



NGS et Hémopathie Myéloïdes:
Retour d'expérience du laboratoire en 2019/2020
GFCH 03/06/2020

B. Quilichini

Choix du panel des gènes

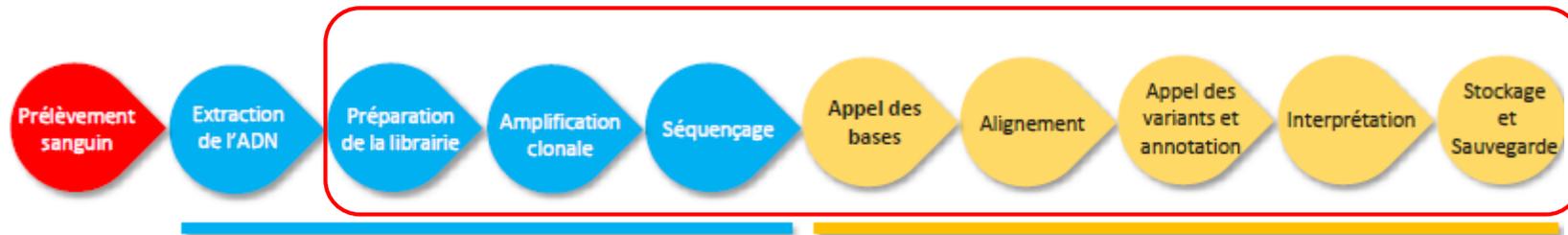
- **Choix des gènes** : Recommandations OMS 2017, ELN et données de la littérature
- **Choix d'une solution commerciale**  : un panel de 30 gènes Sophia Genetics (Myeloid Solution™ by SG)

ABL1 (4-9), ASXL1 (9,11,12,14), BRAF (15), CALR (9), CBL (8,9), CEBPA (all), CSF3R (all), DNMT3A (all), ETV6 (all), EZH2 (all), FLT3 (13-15,20), HRAS (2,3), IDH1 (4), IDH2 (4), JAK2 (all), KIT (2,8-11,13,17,18), KRAS (2,3), MPL (10), NPM1 (10,11), NRAS (2,3), PTPN11 (3,7-13), RUNX1 (all), SETBP1 (4), SF3B1 (10-16), SRSF2 (1), TET2 (all), TP53 (2-11), U2AF1 (2,6), WT1 (6-10), ZRSR2 (all)

Création de sous panels par hémopathie

Diagnostic de Néoplasie Myéloproliférative (NMP)	MYSD1	JAK2, CALR, MPL
	MYSD2	JAK2, CALR, MPL, CSF3R, SETBP1, SRSF2
Pronostic de Néoplasie Myéloproliférative (NMP)	MYSPRO	23 gènes analysés
Leucémie Myélomonocytaire Chronique (LMMC)	MYSMO	19 gènes analysés
Syndromes Myélodysplasiques (SMD):	MYSMD	29 gènes analysés
Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM)	MYSLAM	29 gènes analysés

Processus technique



« Wet Lab »

Capture avec librairie Kapa et séquençage Illumina sur miSeq

« Dry Lab »

SG-DDM™: analyse secondaire/annotation des variants
Analyse et interprétation des variants: Scientifique/Biologiste

Dossier de validation en portée A

Validation Wet Lab

- 2 run : 2x12 échantillons (ADN extrait de sg et moelle, ADN de référence Horizon, EEQ (GBMHM et CAP), ADN de patients
- Maitrise de risque
- Critères de performance analytique (sensibilité, spécificité, répétabilité, fidélité intermédiaire, uniformité de couverture)

Validation du Dry Lab → cf poster 20359

- Détection SNP, indel et dup avec une sensibilité 2%, >98% uniformité de couverture à >1000X (CEBPA exon1 😞)
- CNV: en cours de validation - résultats satisfaisants 😊

Assises de Génétique (01/2020) - Poster n°20359



Mise en place d'un panel de gènes ciblés pour les hémopathies malignes (NMP-LMMC-SMD-LAM) par NGS : Enjeux Médical / Scientifique et d'Assurance Qualité.

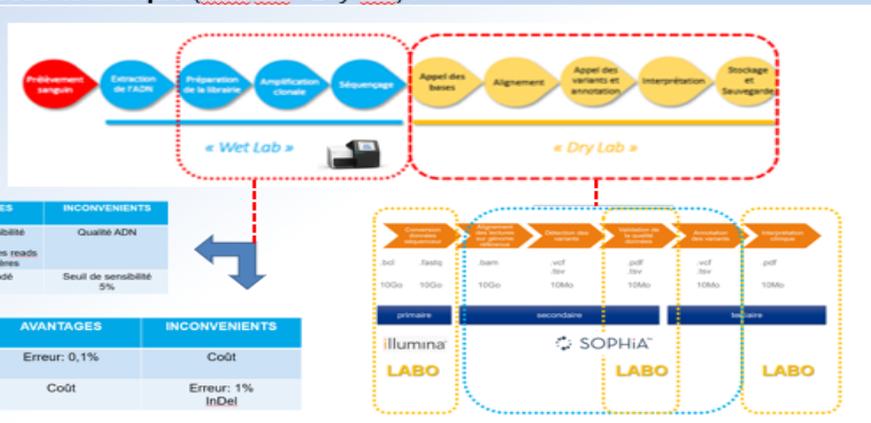
V. Geromel, E. Fayolle, P. Mouty, R. Moulin, N. Batail, M.H. Felix, B. Adde, S. Mouty, L. Raymond, B. Quilichini
Service de Génétique, Eurofins-Biomnis, Lyon

Introduction

La prise en charge biologique des hémopathies malignes, selon l'OMS 2017, nécessite une étroite collaboration entre les disciplines d'hématologie cellulaire, de cytogénétique et de biologie moléculaire. L'analyse de régions d'intérêt au sein d'ADN génomiques par Séquençage Parallèle Massif (ou Séquençage de Nouvelle Génération - NGS) offre la possibilité d'une exhaustivité d'analyse de gènes impliqués dans la prise en charge diagnostique, pronostique et thérapeutique des hémopathies malignes.

Enjeu médical / scientifique

- 1- **Choix des gènes du panel** selon les recommandations OMS 2017, ELN et Littérature :
→ NMP / Diag1 – NMP / Diag2- NMP / Pro - LMMC – SMD – LAM
Fiches disponibles sur : www.eurofins-biomnis.com
- 2- **Choix du process technique (Wet lab / Dry lab) :**



- 3- **Compte-Rendu** de l'analyse selon les recommandations
→ Ref NM / Exon / Variation nucléotidique / Altération protéique / VAF / Profondeur
→ Méthode d'analyse / Seuil de détection / Profondeur minimale acceptée / Version des logiciels et génome
- 4- **Facturation** RIHN

Conclusion et Perspectives

Des panels de gènes spécifiques pour chaque hémopathie ont ainsi pu être proposés par technique de capture kit Kapa Roche® sur une plateforme Illumina® Miseq avec une solution bioinformatique SOPHIA DDM®.

PERSPECTIVES

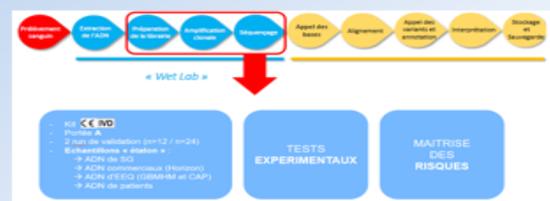
Projet

Mise en place de **6 panels ciblés** de gènes pour les hémopathies myéloïdes (NMP, SMD, LMMC et LAM) avec une solution commerciale CE-IVD (MYELOID SOLUTION™ by SOPHIA GENETICS).

- Enjeu médical et scientifique
- Enjeu d'Assurance Qualité (pour une accréditation COFRAC NF ISO 15189)

Enjeu d'Assurance Qualité : technique de pailleasse et bioinformatique

- 1- **Choix des critères de performance analytique** pour le dossier de validation de méthode
- 2- **Analyse et maîtrise des risques**



Critères de performance analytique :

Performance Analytique	Test expérimental	Echantillons des tests	Conformes
Comparaison de méthodes	X	Patients (n = 15 (technique RT-PCR/Sanger/HRM)) + 3 ADN commerciaux (Genome Helix)	OK
Étendue de mesure et limite de détection	X	→ Analyse VAF (2%) et Profondeur (1000x) Dilution de C24 Helix (n=2 (1% - 2%) JAK2 c.1845G>T) + Patients (n = 6 avec 1% < VAF JAK2 c.1845G>T + 4%) + ADN commerciaux (n=2)	OK sauf CEIPA. Limite de détection : 2% Profondeur : 1000x
Répetabilité	X	Patients (n = 2) + 2 EEQ	OK 100% (98,66% Souteneur)
Fidélité intermédiaire	X	Patients (n = 6)	OK 100% (99,3% Souteneur)
Sensibilité et spécificité	X	n=57	OK 100% (sensibilité 99,60% - spécificité 99,99% Souteneur)
Exactitude	X	EEQ GBMHM (n=3) + cas éducatif CAP (n=3)	OK
Robustesse et Stabilité des réactifs	X	Suivi CQI / lot de réactifs	OK
Validation transferts informatiques	X	OK	OK

Validation du process « Dry Lab »:



Maîtrise des risques :

1. PRE-ANALYTIQUE
2. ANALYTIQUE
3. POST-ANALYTIQUE

• Echelle de criticité: Ex: InDel



CQI :
un intérêt en routine ?
D'autres critères de qualité plus pertinents peuvent être exploités

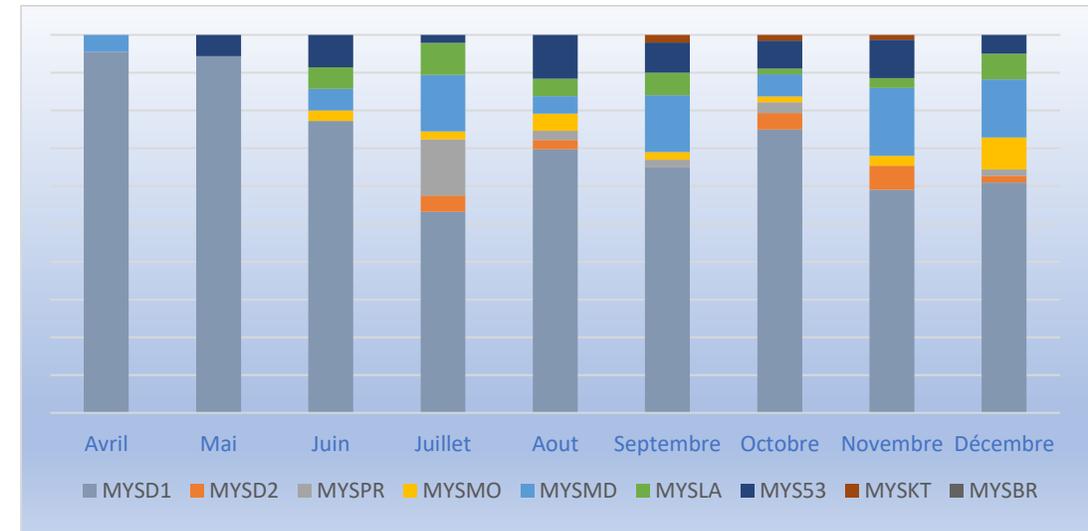
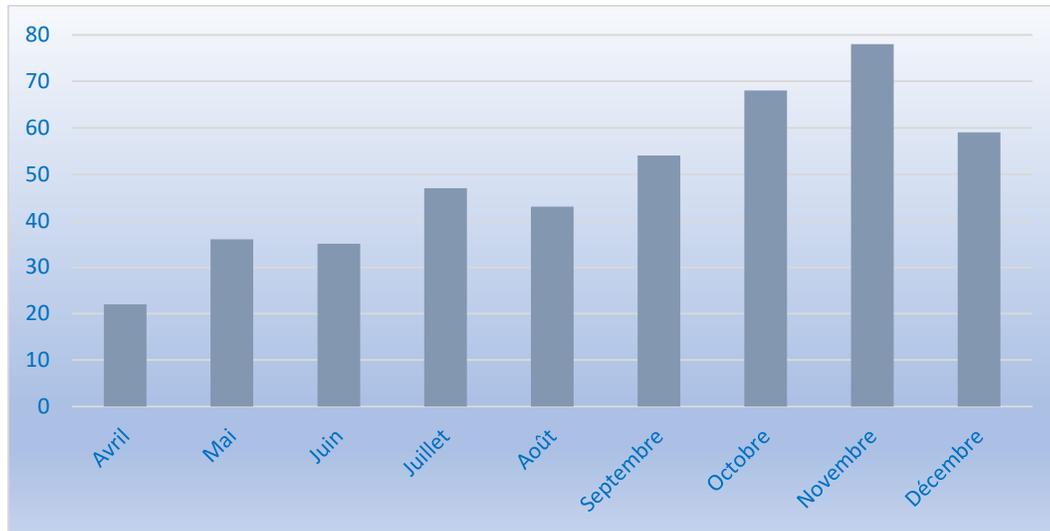
Profondeur d'analyse :
un critère à réévaluer pour garder un seuil de sensibilité au moins égal à 1% et optimiser le temps de séquençage

Automatisation
de la préparation des librairies pour optimiser la traçabilité et diminuer le risque d'erreur

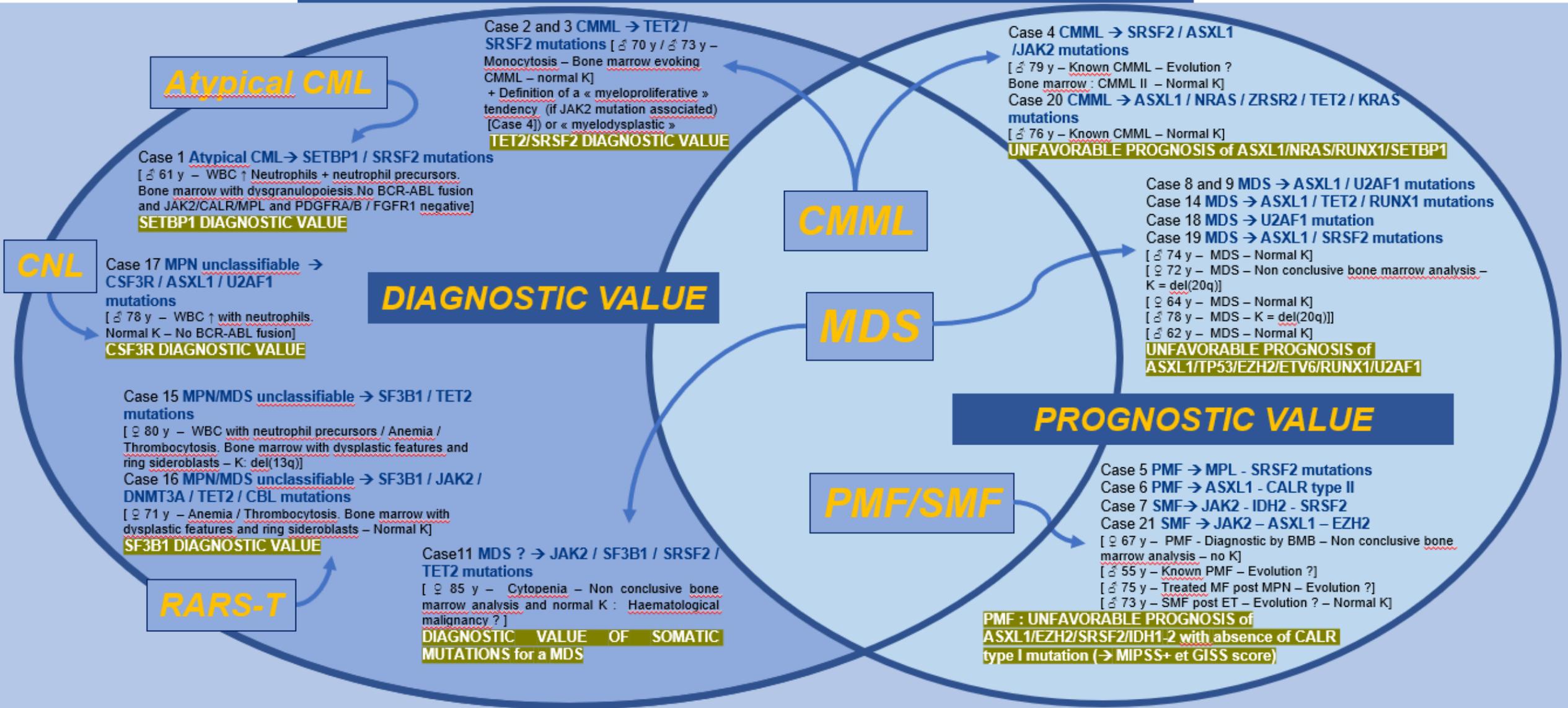
La vraie vie.....

- Démarrage en Avril 2019
- Depuis plus de 600 échantillons analysés
- Délai de réponse environ 10 à 15 jours

- Répartition des demandes



Results – Case report analysis



Results – Case report analysis

THERANOSTIC VALUE

Case 10 [♂ 54 y]
AML post PV → JAK2 / DNMT3A / IDH2 mutations

Case 22 [♂ 81 y]
AML post ET → JAK2 / IDH1 / DNMT3A / RUNX1 / ETV6 mutations

Case 23 [♂ 81 y]
AML post MDS → NPM1 / FLT3 / IDH1 / NRAS / DNMT3A / WT1 mutations

THERAPEUTIC TARGET: FLT3 - IDH1/2

JAK2/CALR and JAK2/MPL concomitant mutations

YEAR 2019: 8 CASES OF "DOUBLE HIT" PATIENTS

UNCLEAR DATA AND NO PRECISE LITERATURE FOR DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUES

PROBABLY UNDERESTIMATED DUE TO THE SEQUENTIAL GENOTYPING APPROACH OF JAK2 / CALR / MPL MUTATIONS IN PATIENTS WITH SUSPECTED MPN

CHIP

CLINICAL SIGNIFICANCE OF « CHIP » ? (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential)

Cytopenia → DNMT3A mutation: prognostic value ?

Case 13 [♀ 80 y] / Case 24 [♀ 57 y] / Case 25 [♂ 75 y]

Cytopenia – Bone marrow evaluation (cytology and cytogenetics) was not diagnostic

UNCLEAR DATA IN THE LITERATURE

DNMT3A = VERY HIGH FREQUENCY (50%)

THE HEMATOLOGICAL DIAGNOSTIC PROCESS MUST

BE COMPLETED (EXCLUDING MGUS AND MBL)

EVOLUTION TOWARDS A MALIGNANT HEMOPATHY

0.5 TO 1% / YEAR: CLINICAL PURPOSE ?

Karyotype and NGS Synergy

YEAR 2019: 8 CASES

THE CNV INFORMATION PROVIDED BY NGS IS USEFUL FOR THE CHARACTERIZATION OF HAEMATOLOGICAL MALIGNANCIES AND COMPLEMENTS THE CYTOGENETICS RESULT (DELETION, UNBALANCED TRANSLOCATION...)

Perspectives en Assurance Qualité et en Clinique

Constat	Enjeux	
CQI → un intérêt dans chaque run ?	Coût ? Autres critères qualité plus pertinents ? → Norme NF ISO 15189 / SH-GTA 16 	
	<p>5.6 Garantie de qualité des résultats</p> <p>La structure doit établir une stratégie de passage des contrôles de qualité interne et externe permettant d'assurer le suivi et le maintien des performances de la méthode en considérant l'ensemble du processus analytique.</p> <p>La stratégie des CIQ doit être déterminée par la structure avec la définition de métriques suivis pour un run et/ou l'utilisation d'un CIQ fournisseur.</p> <p>Dans le cas des analyses en génétique somatique, l'utilisation d'un CIQ représentatif des fréquences alléliques adapté aux limites de détection fixées est recommandée.</p>	

Perspectives en Assurance Qualité et en Clinique

Constat	Enjeux
CQI → un intérêt dans chaque run ?	Coût ? Autres critères qualité plus pertinents ? → Norme NF ISO 15189 / SH-GTA 16 
Profondeur d'analyse → un critère à réévaluer ?	Conserver un seuil de détection ~ 1 à 2% Optimisation du temps de séquençage 

Perspectives en Assurance Qualité et en Clinique

Constat	Enjeux
CQI → un intérêt dans chaque run ?	Coût ? Autres critères qualité plus pertinents ? → Norme NF ISO 15189 / SH-GTA 16 
Profondeur d'analyse → un critère à réévaluer ?	Conserver un seuil de détection ~ 1 à 2% Optimisation du temps de séquençage 
Automatisation	Traçabilité ↓ risque d'erreur → sécurisation du process Reproductibilité → Homogénéisation des pools de librairies Gain de temps technique → analyse bioinformatique Coût ? 

Perspectives en Assurance Qualité et en Clinique

Constat	Enjeux
CQI → un intérêt dans chaque run ?	Coût ? Autres critères qualité plus pertinents ? → Norme NF ISO 15189 / SH-GTA 16 
Profondeur d'analyse → un critère à réévaluer ?	Conserver un seuil de détection ~ 1 à 2% Optimisation du temps de séquençage 
Automatisation	Traçabilité ↓ risque d'erreur → sécurisation du process Reproductibilité → Homogénéisation des pools de bibliothèques Gain de temps technique → analyse bioinformatique Coût ?
Patients double mutés / VUS / CHIP ... Tout ce que le NGS nous révèle → quelles significations ?	Valeur ajoutée pour la prise en charge des patients ? Nouvelles classifications moléculaires OMS JAK2 / CALR / MPL / CSF3R / SF3B1 → ? Corrélation Cytogénétique / NGS (CNV) 