

GROUPE BIONANO

GFCH

L'intérêt du groupe repose sur les échanges d'expérience sur 2 grands axes :

le versant technique et le versant interprétation/validation biologique

Une première réunion du groupe a eu lieu en visio le 06 décembre 2022

Etat des lieux

12 laboratoires du GFCH ont communiqué sur leur situation :

- 4 ont un Bionano en achat
- 6 ont une Mise à disposition (MAD)

Centre	Prestation
Louvain	Achat machine, seul laboratoire à rendre des résultats en routine pour LAL et LAM
Dijon	Vision d'achat de machine (en recherche), mise en place technique cytogénétique hémato
Brest	Achat de la machine (en recherche), début analyse hémato 6 mois, LAL péd et hémopathies lymphoïdes agressives
Amiens	Achat du matériel pour 2023, projet PHRC SMP
Necker	MAD depuis novembre 2020
St Antoine	MAD depuis 11 mois, 1 an 240 génomes
Lille	MAD depuis 1 an, renouvellement 6 mois : passage en routine des LAL, pas encore rendues officiellement
Grenoble	MAD 6 mois 120 génomes, début 2023
Bordeaux	MAD 6 mois 120 génomes, début 2023
Reims	MAD prévue en 2023, 1 an 240 génomes
Marseille	MAD prévue au printemps 2023
Clermont Ferrand	Plateforme

1- Versant technique (onglet 1)

BUT : partage d'expériences et communications des trucs et astuces

Tous les utilisateurs n'ont pas une pratique préanalytique commune en terme de type d'échantillon, de milieu de recueil, congélation ...

Des adaptations de protocoles sont parfois nécessaires.

Au cours de la technique, il a été rencontré des problèmes chez certains centres (problème de marquage, défaut d'humidification des membranes et...) dont il conviendrait de partager les causes et solutions mises en place.

Mise en place d'un tableau appelé « tableau partage groupe bionano GFCH » contenant des informations sur le protocole utilisé par chaque centre, les problèmes rencontrés et les solutions trouvées. Ce tableau, à partager entre tous les centres du groupe, a vocation à être implémenté au fur et à mesure de l'expérience de tous.

Site	Indications	Type d'échantillon primaire	Type de tube	Echantillon secondaire	Quantité de cellules extraite	Congélation préalable	Problèmes rencontrés	Solutions et astuces
Louvain	LAL, LMA, HES, LLC	sang/moelle	héparine/EDTA	plusieurs aliquotes de l'échantillon dans le -80°C	1,5M (validé jusqu'à 800 000)	dans 10% d'EDTA (0.5M)	1) la contamination par des composants provenant des échantillons eux-mêmes, problème de marquage associé 2) Problème de lot d'enzyme DLE-1 3) problèmes avec des membranes 4) problèmes liés aux mauvais lots de puces	1) l'insertion d'une étape de lavage supplémentaire, avant l'extraction 2) Remplacement de l'enzyme par bionano 3) Remplacement des membranes par bionano 4) Remplacement des puces par bionano
Dijon	LAL, LAM	moelle	héparine	aliquote de moelle (échantillon + STAB) conservé à -80°C	1,5 M		problème de viscosité +++, perte d'ADN après dépôt sur membranes	partir plutôt de cellules cultivées...?
Brest	LAL SMD LAM	moelle.	héparine lithium	Technique sur culots cellulaires (non DMSO) telle que protocole bionano, stockage à -80°C avec DNA stabilizer	1,5 M	Oui avec DNA stabilizer	1) problèmes avec des membranes; 2) problèmes liés aux mauvais lots de puces; 3) problèmes de runs bien que les Qc de marquage et extraction étaient très bons; 4) certains RVA bloqués avant la fin de l'analyse	1) remplacement des membranes par Bionano 2) remplacement des puces par Bionano 3) chargement sur une autre puce 4) Bionano a refait une analyse de leur côté ; mais je n'ai jamais réussi à télécharger les données pour un pb de taille de fichier.
Bordeaux	Démarrage récent							
Grenoble	Démarrage récent							
Paris-Saint Antoine	LAL, LAM	moelle/sang/cellules congelées	héparine/EDTA	un aliquote de l'échantillon à -80°C	1,5 M	Oui avec DNA stabilizer	1) Evaporation 2) Problème de lot d'enzyme DLE-1	1) Changement de plug 2) Remplacement de l'enzyme par bionano
Paris-Necker	LAL LAM SMD	sang/moelle	héparine/EDTA	DMSO/échantillons congelés à -80 avec DNA stabilizer	1,5 M	Oui avec DNA stabilizer	1) Evaporation 2) Problème de lot d'enzyme DLE-1 3) certains RVA bloqués sur la v1.7	1) Changement de plug (mais pb persistant) 2) Remplacement de l'enzyme par bionano 3) RVA lancés par bionano sur v1.6
Reims	2 LALB testées (envoi cellules à Clermont Ferrand)	cellules congelées en DMSO	DMSO	congélation -20°C en RPMI + SVF 10% puis conservation à -80°C avant envoi des cellules	1M	aucun (pas de problème d'extraction signalé par Clermont Ferrand)	1) décongélation rapide selon le protocole prénatal rémois pour des cellules en DMSO 2) culture une nuit puis le lendemain, numération et congélation en RPMI-SVF à -20°C	pour les 2 ech testés = corrélation 100% caryo/FISH-COG
Clermont Ferrand	LAL LAM	sang/moelle	héparine/EDTA	aliquots ou culots secs (après rinçage en tampon+DNA stab) conservés à -80°C	1,5M	Oui avec DNA stabilizer	1/ un ADN 'perdu' pendant l'extraction 2/ un run avec mauvais QC qui a du être relancé > ok	échantillons envoyés et traités à Gentyane
Lille	LAL, T-PLL, LMC, HES, MM	sang/moelle	héparine/EDTA	pour les moelles, dilution dans QSP 5ml de milieu de culture	1,5M sauf MM à 1M	dans 10% d'EDTA	1) Extraction initiale de 3M de cellules, problème de marquage associé 2) Problème de lot d'enzyme DLE-1	1) extraction de 1,5M, extraire trop de cellules réduit l'accessibilité de l'enzyme DLE-1 à l'ADN 2) Remplacement de l'enzyme par bionano

2/Versant interprétation/validation technique

L'objectif de cette partie est de permettre une bonne interprétation des anomalies retrouvées et une harmonisation des pratiques en vue du rendu de résultat aux cliniciens.

Il convient dans un 1^{er} temps de définir les modalités de lancement d'analyse et les paramètres d'analyse utilisés par chacun. Pour ce faire dans le « tableau partage groupe bionano GFCH », un onglet spécifique a été ajouté.

2- interprétation biologique (onglet 2)

Site	Indications	version access	génom de référence	pipeline utilisé	paramètres de lancement pipeline	Filtres utilisés	Création de BED
Louvain	LAL, LMA, HES, LLC	1.7.1.1	hg38	RVA sauf LAL (RVA+ de novo)	default	"all" pour les SV et CNV 1 Self molecules count 2% dans la population contrôle	
Dijon	LAM, LAL	1.7.1	hg19	RVA + de novo	default	all	
Brest	LAL SMD LAM	1.7	hg38	RVA + de novo	pas encore choisi définitivement	pas encore choisi définitivement	
Bordeaux	Démarrage, LAM						
Grenoble	Lymphomes, LLC	1,7	hg38	RVA	pas encore choisi définitivement	pas encore choisi définitivement	pas encore en place mais souhaité
Paris-Saint Antoine	LAL, LAM	1.7	hg19	RVA sauf LAL (de novo au cas par cas)	default	Recommended pour les SV, CNV and aneuploidie 5 Self molecules count 1% dans la population contrôle	oui, on pourrait avoir un BED file commun par pathologie?
Paris-Necker							
Reims	LAL et myélome + HES	publication appel d'offre en février si tout va bien					
Lille	LAL, T-PLL, MM, LMC, HES	1.7	hg38	RVA sauf LAL et MM (RVA+ de novo)	no cnv mask	Recommended pour les SV et CNV 1 Self molecules count 0% dans la population contrôle Recommended pour les SV, CNV 5 Self molecules count 0% dans la population contrôle	oui BED pour LAL, BED pour MM
Clermont Ferrand	LAL LAM	1,7	hg	RVA	default		

Prochaine réunion : début mars (doodle en cours)

1-s'organiser par pathologie (?) pour session de validation commune sur dossier partagé :

- utilisation de fichiers BEDs communs
- Quel pipeline dans quelle pathologie (DeNovo vs RVP, les 2?)
- Filtres utilisés

2-Mettre en place un EEQ : un dossier envoyé à tous à valider.

- Avec l'aide de Dana Jaber (Bionano)

3-Pour les labs qui veulent rendre un résultat (notamment pour les diagnostic de LAL, cf voir LOUVAIN), organiser un **CQinterLabo**.

- En partant d'un échantillon.

5-S'organiser en Consortium Francophone (validé par le bureau du GFCH) , en intégrant d'autres labos :
notamment les laboratoires du CHU de Liège et des Hôpitaux universitaires de Genève qui nous ont contacté.

- Dr. Celine Lete et Dr. Catherine Menten qui travaillent au CHU Liège
- Dr. Danielle Martinet, Responsable du laboratoire de cytogénétique hématologique et Dr. Stefania Gimelli, responsable des tests de diagnostic aux Hôpitaux universitaires de Genève.

Questions : comment appeler ce consortium?
les labos en faisant partie doivent-ils faire partie du GFCH?

Ex : GF COG Groupe francophone de cartographie optique du génome
Appel à idée..

6-Contacter d'autres Consortiums, notamment pour la mise en place d'EEQ (voir l'expérience des Espagnols qui souhaitent organiser un contrôle européen).

Le consortium espagnol se nomme « Spanish OGM-Heme » dirigé par Blanca Espinet

- Collection des données techniques et critères d'analyse de chaque centre
- Réunion nationale sponsorisée (type congrès) : 50aine de personnes cette année
- Organisation d'un EEQ : dossier, fichier bnx transmis

La question qui fâche : comment coter?

Question de Nathalie Nadal : « Pour nous une question de survie = la cotation. On pense mettre comme la CGH. Le CHU veut nous enlever 1 ETP,..... La seule façon de conserver le poste est de prouver l'importance du Bionano et donc la nécessité de nous laisser notre personnel. Il faut donc que l'on justifie l'intérêt pour le patient et que l'on puisse facturer. Sinon ils considèrent que c'est de la recherche et couic, on la perd. Donc l'urgence est de décider la nomenclature. Merci

- 1 CGH BHN 2037