# Pratique en routine de l'OGM dans le Myélome Multiple

BIONANO USER GROUP MEETING, Paris, 13/11/2024

C. Menten (PhD) et N. Catarin (MD)

# Le Myélome Multiple : analyse de routine en cytogénétique

1. Prise en charge des MM en cytogénétique

2. Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

3. Validation biologique avec le choix des évènements rapportés :
    a. critères
    b. intégration dans les classifications internationales du MM

4. Présentation de cas intéressants

# Prise en charge des MM en cytogénétique

- Pas de culture cellulaire -> pas de caryotype standard

$\Rightarrow$ Sélection des plasmocytes pour analyse en cytogénétique « moléculaire ».

- Remboursement INAMI au diagnostic du MM (selon l'article 33 bis) :

- 3 analyses FISH

- 1 analyse sur ADN extrait : CGHarray ou Optical Genome Mapping (OGM, Bionano)

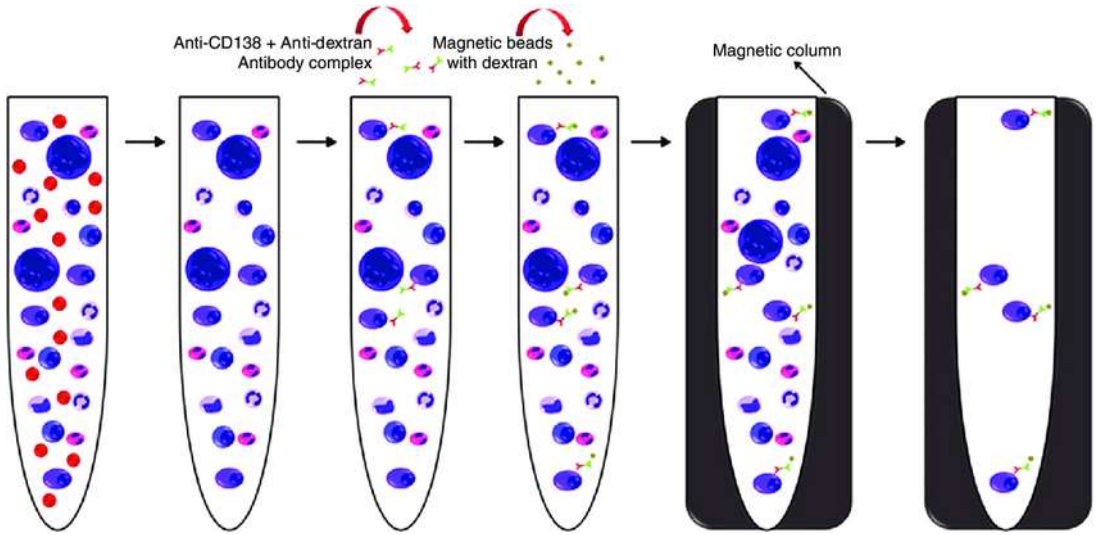
- Analyse 33bis donc 100% accréditation

!!!! Pas de remboursement pour la sélection mais juste pour les analyses.

# Prise en charge des MM en cytogénétique

- Sélection avec anticorps anti-CD138 couplés à des billes magnétiques (EasySep Human CD138 positive selection kit, StemCell)

- Sélection positive



# Prise en charge des MM en cytogénétique : flux avant mars 2024

- Analyses sur plasmocytes sélectionnés :

➔FISH sur cytospin des plasmocytes sélectionnés : 30 000 cellules/ cytospin

➔ CGHarray : ADN extrait à partir des cellules sélectionnées, minimum 200 000 cellules.

# Flux d'analyse en fonction du nombre de cellules récoltées (avant mars 2024) :

➔ Si <300 000 cellules récoltées :

- uniquement cytospins

⇒ 3 FISHs réalisées

➔ Si >300 000 cellules récoltées :

- Réalisation de 2 à 4 cytospins
- Congélation du reste des cellules (culot) pour extraction ADN (CGH et Biologie moléculaire)

⇒ CGHarray + 3 FISH réalisées

# Choix des analyses FISHs :

**3** FISHs remboursées : priorité à la détection des réarrangements IGH et délétion TP53

1. IGH::FGFR3

normal OU réarrangé

**2.** TP53

**3.** 1p/1q

➔ 3 signaux IGH

**2.** IGH::CCND1

➔Réarrangé

**3.** TP53

➔ 3 signaux IGH

**3.** IGH::WWOX
➔ normal OU réarrangé

**4.** TP53

⇒Intérêt de l’**OGM** dans la détection **des réarrangements IGH et** la détection d’**hyperdiploïdie.**

# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

➔ **OGM :** Nécessite minimum 1 million de cellules

⇒ Test sur moelle totale (protocole extraction classique sur moelle totale)

| % plasma cell | CNVs | | Recurrent SVs | |
|---|---|---|---|---|
| | array-CGH | OGM | FISH | OGM |
| 56 | CNVs | detected | IGH::MAF | IGH::MAF |
| 20 | not detected | not detected | not detected | not detected |
| 26 | hyperdiploidy | partially detected | not detected | not detected |
| 14 | not detected | not detected | IGH::CCND1 | not detected |
| 21 | not detected | not detected | not detected | not detected |
| 70 | hyperdiploidy | not detected | not detected | not detected |
| 14 | not detected | not detected | not detected | not detected |
| 22 | hyperdiploidy | not detected | not detected | not detected |
| 15 | CNVs | not detected | not detected | not detected |
| 92 | hyperdiploidy | not detected | not detected | not detected |
| 10 | CNVs | not detected | IGH::FGFR3 | IGH::FGFR3 |
| 29 | CNVs | detected | IGH::CCND1 | not detected |
| 30 | CNVs and hyperdiploidy | CNVs partially detected<br>Hyperdiploidy detected | not detected | not detected |

⇒ Non concluant

n = 13

9 CNVs / Hyperdiploidy

- 2 cases concord completely
- 2 cases concord partially

4 SVs

- 2 cases are concordant
- 2 cases are non concordant

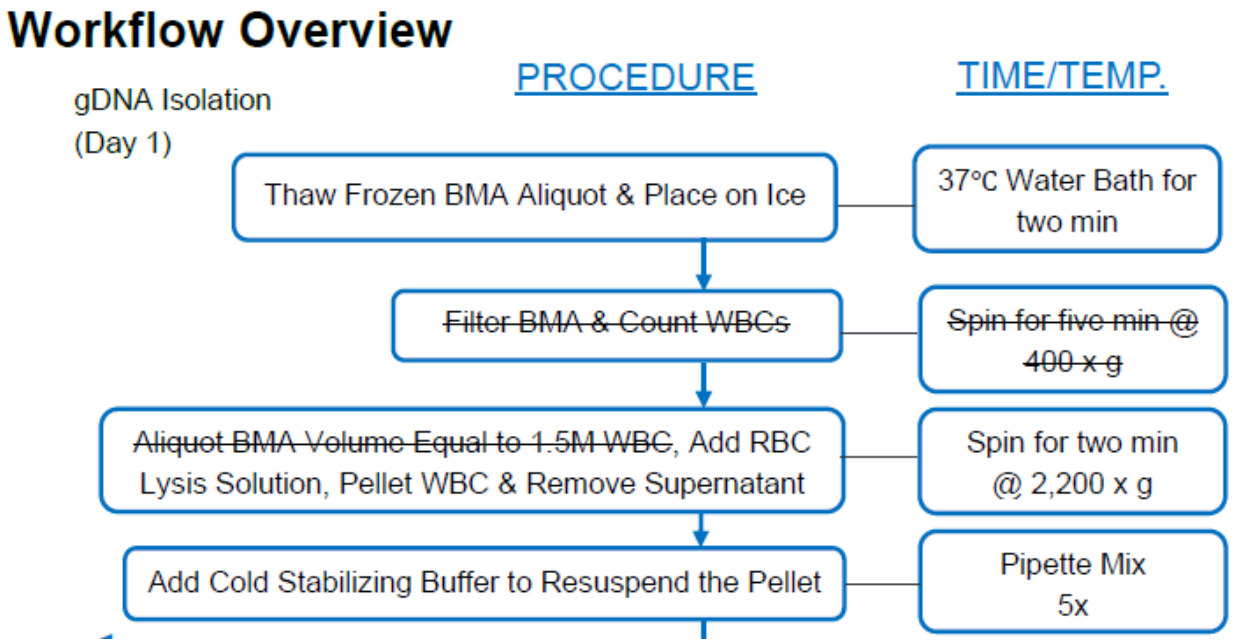
# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

➔ **OGM :** Nécessite minimum 1 million de cellules

⇒ Test sur cellules sélectionnées congelées en culot cellulaire:

- ajout de 7,5µl de DNA Stabilizer (bionano)
- centrifugation dans le cryotube étiqueté (3000g 5min),
- élimination du surnageant
- Congélation à -80°C

- Extraction via le protocole classique



# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

| | CNVs | | Recurrent SVs | | |
|---|---|---|---|---|---|
| cases | array-CGH | OGM | FISH | OGM | Recurrent SVs identified with OGM only |
| 1 | CNVS | detected | not detected | | t(14;16) |
| 2 | CNVS | detected | not detected | | |
| 3 | CNVS | partially detected | t(11;14) | detected | |
| 4 | CNVS | detected | t(11;14) | detected | |
| 5 | CNVS | detected | not detected | | |
| 6 | CNVS | detected | t(11;14) | detected | t(8;11;14) MYC |
| 7 | CNVS | detected | not detected | | t(12;14) IGH::CCND2 |
| 8 | CNVS | detected | t(11;14) | detected | |
| 9 | CNVS | detected | t(11;14) | detected | |
| 10 | CNVS | detected | not detected | | t(8;20;22) IGL::MYC |
| 11 | CNVS | detected | not detected | | |
| 12 | CNVS | detected | not detected | | |
| 13 | CNVS | detected | t(11;14) | not detected | |
| 14 | CNVS | detected | not detected | | |
| 15 | CNVS | detected | not detected | | |
| 16 | CNVS | detected | not detected | | t(2;8) IGK::MYC |
| 17 | CNVS | detected | not detected | | t(11;14) |
| 18 | CNVS | detected | not detected | | |
| 19 | CNVS | detected | t(4;14) | detected | |
| 20 | CNVS | detected | t(14;16) | detected | |
| 21 | CNVS | detected | t(14;16) | detected | |
| n = 21 | CNVs / Hyperdiploidy | 95% concordance | 9 SVs | 95% concordance | **6 additionnel recurrent SVs** |

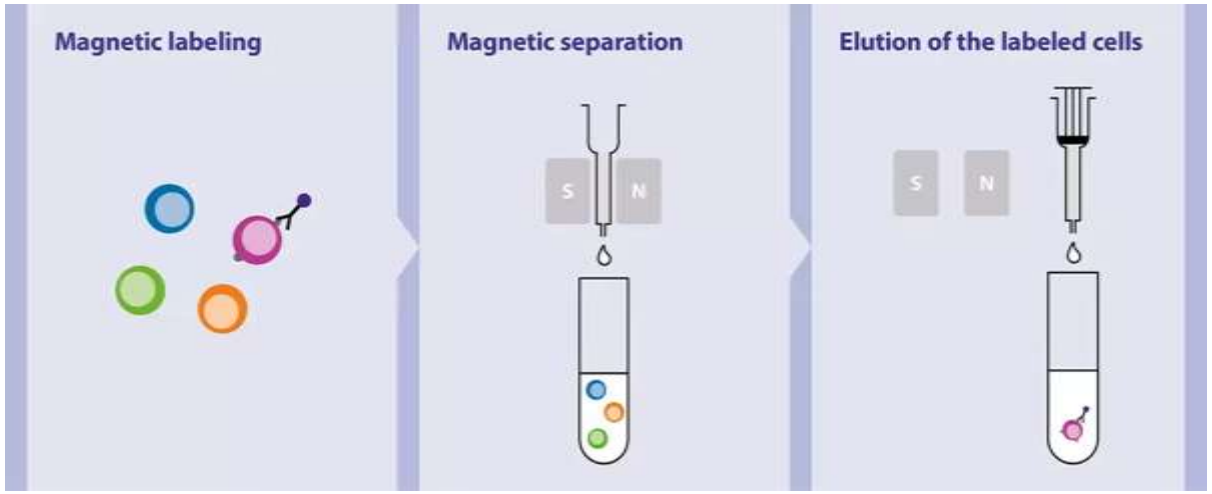
⇒**Résultat concluant MAIS…**

Nécessité d’obtenir 1 million de cellules post tri

# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

➔ OGM : Nécessite minimum 1 million de cellules

⇒ Ajout de cellules de la fraction négative pour obtenir 1 million de cellules pour OGM.



# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

| CNVs | | | |
|---|---|---|---|
| **array-CGH** | **40%** | **20%** | **<20%** |
| CNVs | | detected | |
| CNVs | | partially detected | |
| / | idem | idem | |
| CNVs | detected | not detected | |
| CNVs | | detected | detected (10%) |
| CNVs | | | detected (10%) |
| CNVs | detected | not detected | |
| CNVs | | detected | detected (10%) |
| CNVs | detected | detected | |
| CNVs | | partially detected | |
| CNVs | detected | | |
| CNVs | | detected | |
| CNVs | | detected | |
| CNVs | | partially detected | partially detected |
| CNVs | detected | detected | |
| CNVs | partially detected (30%) | partially detected | partially detected |
| CNVs | | partially detected | partially detected |
| CNVs | detected (30%) | | |
| CNVs | detected (30%) | | |
| CNVs | detected (30%) | detected | |
| CNVs | | detected | |
| CNVs | detected | | |

In fractions of 40% and over:

- 90 % concordance (10/11 cases)

In fractions of 20%:

- 58,8% (10/17) perfect concordance
- 29,4% (5/17) partially concordance
- Dans 11,8% (2/17), CNVs not detected by OGM

# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

| Recurrent SVs | | | |
|---|---|---|---|
| FISH | OGM 100% | OGM 20% | OGM 10% |
| no recurrents SVs | t(14;16) | t(14;16) | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | not tested |
| t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) | not tested |
| t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs |
| no recurrents SVs | t(12;14) | not tested | t(12;14) |
| t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) |
| t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) |
| no recurrents SVs | t(8;20;22)(100%) | t(8;20;22) | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs |
| t(11;14) | t(11;14) not detected | t(11;14) not detected | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | not tested |
| no recurrents SVs | t(2;8) (IGK::MYC) | t(2;8) (IGK::MYC) | t(2;8) (IGK::MYC) |
| no recurrents SVs | t(11;14) | t(11;14) | t(11;14) |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | not tested |
| no recurrents SVs | no recurrents SVs | no recurrents SVs | not tested |

- All recurrent SVs detected in the "100% fraction" were detected in the "20% fraction"
- SVs are also detected in the 10% fractions (for the 5 cases tested)

# Flux d'analyse en fonction du nombre de cellules récoltées (après mars 2024) :

➔ Si <300 000 cellules récoltées :

- Uniquement cytospins

⇒ 3 FISHs réalisées

➔ Si >300 000 cellules récoltées :

- Réalisation de 2 à 4 cytospins
- Congélation du reste des cellules (culot)
- Ajout de cellules de la fraction négative pour obtenir 1 million de cellules pour OGM avec minimum 20% d'infiltration
- ADN disponible pour OGM ET biologie moléculaire

⇒ OGM + 1 FISH réalisée (TP53 vs IGH::CCND1)

# Mise en place de l'OGM et intérêt dans le MM

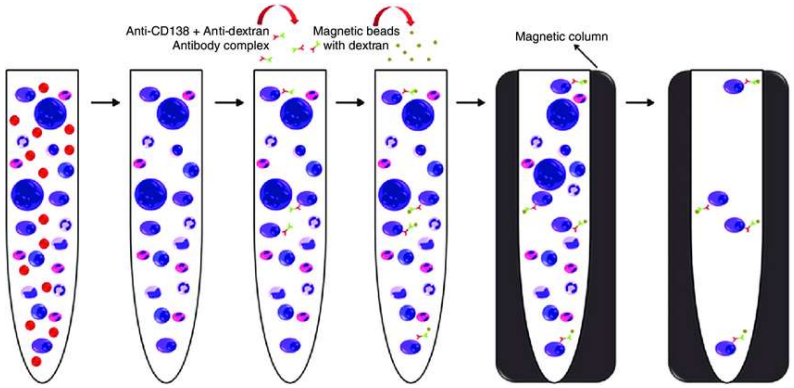
- Visualisation pangénomique des CNVs et surtout des SVs
- Gain de temps dans le délai de réponse des résultats
- Gain de temps technique

➔Limitation du nombre de cellules sélectionnées

# Comparaison sélection plasmocytes

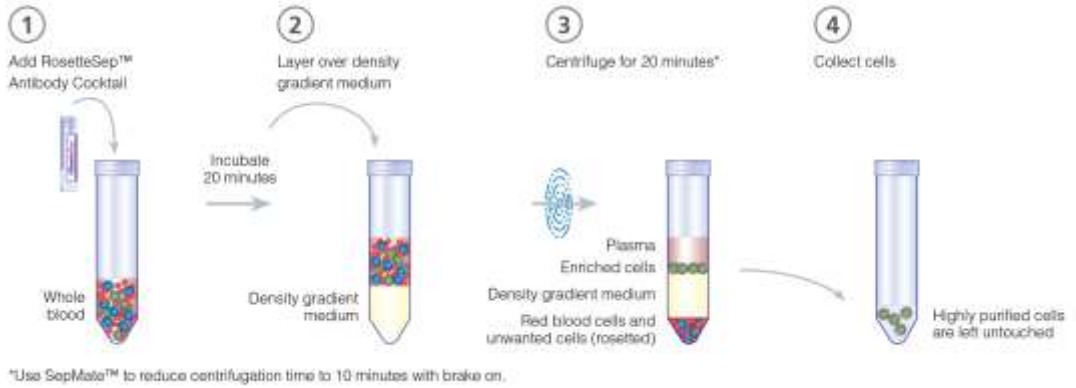
**Sélection positive CD138+**

- Sélection avec anticorps anti-CD138 couplés à des billes magnétiques (EasySep StemCell)
- Sélection positive




**Sélection négative**

- Sélection Roset Sep kit spécifique des plasmocytes (SepMate StemCell)
- Sélection négative



# Comparaison sélection plasmocytes

- 15 échantillons comparés

➔ 3 premiers avec problème de lavage du ficoll.

- 12 utilisés pour la comparaison

- Lien entre le pourcentage d'infiltration au typage et nombre de cellules récupérées après tri.

- Quantité de cellules récoltées supérieure avec sélection sep mate qu'avec sélection easy sep.

- Pureté meilleure avec sélection easy sep que sélection sep mate.

| Echantillons comparés | OGM SepMate | OGM Easy Sep | Comparaison OGM |
|---|---|---|---|
| 12 | 8 | 6 | identique (sauf 1 point de cassure) |

# Validation biologique : évènements rapportés

1. **Anomalies primaires :**

- Hyperdiploïdie : oui-non
- Réarrangement du gène IGH : oui-non

2. **Anomalies secondaires :**

- Extra-copie(s) 1q (totale ou partielle) : oui-non
- Délétion 1p (totale ou partielle) : oui-non
- Délétion TP53 : oui-non

**3. Autres anomalies :**

- Variations de structure :
  - t( ;)( ;) correspondant au réarrangement…
- Variations du nombre de copies (>5Mb) :
  - pertes :
  - pertes partielles :
  - gains :
  - gains partiels :

Clarke S. et al, Blood Reviews, 2024

# Validation biologique : évènements rapportés

**4. Résumé :**

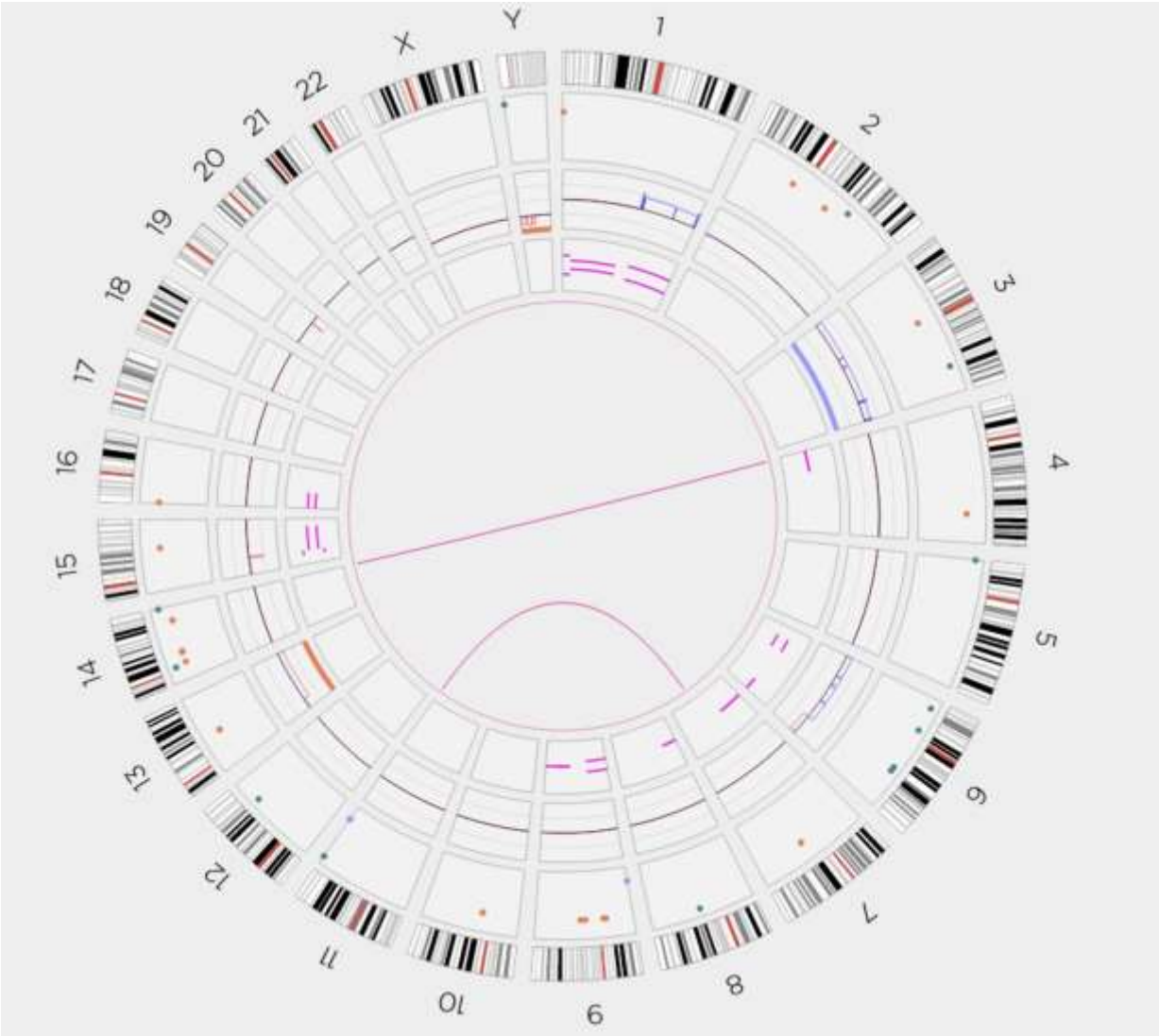
- Facteurs cytogénétiques de pronostic standard présents : ……
- Facteurs cytogénétiques de mauvais pronostic présents : ……
- Facteurs cytogénétiques de pronostic indéterminé présents : ……

| | Nbr total | Réarrangement IGH | | |
|---|---|---|---|---|
| | | IGH::FGFR3 | IGH::CCND1 | IGH::WWOX |
| **CGH 2023** | 74 | 4 | 16 | 2 |
| | **100%** | 5,4 | 21,6 | 2,7 |
| **OGM 03->10/2024** | 47 | 1 | 13 | 4 |
| | **100%** | 2,1 | 27,7 | 8,5 |

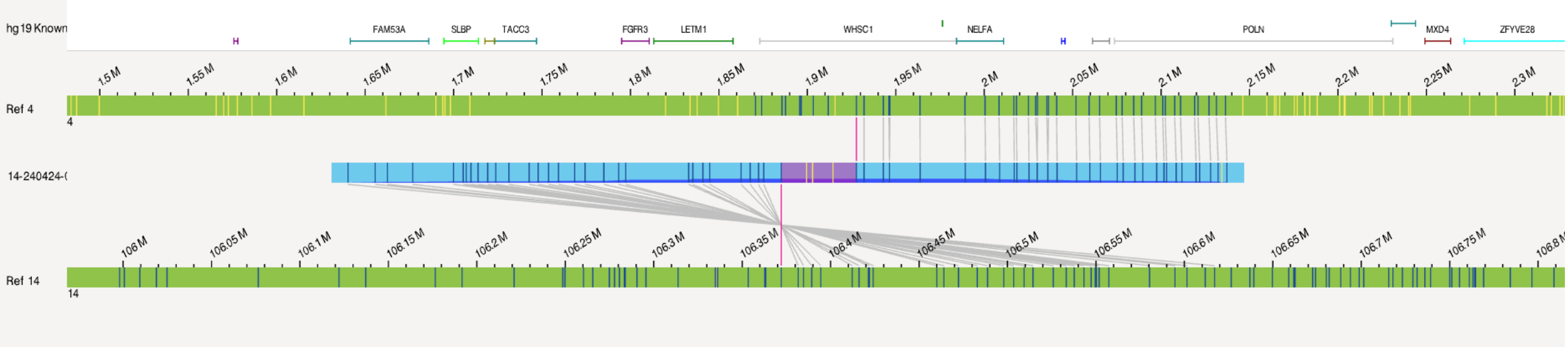
Clarke S. et al, Blood Reviews, 2024

# Cas n°1

- Homme 75 ans
- 9% plasmocytes médullaires
- Culot 40% pour extraction ADN

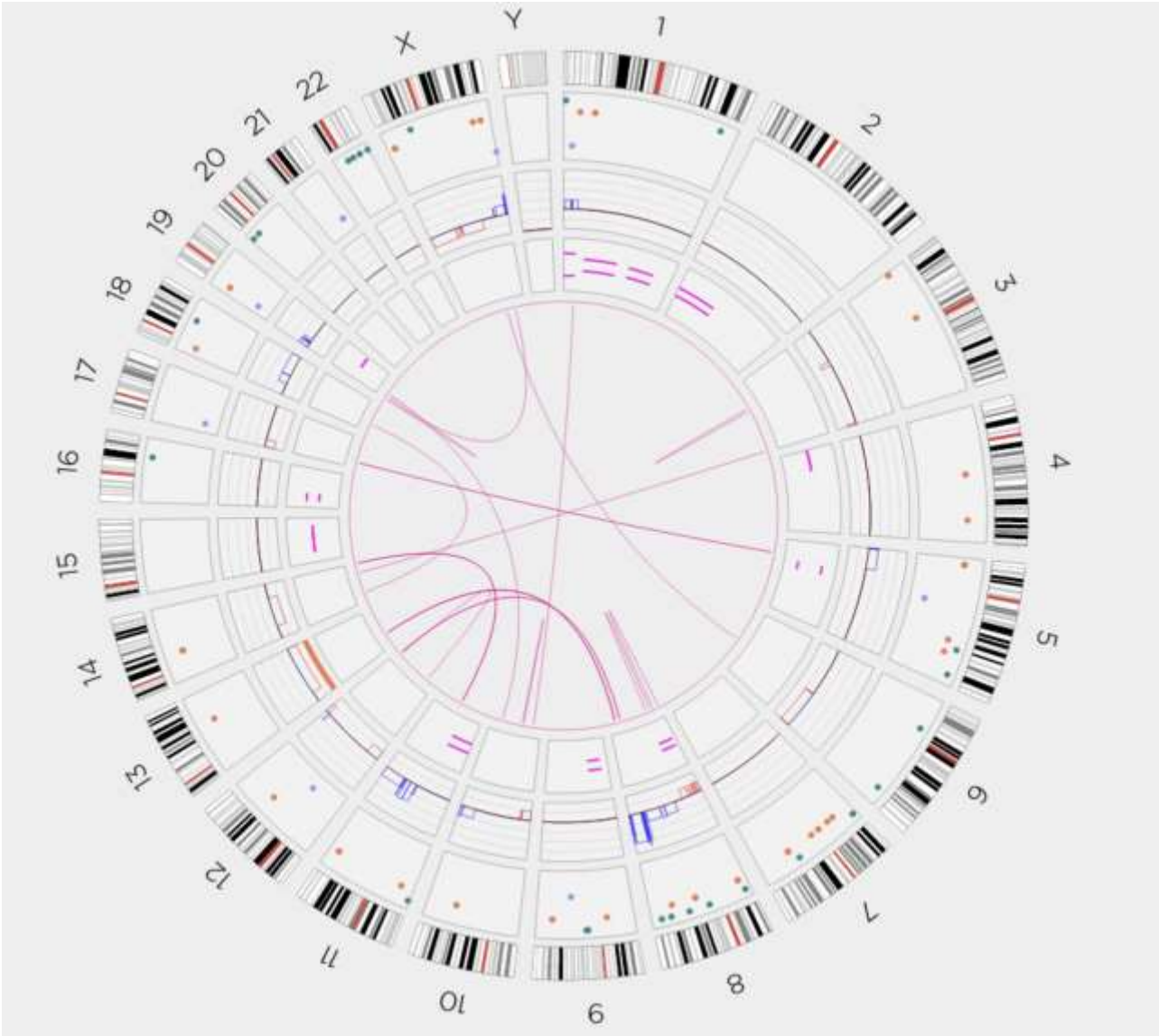


# Cas n°1

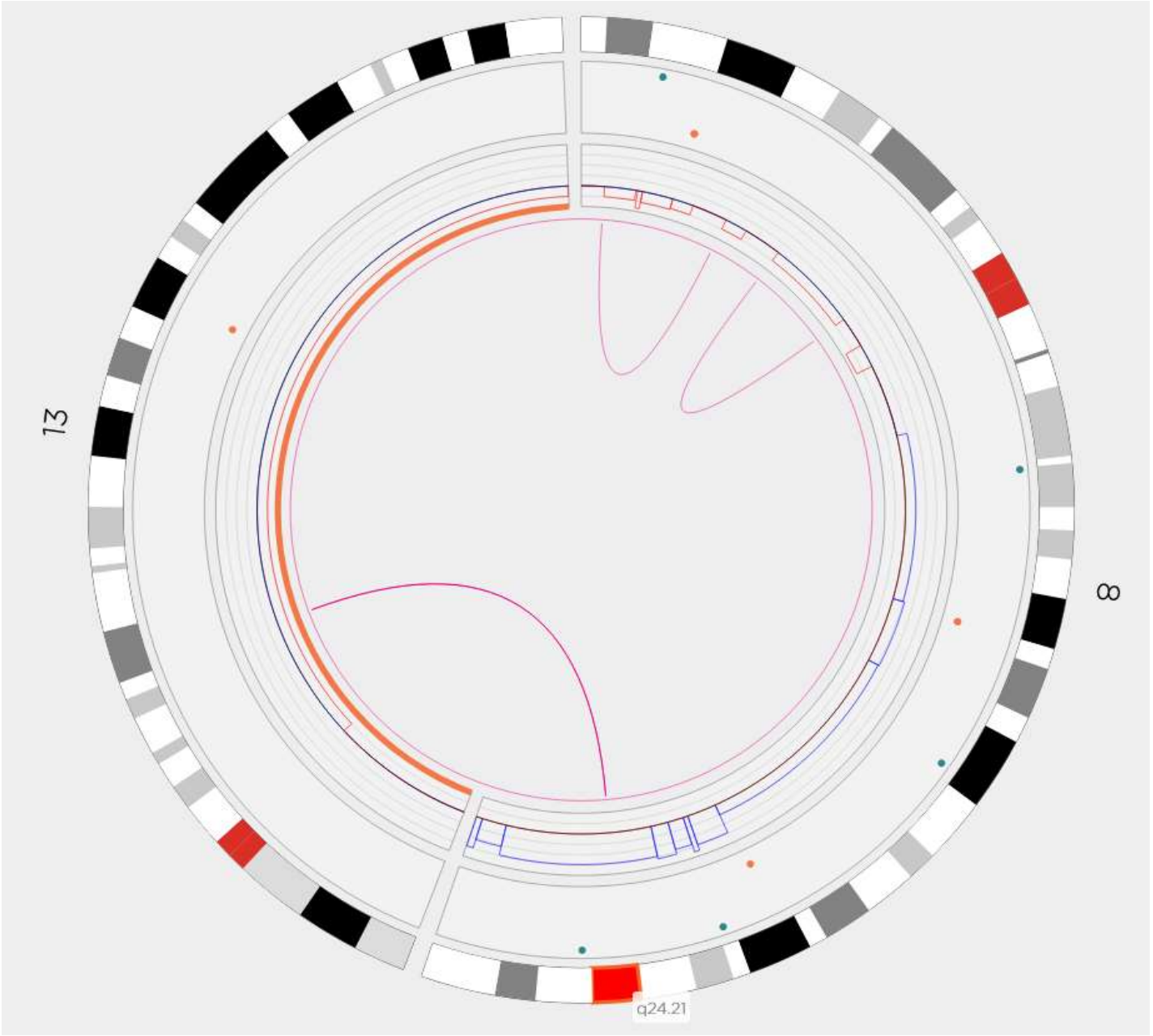

hg19 Known
FAM53A
SLBP
TACC3
FGFR3
LETM1
WHSC1
NELFA
POLN
MXD4
ZFYVE28
Ref 4
14-240424-(
Ref 14

# Cas n°2

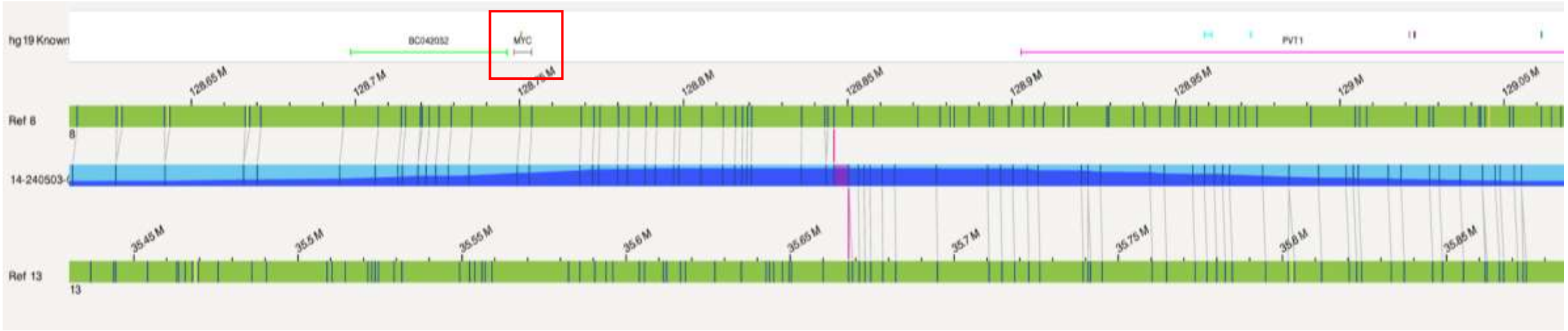
- Femme 67 ans
- 96% plasmocytes médullaires
- Culot 100% pour extraction ADN



# Cas n°2

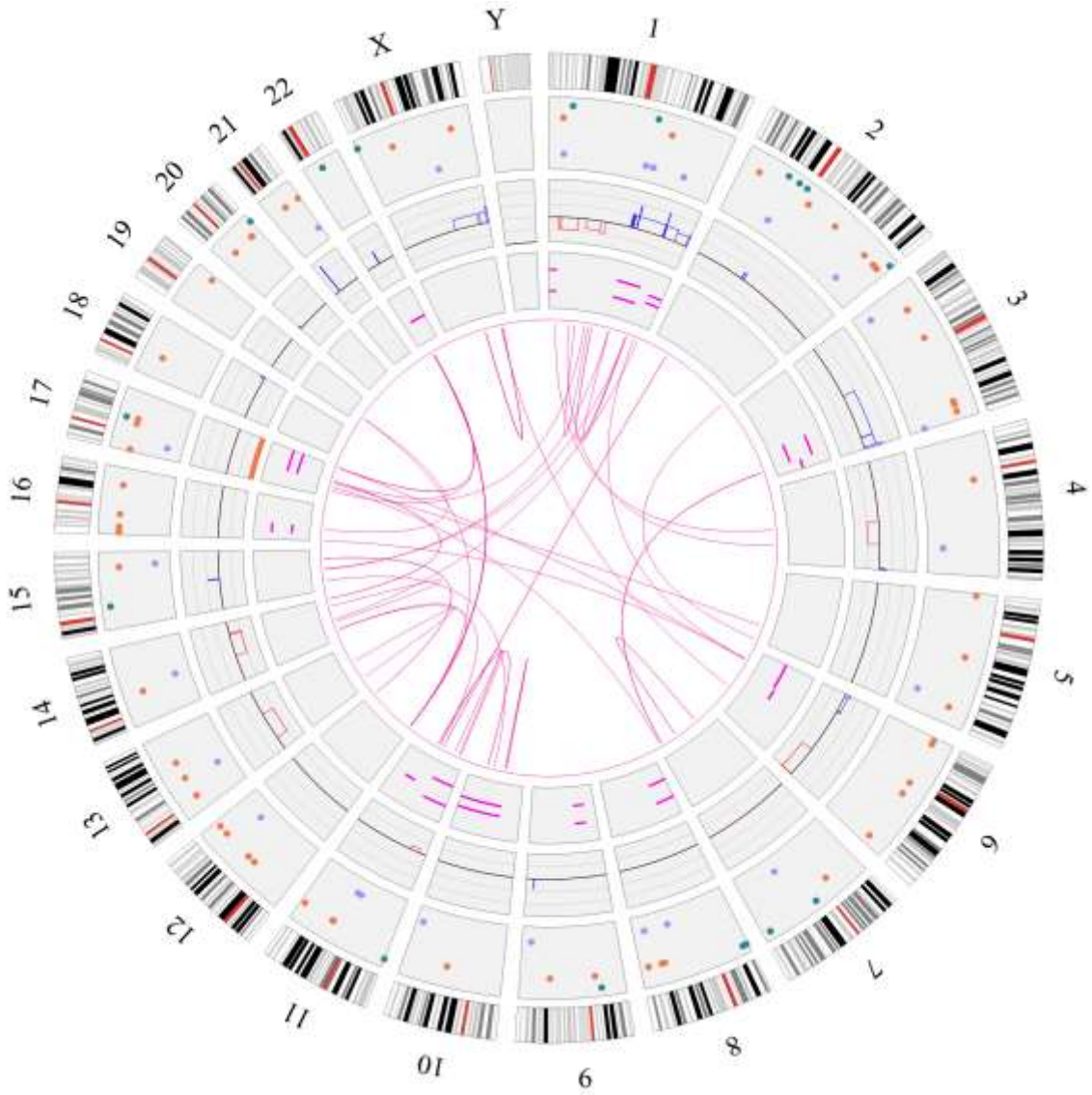


# Cas n°2

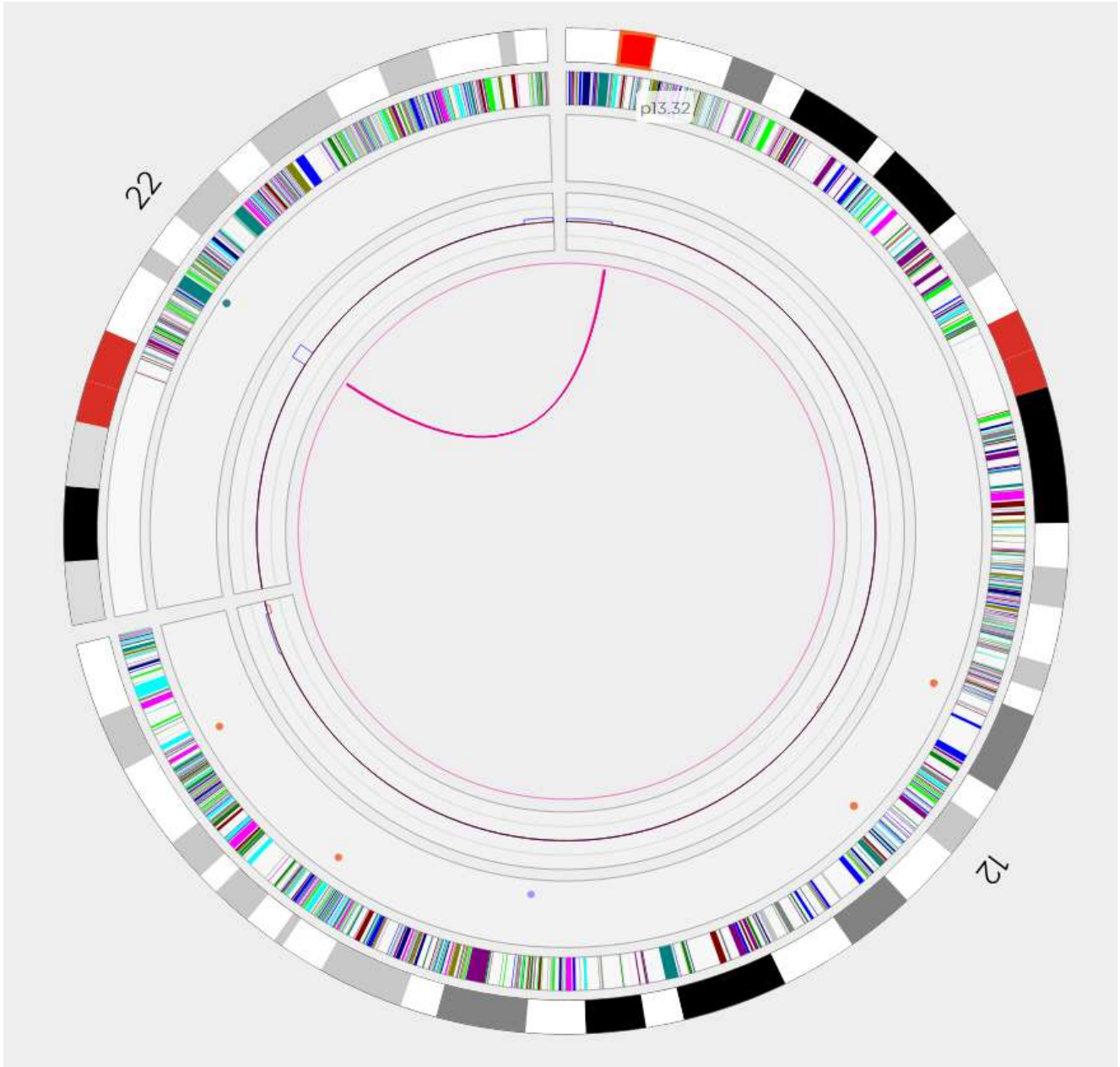

hg19 Known
BC042032
MYC
PVT1
128.65 M
128.7 M
128.75 M
128.8 M
128.85 M
128.9 M
128.95 M
129 M
129.05 M
Ref 8
8
14-240503-
35.45 M
35.5 M
35.55 M
35.6 M
35.65 M
35.7 M
35.75 M
35.8 M
35.85 M
Ref 13
13

# Cas n°3

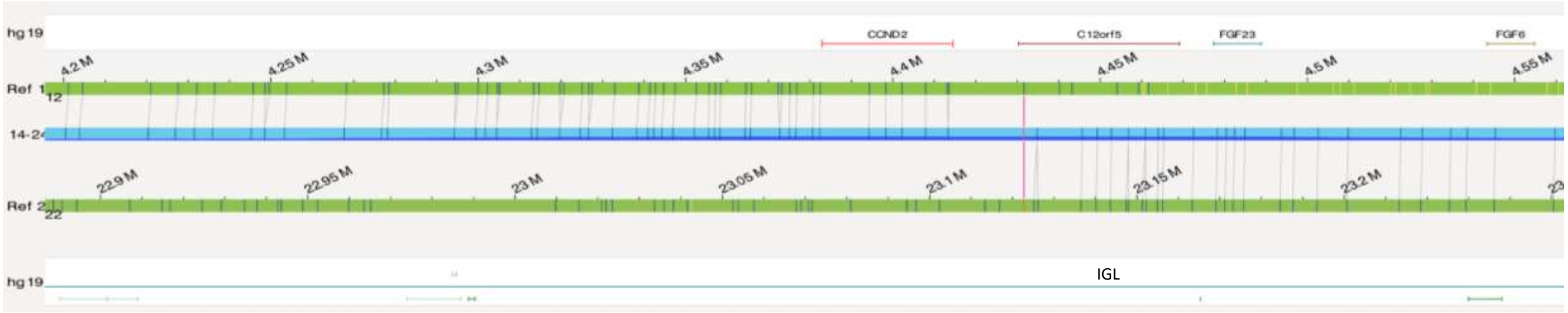
- Femme 90 ans
- 41% plasmocytes médullaires
- Culot 100% pour extraction ADN



# Cas n°3

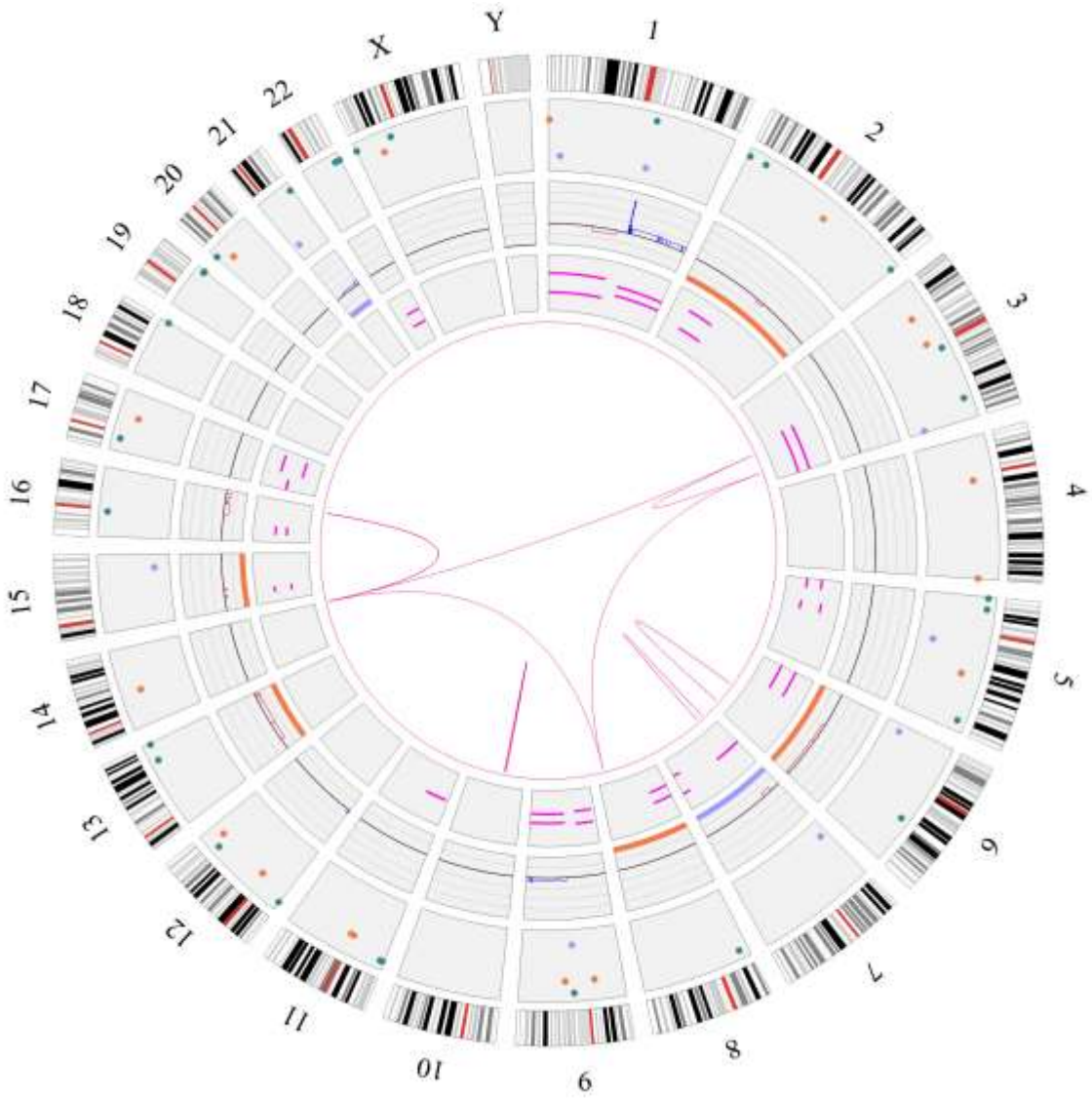


# Cas n°3

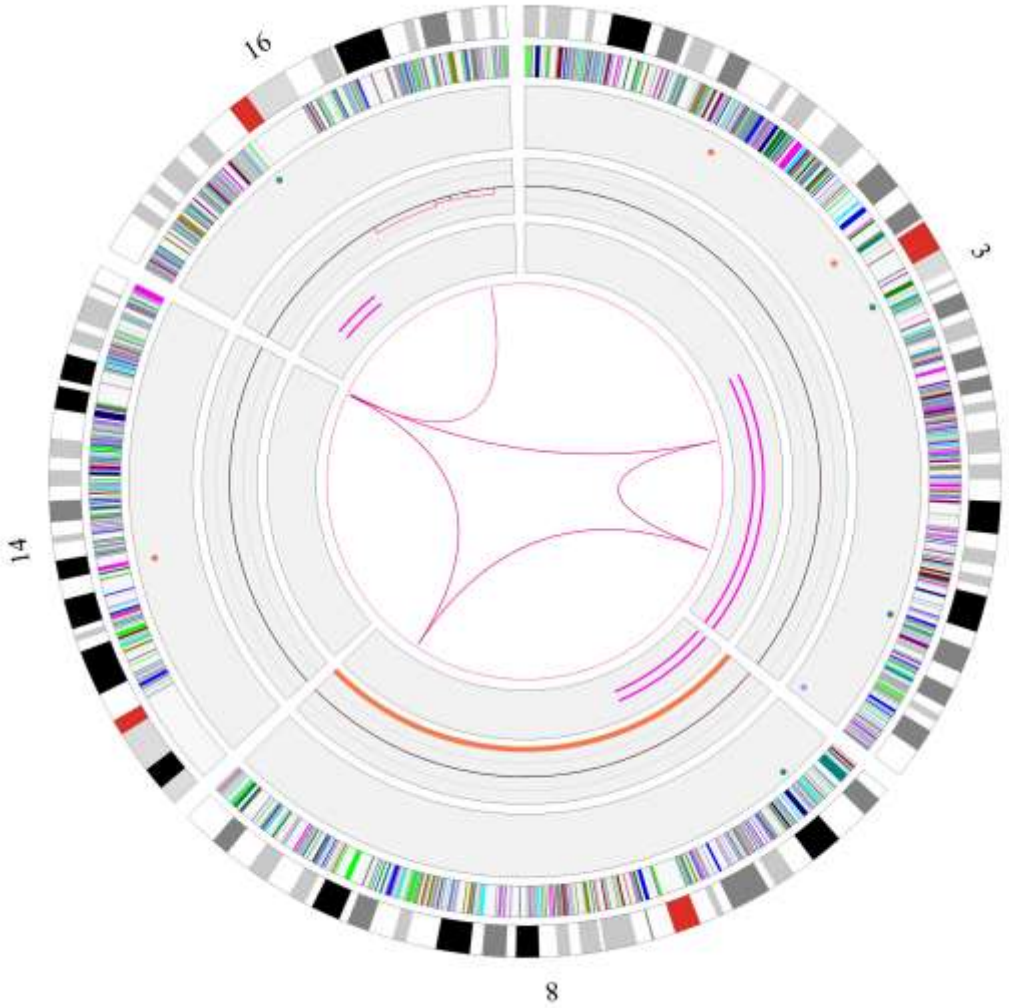

hg 19
CCND2
C12orf5
FGF23
FGF6
4.2 M
4.25 M
4.3 M
4.35 M
4.4 M
4.45 M
4.5 M
4.55 M
Ref 1
12
14-2
22.9 M
22.95 M
23 M
23.05 M
23.1 M
23.15 M
23.2 M
Ref 2
22
hg 19
IGL

# Cas n°4

- Femme 72 ans
- 12.5% plasmocytes médullaires
- Culot 100% pour extraction ADN



# Cas n°4




- **Variations de structure :**

- t(14;16)(q32.33;q23.1), correspondant sur le plan moléculaire au réarrangement IGH::WWOX

- réarrangements complexes impliquant les chromosomes 3, 8 et 14 composés par :

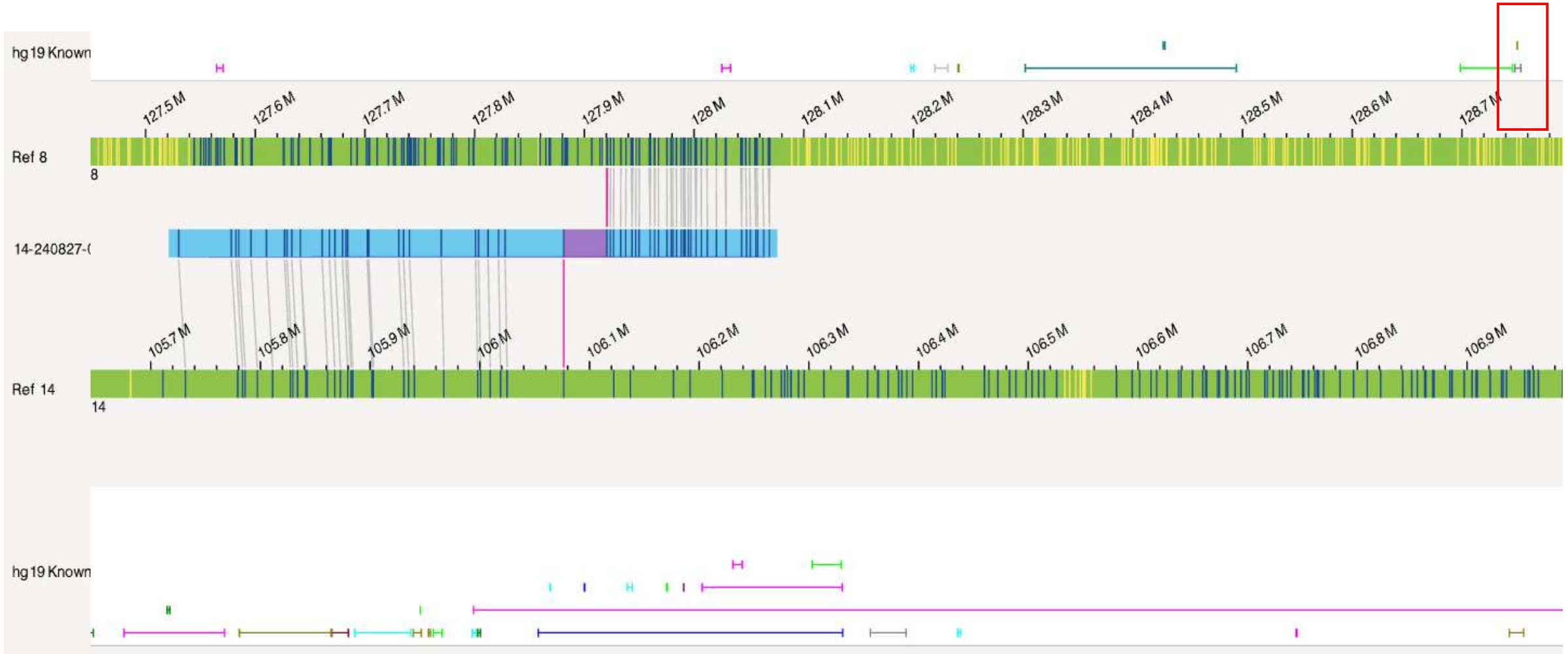
  - t(8;14)(q24.21;q32.33), correspondant sur le plan moléculaire au réarrangement IGH::MYC

  - t(3;14)(q13.33;q32.33), correspondant à un réarrangement du gène IGH

  - t(3;8)(q26.2;q24.21), non récurrente

  - fus(3;3)(q13.33;q26.2), non récurrente

# Cas n°4




!!!!! Contexte de tétraploïdie

# Conclusion

- OGM en routine pour le MM
- Détection pangénomique des SVs
- Détection plus précise des partenaires
- IGH::CCND1 à vérifier par FISH
- Parfois réarrangements très complexes
- Problèmes de ploïdie (quid délétion TP53?)

# Merci

**Equipe de Cytogénétique du CHU de Liège :**

Céline Lété

Catherine Menten

Dr. Nicolas Catarin

Alexandra Guadagni

William Llorente

**Equipe Bionano :**

Lam Nguyen

Guillaume Panara

Dana Jaber

**588453 FISH 33 bis :** Dépistage d'anomalies acquises chromosomiques ou géniques (à l'exception du réarrangement des gènes des immunoglobulines ou des gènes du récepteur cellule T), au moyen d'une méthode de biologie moléculaire : dans la phase d'investigation diagnostique d'une affection lymphoïde chronique (lymphome non-Hodgkinien, leucémie lymphoïde chronique, myélome multiple), à l'exclusion d'une leucémie aiguë, du lymphome de Burkitt, ou des lymphomes lymphoblastiques B ou d'une anémie réfractaire avec exès de blaste (AREB) (Règle diagnostique 1, 6)
**587871 OGM 33 bis :** Dépistage d'anomalies géniques sub-microscopiques au moyen d'une méthode de biologie moléculaire complexe pangénomique dans la phase d'investigation diagnostique d'une leucémie lymphoïde chronique ou d'un myélome multiple #(Maximum 1) (Règle diagnostique 19)