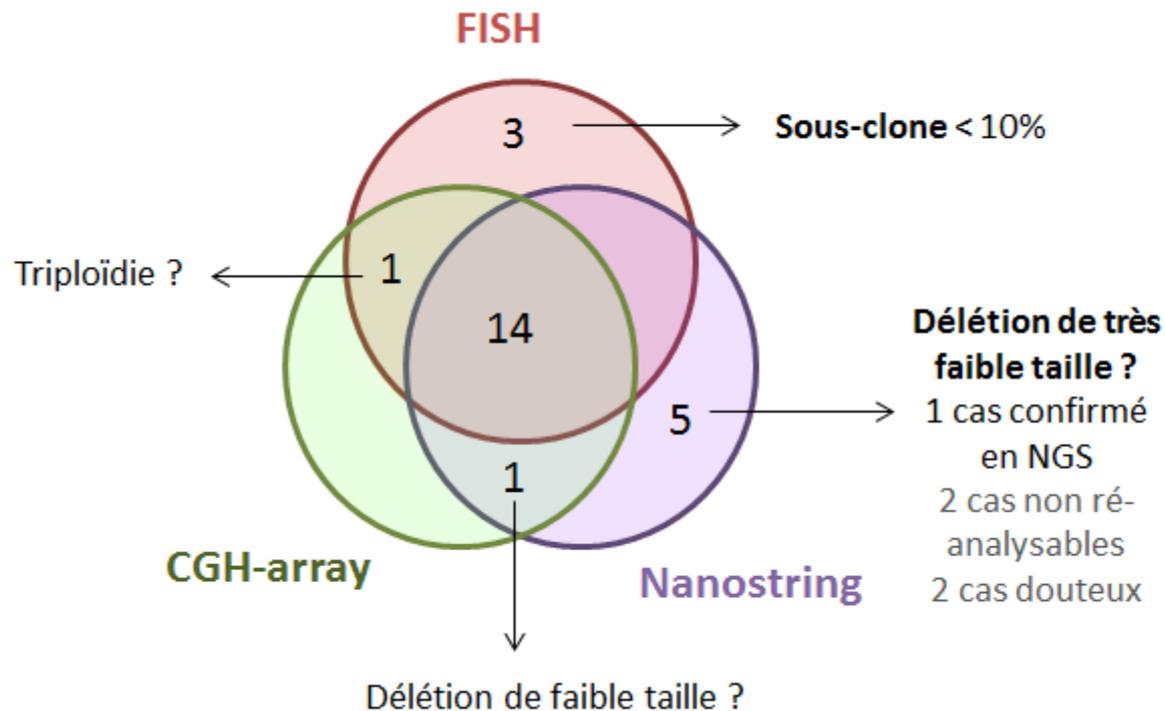
- Tous loci confondus :  
Sensibilité = 78,87% ; Spécificité = 87,16%
- Focus sur quelques loci d'intérêt :

	CGH-array	Nanostring
Délétion 1p32	4 patients	Concordant 3/4
Gain 1q	12 patients	Concordant 12/12
Gain du chromosome 3	9 patients	Concordant 8/9
Gain du chromosome 5	10 patients	Concordant 10/10
Monosomie 13 ou délétion 13q	9 patients	Concordant 9/9
Gain du chromosome 21	5 patients	Concordant 4/5



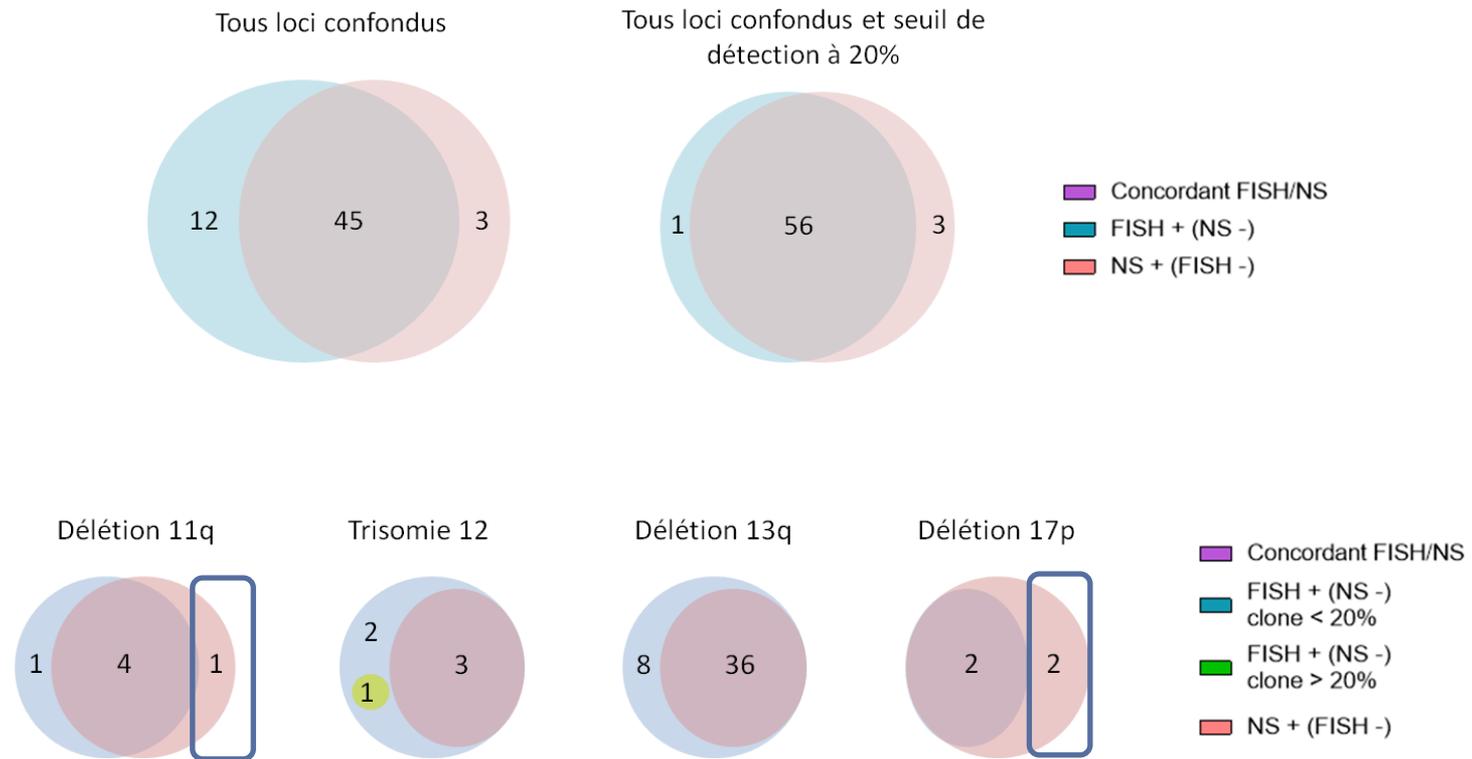
# RÉSULTATS : MYÉLOME MULTIPLE

## ○ Locus *TP53* :



# RÉSULTATS : LLC

- Sensibilité = 83,89% ; Spécificité = 99,06%



→ 1 cas analysé en NGS : douteux

# DISCUSSION

- Résultats préliminaires intéressants :
  - Sensibilité  $\approx$  80% ; Spécificité  $\approx$  87% (myélome) et 99% (LLC)
  - Détection de **délétions de faibles tailles**
    - Technique meilleure que la FISH ?
  
- Un seuil de 20% est-il acceptable ?

Avet-Loiseau *et al.*, Blood, 2007

Avet-Loiseau *et al.*, J Clin Oncol, 2010

Hebraud *et al.*, Leukemia, 2014



# DISCUSSION

- Validation des résultats obtenus :
  - 1 cohorte nationale pour la LLC (BOMP)
  - 2 cohortes internationales pour le myélome multiple
- Méthode d'analyse des données brutes plus robuste

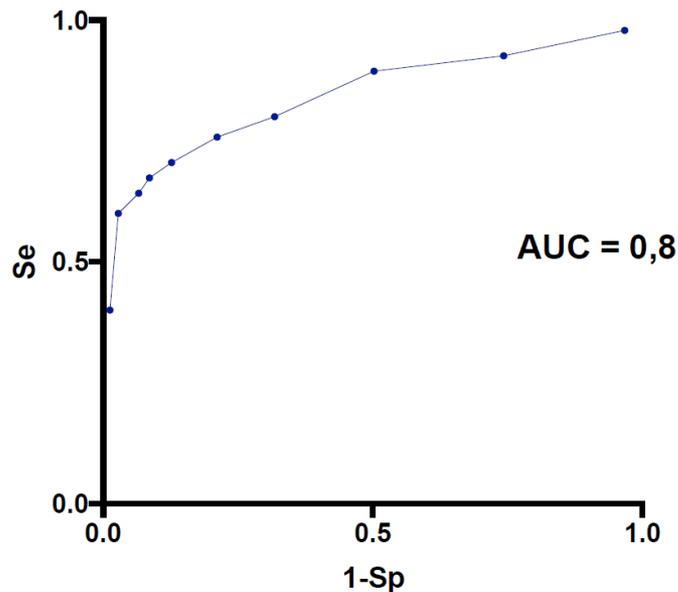


# MÉTHODE D'ANALYSE DES DONNÉES BRUTES GÉNÉRÉES

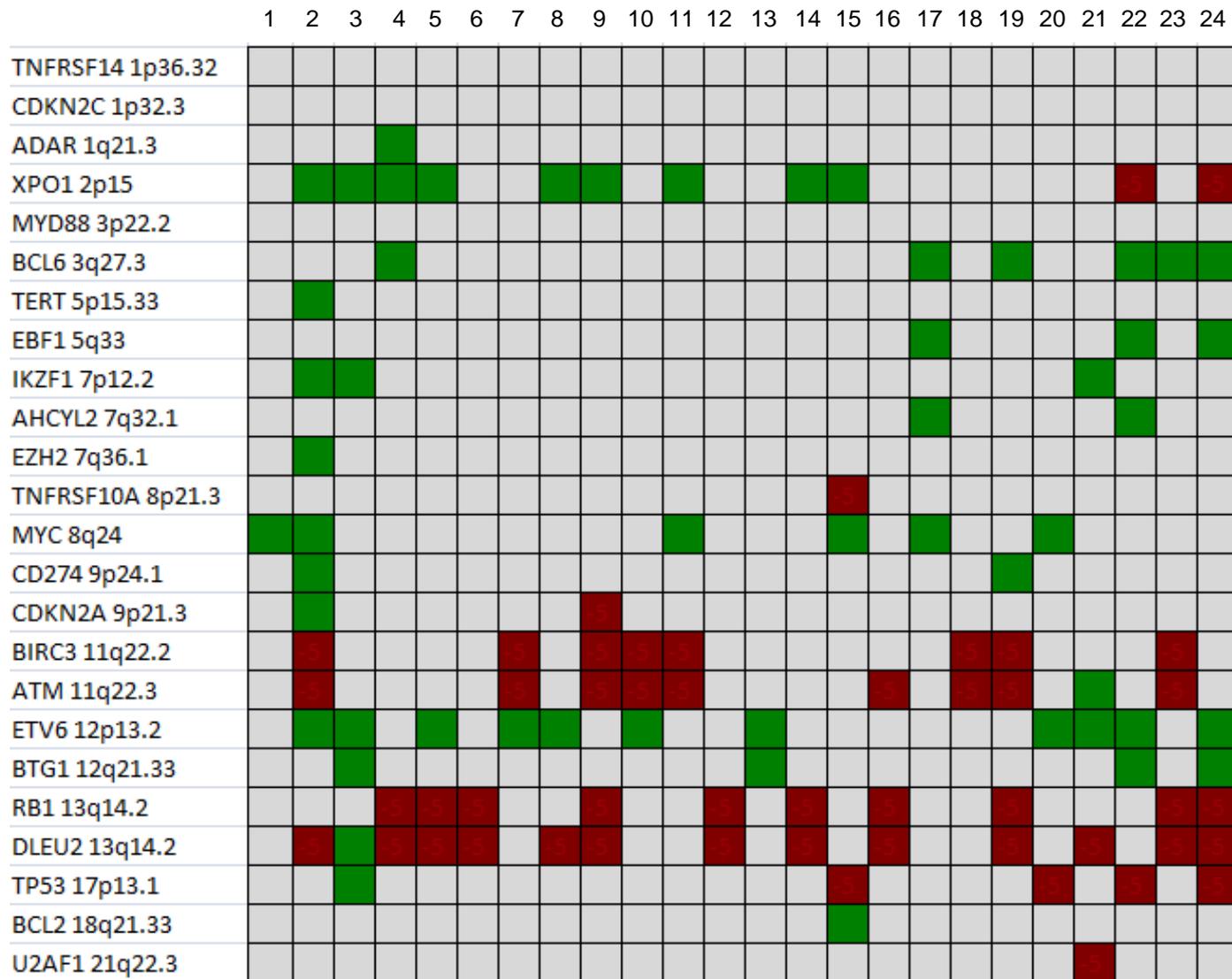
- Test statistique de Stouffer
  - Utilisation des données collectées par analyse des échantillons de myélomes, et comparaison aux données de CGH-array

→ Seuil de Stouffer à 5

ROC curve according to Stouffer threshold



# TEST DE STOUFFER



# ANALYSE DES COHORTES DE MYÉLOMES MULTIPLES

- En cours
- Problème technique : faible quantité de matériel disponible
- Seuil minimum d'analyse : moyenne de comptes bruts des sondes invariantes établi à 1000

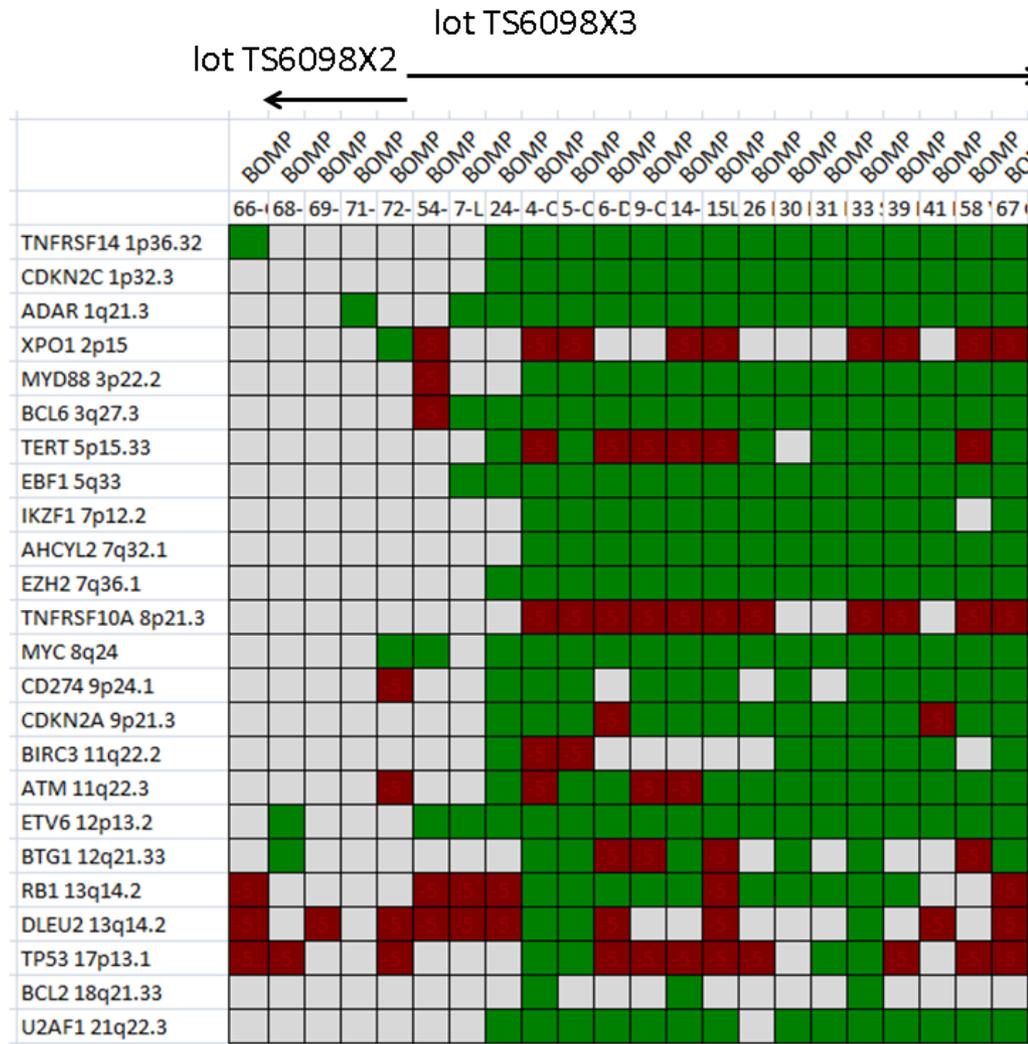
## ANALYSE DE LA COHORTE DE LLC (BOMP)

- 50/69 patients analysés



# ANALYSE DE LA COHORTE DE LLC (BOMP)

- Ecueil technique identifié





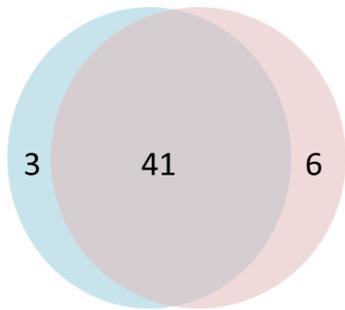
# ANALYSE DE LA COHORTE DE LLC (BOMP)

- Ecueil technique identifié :
  - Nécessité d'utiliser le même lot de « Tagset » pour patients et témoins
  - Donc nécessité de repasser les témoins à chaque nouveau lot de « Tagset »



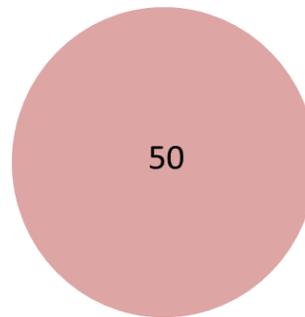
# ANALYSE PARTIELLE DE LA COHORTE DE LLC (BOMP)

*XPO1*



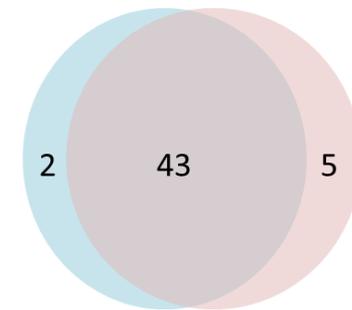
14 patients avec gain *XPO1* en FISH, dont 11 détectés par NS

*TNFRSF10A*



3 patients avec perte *TNFRSF10A* en FISH, tous détectés par NS

*MYC*

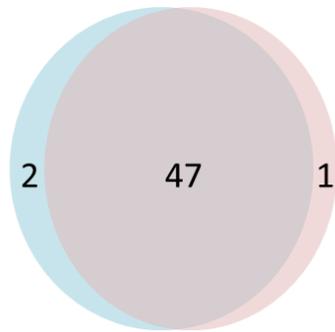


9 patients avec gain *MYC* en FISH, dont 7 détectés par NS

- Concordant FISH/NS
- FISH + (NS -)  
clone < 20%
- FISH + (NS -)  
clone > 20%
- NS + (FISH -)

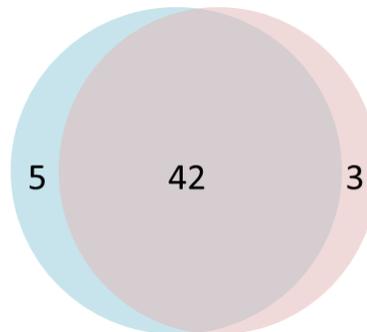
# ANALYSE PARTIELLE DE LA COHORTE DE LLC (BOMP)

*BIRC3*



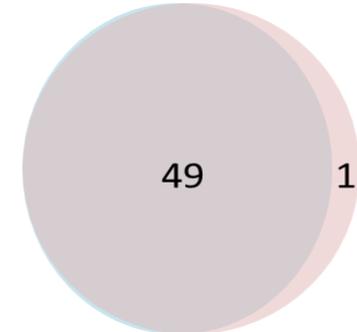
14 patients avec perte de *BIRC3* en FISH, dont 12 détectés par NS

*ATM*



21 patients avec perte d'*ATM* en FISH, dont 16 détectés par NS

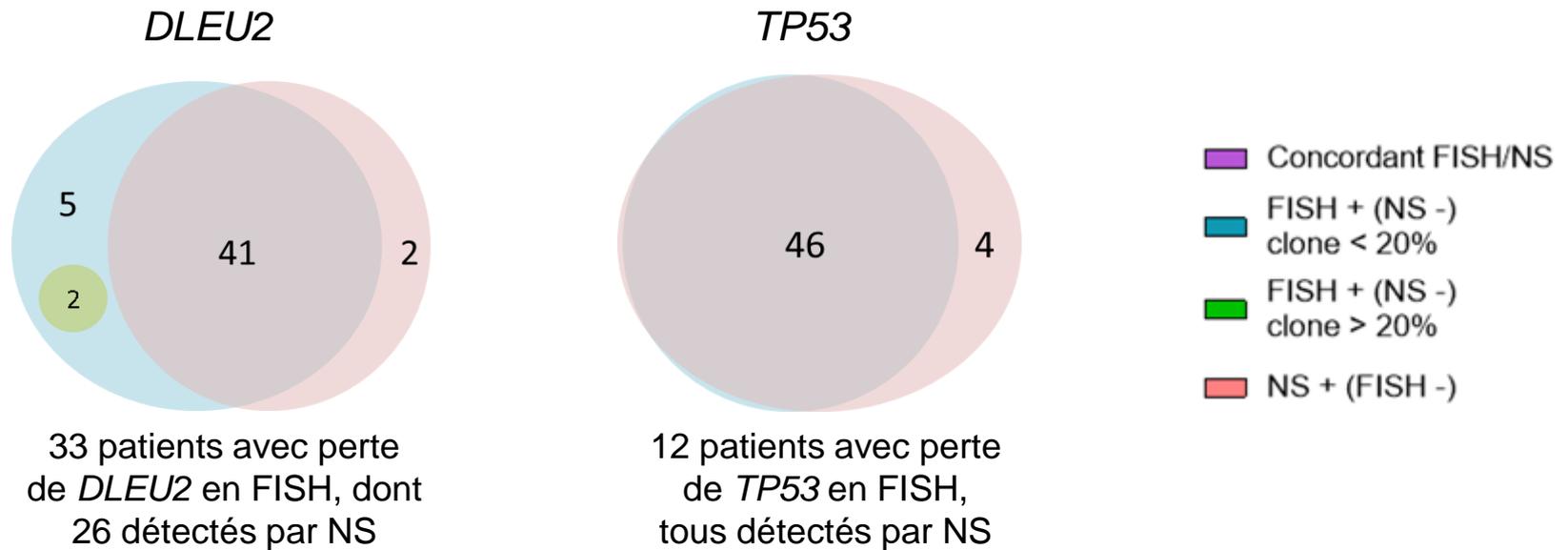
*ETV6/BTG1*



6 patients avec trisomie 12, tous détectés par NS

- Concordant FISH/NS
- FISH + (NS -)  
clone < 20%
- FISH + (NS -)  
clone > 20%
- NS + (FISH -)

# ANALYSE PARTIELLE DE LA COHORTE DE LLC (BOMP)



# CONCLUSION

	<b>FISH</b>	<b>CGH-array</b>	<b>Nanostring</b>
Niveau d'analyse	Ciblé	Whole genome	Design à façon
Seuil de détection	5%	> 10%	15-20%
Taille des anomalies détectables	≈ 150 kb	50 kb	Faible taille
Analyse en cellule unique	Oui	Non	Non
Matériel nécessaire	Cellules en culture ou plasmocytes triés	ADN (400 ng)	ADN (jusqu'à 150 ng)
Temps technique	Faible	Important	Faible
Temps analyse	Important Opérateur-dépendant	Important	Faible
Délai avant analyse	Culture (ou tri cellulaire) + 48h	Extraction + 96h	Extraction + 48h
Coût	++	+++	+ Après amortissement de l'automate

