

**Université Pierre et Marie Curie –
Sorbonne Université**

**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE
MEDICALE »**

**COMMENT ACCREDITER L'ANALYSE D'UN PANEL DE
MUTATIONS PAR NGS**

Frédérique FLEURY

2017

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des intervenants du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de Biologie Médicale », et particulièrement Pascal PERNET principal acteur de cette formation.

Je remercie également, le Professeur Christine CHOMIENNE, Responsable du service de l'Unité de biologie cellulaire, Marie-Hélène SCHLAGETER, responsable qualité du service de Biologie Cellulaire, Bruno CASSINAT, Biologiste, Fabien ZASSADOWSKI et Emmanuelle VERGER ingénieurs hospitaliers en biologie de m'avoir aidée et soutenue pour l'inscription à ce DU et la réalisation de ce mémoire.

Et enfin, je remercie, Elisabeth FAURE et Béatrice MARECHAL d'avoir accepté que je suive cette formation dans le cadre de la formation continue.

GLOSSAIRE : Abréviations et définitions

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- Base calling : Attribution des bases à chaque cycle en fonction du signal fluorescent détecté.
- CIQ : Contrôle interne de qualité, sélectionné par le laboratoire en fonction des seuils critiques. Il permet de s'assurer de la fiabilité des résultats et permet de suivre la fiabilité intermédiaire du processus analytique.
- CIL : Comparaison inter-laboratoire permet de prouver que le processus d'analyse mis en place dans le laboratoire est fiable.
- Cluster : Copies identiques de chaque fragment d'ADN allant jusqu'à 1000 réunies, formées par une réaction d'amplification.
- Cofrac : Comité français d'accréditation.
- CV : Coefficient de variation.
- EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique.
- EEQ : Les évaluations externes de la qualité sont des évaluations ponctuelles qui permettent de juger de l'exactitude de la méthode d'analyse employée par le laboratoire.
- EMT : Erreur maximale tolérée
- Fichier fastq : Format de fichier texte permettant de stocker les séquences nucléotidiques et les scores de qualités associés.
- G : Guanine
- GTA : Guide technique d'accréditation
- HAS : Haute autorité de santé
- INF : Informatif

- Ligne de portée : Enoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité ou demande l'accréditation.
- Portée A : La méthode étant reconnue, il s'agit seulement d'une « vérification de méthode », qui aura pour but de montrer que les performances de la méthode sont conformes aux exigences du laboratoire et des recommandations des sociétés savantes et de la littérature, le cas échéant (performances analytiques, conditions environnementales, équipements, personnel...)
- Portée B : La méthode est adaptée ou développée en interne, il s'agit donc d'une validation de méthode. Le laboratoire doit prouver la maîtrise des critères de qualité pour prétendre à une accréditation.
- Portée flexible : Permet entre 2 évaluations Cofrac d'accréditer une nouvelle analyse seulement si elle ne demande pas de nouvelle connaissance et que le principe reste le même. Permet donc de changer d'équipement (appareil) ou de trousse (réactifs) ou de rajouter une analyse sous accréditation si celle-ci est dans la même ligne de portée d'accréditation.
- Portée flexible étendue : permet au laboratoire sous accréditation entre 2 visites Cofrac, d'accréditer des résultats avec une méthode qu'il a lui-même développée ou adaptée si et seulement si celui-ci a déjà été accrédité pour une analyse de portée B de la même portée (de la même famille).

Dans les 2 cas, le laboratoire devra rédiger une procédure dite « Gestion de la portée flexible ». Cette procédure listera les opérations réalisées pour maîtriser le processus

- NMP : Néoplasies Myéloprolifératives.
- 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.

- qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction : technique d'amplification qui permet une quantification précise des produits de PCR lors de la phase exponentielle par la mesure de la fluorescence émise par l'hydrolyse des sondes Taqman
- Qscore : Score de qualité
- Read : Lecture unique de la région étudiée.
- Ref : Référentiel
- Répétabilité : Représente l'écart entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées du même échantillon dans un court laps de temps et dans des conditions strictement identiques (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage). Elle vérifie le bon fonctionnement du système.
- Reproductibilité : Représente l'écart entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées du même échantillon en faisant varier les conditions opératoire.
- RICOS : publications de Carmen RICOS portant sur les variations (analytiques et biologiques) des principaux analytes et servant de référence pour les validations/vérifications de méthodes
- Robustesse : Est définie comme étant la capacité de la méthode à ne pas être affectée par des variations faibles. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation.
- Run : Lancement d'un processus complet de séquençage à haut débit
- SFBC : Société Française de Biologie Clinique : établit des références pour les validations/vérifications de méthodes.

- Technique HRM (High Resolution Melting) : La technique de HRM est basée sur la différence de température de fusion des fragments d'ADN en fonction de leurs séquences. La présence d'un polymorphisme ou d'une mutation sera détectable par la modification de la température d'hybridation des fragments d'ADN.

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	3
2. PRESENTATION DE LA METHODE ET DE LA TECHNIQUE, DU MODE OPERATOIRE, DU DOMAINE D'APPLICATION ET DE LA GESTION DES RISQUES.....	5
2.1. DESCRIPTION DE LA METHODE.....	5
2.2. PRESENTATION DE L'APPAREILLAGE	6
2.2.1. PRESENTATION DES REACTIFS ET DU SEQUENCEUR « ILLUMINA »	6
.....	6
2.2.2. PRESENTATION DES CONDITIONS TECHNIQUES DU SEQUENCEUR	7
2.2.3. PRESENTATION DE L'ANALYSE DES RESULTATS	7
2.3. DOMAINE D'APPLICATION EN VUE D'UNE VALIDATION DE METHODE	8
2.4. ANALYSE DE RISQUE	10
3. VERIFICATION BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
4. VERIFICATIONS EXPERIMENTALES.....	16
4.1. 1. LES CIQ ET LEUR EXPLOITATION.....	16
4.1.2. EXPLOITATION DES EEQ ET DES CIQ EXTERNALISES.....	17
4.2 REPETABILITE	18
4.3 FIDELITE INTERMEDIAIRE.....	18
4.4. EVALUATION DE LA JUSTESSE OU DE L'INEXACTITUDE	18
4.5 APPROCHE DE L'ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE	20
4.6 EVALUATION DES INTERFERENCES ET DES CONTAMINATIONS	21
4.7. ROBUSTESSE	21
4.8. VERIFICATION DES INTERVALLES DE REFERENCE BIOLOGIQUE (VALEURS USUELLES)	21
4.9. LIMITE DE QUANTIFICATION ET DE LINEARITE	21
4.10 SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE	21
5. VERIFICATIONS EXPERIMENTALES DU NGS	22
5.1. LE CIQ	22
5.2. LA REPETABILITE	22
5.3. FIDELITE INTERMEDIAIRE.....	22
5.4. EVALUATION DE LA JUSTESSE OU DE L'INEXACTITUDE	24
5.5. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE	25

5.6.	EVALUATION DES INTERFERENCES ET DES CONTAMINATIONS	25
5.7.	ROBUSTESSE	25
5.8.	VERIFICATION DES INTERVALLES DE REFERENCE BIOLOGIQUE.....	25
5.9.	INTERVALLE DE MESURE ET LIMITE DE DETECTION	25
6.	COMPARAISON DE METHODE.....	26
6.1.	COMPARAISON DE METHODE « RECHERCHE DE LA MUTATION JAK2 V617F » (CF.ANNEXE 3)	27
6.2.	COMPARAISON DE METHODE SUR LA RECHERCHE DE LA MUTATION DANS L'EXON 12 DU GENE JAK2 (CF.ANNEXE 4).....	29
6.3.	COMPARAISON DE METHODE SUR LA MUTATION MPL (CF.ANNEXE 5)	30
	CONCLUSION	30

1. INTRODUCTION

L'hôpital Saint-Louis fait partie du Groupe Hospitalier Saint-Louis, Lariboisière, Fernand Widal. La dermatologie est la spécialité historique de l'hôpital Saint-Louis, mais d'autres spécialités ont été développées. C'est le cas de la cancérologie, la chirurgie plastique, le traitement des grands brûlés, la transplantation d'organes, et surtout le domaine que je vais aborder dans ce mémoire : l'Hématologie.

Depuis les années 1970, l'hôpital Saint-Louis est un centre de référence pour la prise en charge complète des hémopathies malignes dont notamment les Néoplasies Myéloprolifératives (NMP), qui regroupent un certain nombre de pathologies telles que la polyglobulie de Vaquez (Expansion de la lignée erythroblastique), la thrombocytémie essentielle (Expansion de la lignée plaquettaire) et la myélofibrose (Expansion du tissu de soutien).

La découverte de la mutation JAK2V617F a été une avancée majeure dans les NMPs. Depuis, de nombreuses mutations ont été découvertes (dans les gènes MPL, JAK2 Exon12, CALR...) montrant une importante hétérogénéité inter-patient. Environ 20 à 30 gènes ont été décrits mutés dans ces pathologies avec des fréquences très différentes. Cette variabilité de profils génomiques permet, en fonction des données cliniques et thérapeutiques de chaque patient, de dresser des tableaux diagnostiques et pronostiques. Pour une prise en charge individualisée de chaque patient il est nécessaire de pouvoir étudier simultanément la séquence de tous ces gènes, ce qui est devenu possible uniquement grâce à l'avènement des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS).

C'est le service de Biologie cellulaire qui réalise les examens nécessaires au diagnostic et au suivi cellulaire et moléculaire des NMPs, à l'aide de différents outils analytiques dont NGS.

La question est donc : Comment accréditer un panel de mutations par NGS destiné au diagnostic / pronostic des néoplasies myéloprolifératives ?

En effet, depuis la réforme de la biologie médicale de 2010, les laboratoires Français doivent être accrédités, après une évaluation des pratiques par des pairs et des qualitatifs, sur la totalité de leurs examens selon la norme ISO 15189 pour 2020.

A ce jour le laboratoire B2P du GH est en cours d'accréditation pour 50% de ses actes.

Pour répondre à la question « Comment accréditer un panel de mutation par NGS destiné au diagnostic / pronostic des néoplasies myéloprolifératives ? », il est indispensable de constituer un dossier de validation de méthode. Ce dossier a pour but de démontrer que le laboratoire génère des données de qualité suffisante pour répondre à la norme ISO 15189 et son SH ref 02 en vigueur.

Pour nous aider nous avons à notre disposition différents documents opposables ou non, indispensables à l'obtention d'une accréditation tels que :

- le SH FORM 43 « Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale ».
- le SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale qui décrit les 2 phases d'une validation de méthode, la phase initiale (avant la mise en place de la technique en routine : validation / vérification de méthode) puis la phase de vérification continue et de confirmation des performances (par suivi des contrôles de qualité)

Le dossier de validation de méthode doit contenir :

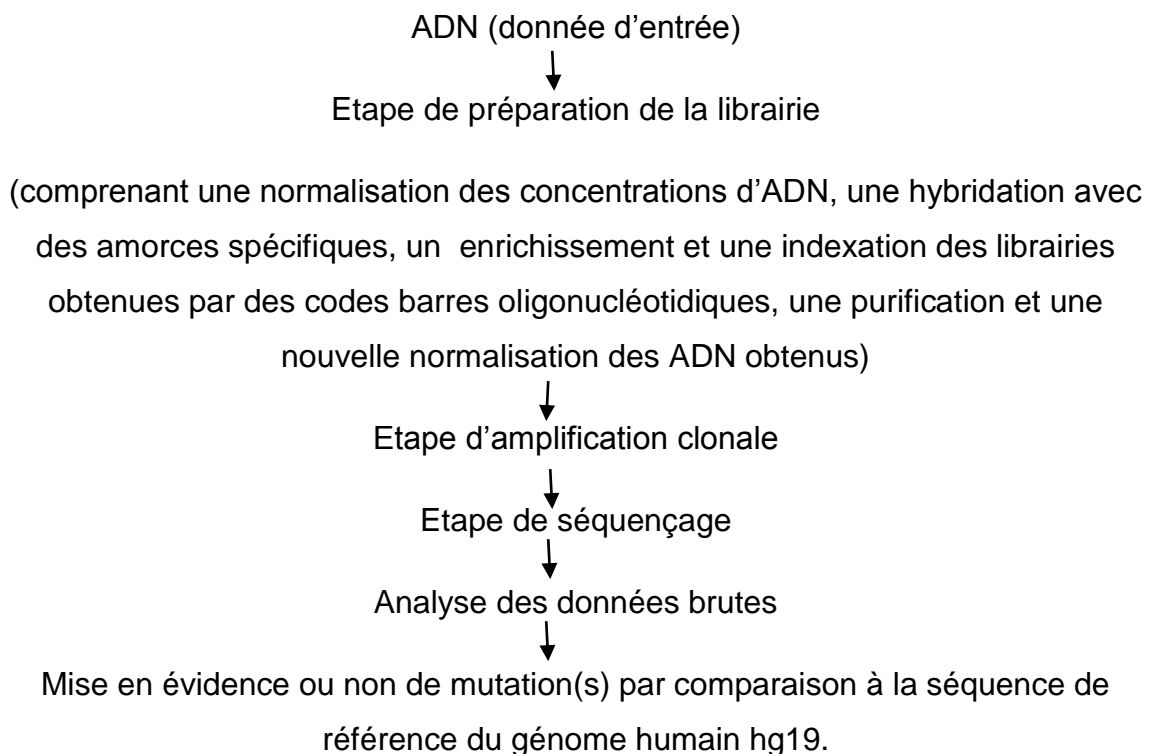
- la description de la méthode (processus analytique, maîtrise des risques),
- définir des critères de performances à évaluer et des limites acceptables,
- la bibliographie,
- les vérifications expérimentales
- la conclusion et la déclaration d'aptitude de la méthode

2. Présentation de la méthode et de la technique, du mode opératoire, du domaine d'application et de la gestion des risques

2.1. Description de la méthode

Ce dossier de validation concerne la recherche de mutations somatiques dans 23 gènes par séquençage de nouvelle génération. Cette méthode complexe composée de plusieurs processus suit la méthode analytique suivante :

Méthode d'enrichissement/chimie du séquençage/analyse bio-informatique



Le principe de la méthode de séquençage à haut débit repose sur l'analyse en parallèle de molécules d'ADN fixées individuellement sur un support solide (la Flowcell). S'en suit une étape d'amplification clonale et d'élongation à l'aide de nucléotides marqués, créant jusqu'à 1000 copies identiques de chaque ADN (=cluster). Cette étape permet la détermination de la séquence de chaque clone. Les données enregistrées par le séquenceur (données de fluorescence) sont ensuite interprétées puis traduites en séquence génomique (base calling)

Les séquences déduites sont ensuite alignées sur le génome humain, et les variations par rapport au génome de référence sont identifiées (variant calling) ;

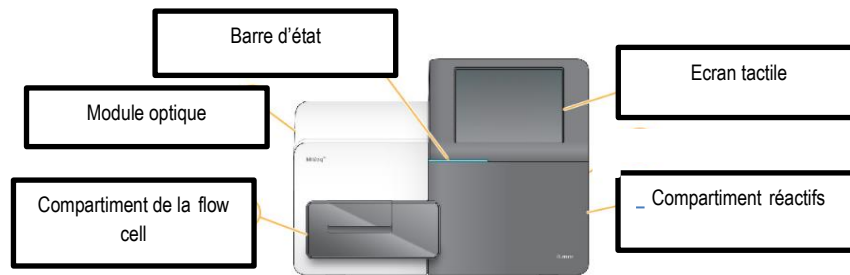
Les séquences d'intérêt pour les syndromes myéloprolifératifs sont:

- TET2 : exon 3 à 11
- EZH2 : exon 2 à 20
- ASXL1 : exon 12
- MPL : exon 10
- JAK2 : 23 exons
- CSF3R : exon 14 à 17
- SRSF2 : exon 1
- IDH1 : exon 4
- IDH2 : exon 4
- CALR : exon 9
- DNMT3A : exons 2 à 23
- LNK : exons 2 à 8
- NRAS : exons 2 à 5
- NFE2 : exons 3 et 4
- TP53 : exons 2 à 11
- KRAS : exons 2 et 3
- SETBP1 : exon 4
- U2AF1 : exons 2 et 6
- CBL : exons 8 et 9
- CBLB : exons 8 et 10
- CBLC : exons 8 et 10
- IKZF1 : exons 2 à 8
- SF3B1 : exons 13 à 16

2.2. Présentation de l'appareillage

2.2.1. Présentation des réactifs et du séquenceur

« Illumina »



Réactifs et plaque de purification pour l'étape de préparation de la librairie



Réactifs du séquençage

2.2.2. Présentation des conditions techniques du séquenceur

Le logiciel de l'automate va soustraire le bruit de fond et va analyser les différentes photographies de fluorescences.

Une valeur qualité (QV) est attribuée à chaque base séquencée (ratio signal spécifique / bruit de fond) ; elle est le reflet de la probabilité d'erreur d'assignation de la base à cette position

C'est pour cela que les performances techniques préétablies sont vérifiées, avant l'analyse Bioinformatique :

Dans nos conditions de run : flowcell standard, Chimie MiSeq v2, pour 500 cycles :

- Le Q30, correspond à une probabilité pour que le séquenceur fasse une erreur sur 1000 bases séquencées. Il doit être supérieur à 75% car il représente la qualité globale des données générées pour chaque échantillon.
- La charge optimale de clusters sur la Flowcell, le « cluster density » doit être comprise dans la fourchette de 800 à 1200 K/mm².
- Le « Cluster Passing Filter » ne doit pas être inférieur à 80%, puisqu'il correspond au pourcentage de « clusters » qui ont passé le filtre, et qu'il indique la pureté du signal de chaque cluster.

Si les critères de qualité ne sont pas atteints, il est nécessaire de recommencer la préparation de la librairie ou l'étape de séquençage en diluant les librairies obtenues.

2.2.3. Présentation de l'analyse des résultats

Les séquences sont à ce jour analysées par une société extérieure à l'APHP « Sophia Genetics », société de bioinformatique avec laquelle un contrat revu annuellement a été établi. C'est la seule société à ce jour à être dans le champ de l'analyse bioinformatique, certifiée ISO 13485 et ISO 27001 répondant à des

exigences des systèmes de management de la qualité et de système de gestion de la sécurité de l'information.

Le contrat stipule entre autres :

- Que Sophia Genetics est dans l'obligation de réaliser des sauvegardes des données brutes, des données d'analyses et de respecter la confidentialité.
- Que Sophia Genetics est également dans l'obligation de tenir le laboratoire informé des changements de version du logiciel et de réaliser, le cas échéant une étude d'impact en reprenant les dossiers précédemment analysés.

Cette société est capable :

- D'aligner la séquence produite (fichier fastq du MiSeq envoyés chez Sophia Genetics) sur une séquence de référence
- D'identifier les variants et de les nommer

Ainsi, pour que la recherche de mutation par NGS soit accréditée il est indispensable de réaliser un dossier de qualification des données informatiques et d'analyse des résultats, dans lequel sera précisé, le numéro de version du logiciel utilisé.

2.3. Domaine d'application en vue d'une validation de méthode

En amont d'une validation de méthode, il faut définir la portée d'accréditation de l'analyse à évaluer pour décrire les compétences requises à la réalisation des examens. Pour faciliter et harmoniser l'expression des portées le Cofrac a mis à disposition, le SH Ref 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » et SH INF 50 « Portée type d'accréditation ». Les analyses sont classées dans le thème de la santé humaine en Domaine → sous domaine → Famille

Puis par :

- Nature de l'échantillon
- Nature de l'examen / analyse (qualitatif ou quantitatif)

- Principe de la méthode
- Référence de la méthode portée A ou B

Le choix de la sous-famille s'effectue selon le tableau fourni dans le document SH-INF 50 page 9 joint ci-dessous. Dans le cas du NGS pour la recherche de mutations somatiques en hématologie, il s'agit de la sous-famille GENMOLBM

DOMAINE	FAMILLE	SOUS-DOMAINE	SOUS-FAMILLE
BIOLOGIE MEDICALE	BIOCHIMIE-GENETIQUE	BIOCHIMIE	Biochimie générale et spécialisée (BIOCHBM) Pharmacologie-Toxicologie (PHARMACOSTPBM – TOXICOBM) Radiotoxicologie (RADIOTOX)
		GENETIQUE	Génétique constitutionnelle (GENMOLBM) Génétique somatique (GENMOLBM) Dosimétrie biologique (DOSBIO)
	HEMATOLOGIE-IMMUNOLOGIE- BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION	HEMATOLOGIE	Hématocytologie (HEMATOBM) Hémostase (COAGBM) Immuno-hématologie (IMMUNOHEMATOBM)
		IMMUNOLOGIE	Auto-immunité (AUTOIMMUNOBM) Allergie (ALLERGBM) Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité (groupage HLA; ICELHISTOBM)
		BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Spermologie diagnostique (SPERMIOBM) Activités biologiques d'AMP (AMPBIOBM)
	MICROBIOLOGIE	MICROBIOLOGIE	Sérologie infectieuse (ISEROBM) Bactériologie (BACTH) Parasitologie – Mycologie (PARASITOMYCO) Virologie (VIROH) Agents transmissibles non conventionnels (ATNCBM)

Le choix de la ligne de portée s'effectue selon le tableau fourni dans le document SH-INF 50 page 81 joint ci-dessous. Pour le NGS appliqué aux recherches de mutations somatiques en hématologie, il s'agit de la ligne de portée GB9

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
GB9	Échantillons biologiques d'origine humaine Blocs de tissus et lames Cultures et lignées cellulaires Acides nucléiques : ADN, ARN, minigènes	Recherche et caractérisation de mutations ponctuelles ou de réarrangements (génotypage)	Méthode de type qualitatif et quantitatif Culture cellulaire éventuelle, extraction, purification de protéines et/ou d'acides nucléiques, avec ou sans amplification (PCR, ...) - PCR avec amorce spécifique, - Digestion enzymatique, - Long range PCR, - Séquençage, - Hybridation moléculaire (Southern blot, dot blot, ligation, "puce à ADN", SNApshot ...), - Expression protéique (traduction synthèse <i>in vitro</i> , PTT, ...), - Etude protéomique (électrophorèse, spectrométrie de masse, Westernblot, ...)	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Ex. criblage de mutations ponctuelles, recherche d'amplification de triplets, tests génétiques, recherche de hotspots somatiques #

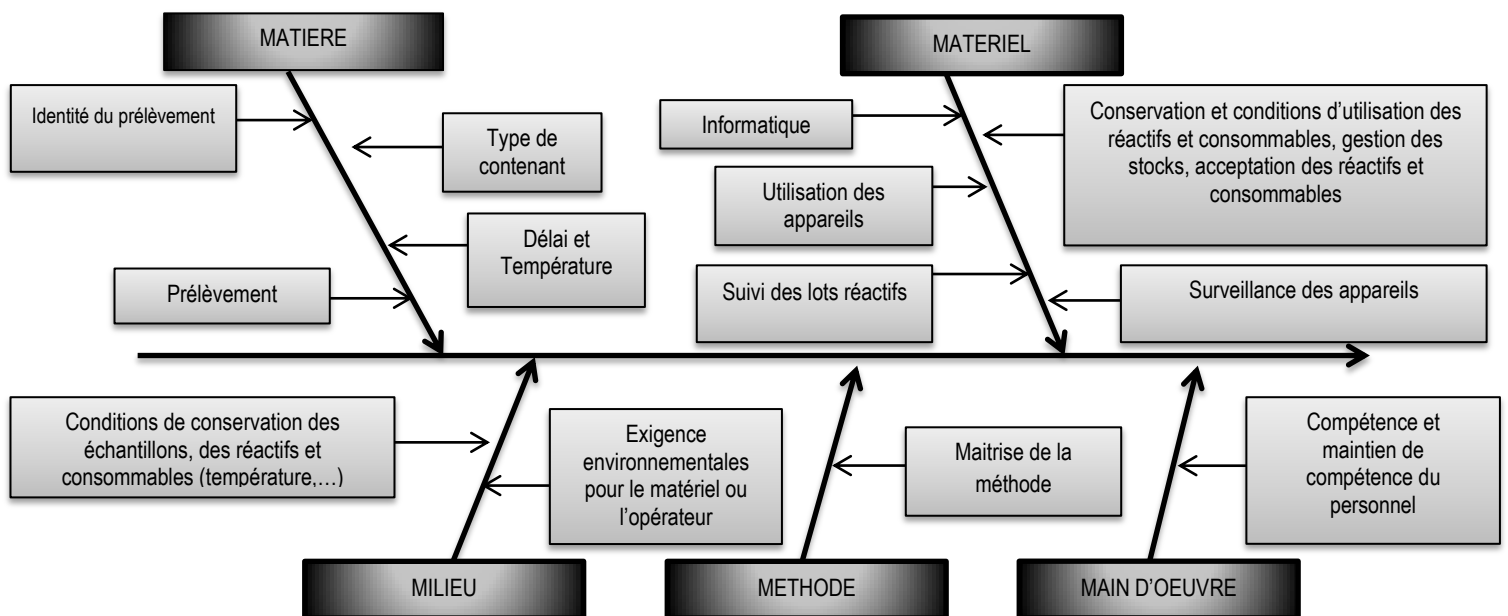
2.4. Analyse de risque

Comme le stipule le chapitre 4.14.6 de la norme NF EN ISO 15189 page 17 et le GTA04 page 16, en amont d'une validation de méthode, il est nécessaire de réaliser une analyse de risque pour évaluer les process pré, per et post-analytiques.

Cette analyse permet la mise en place des indicateurs de qualité pour réduire voire éliminer les risques de défaillances potentielles.

Pour cela, le laboratoire devra à partir des documents fournisseur : collecter les informations pertinentes à connaître sur le système analytique (méthode, équipement, réactifs), consigner les points critiques et évaluer leurs criticités, noter les modalités de maîtrise mises en œuvre.

Ces informations peuvent être analysées par la méthode des 5M (Matière, Matériel, Milieu, Méthode et Main d'œuvre), qui peut être représenté par le diagramme d'Ishikawa comme ci-dessous (la liste n'est pas exhaustive) :



Famille des 5M	Données d'entrée	Echelle de criticité	Points critique à maîtriser
Matière (échantillons)	Identité	5	Identification sans ambiguïté de l'échantillon
	Prélèvement	1	Information des prescripteurs et des préleveurs
	Type de contenants	1	Tube EDTA de 5ml de sang veineux ou de moelle osseuse. Interférence avec certains anticoagulants
	Délai et température avant traitement analytique	1	Délai d'acheminement, température de conservation et de transport, prétraitement de l'échantillon
Milieu	Condition et conservation des échantillons (t°...)	1	Conservation des échantillons avant analyse à une température <-18°C
	Exigence environnementales pour le matériel ou l'opérateur	3	Absence de contamination microbiologique
	Exigences environnementales pour le matériel	3	Absence de contamination par les produits de PCR
Matériel (équipement)	Surveillance des appareils	3	Absence de dérive des performances
	Informatique	1	Etalonnage, connexions, gestion et archivages des données
	Utilisation des appareils	1	Maitrise des équipements
Matière (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation des réactifs et consommables, gestion des stocks, acceptation des réactifs et consommables	3	Conditions de réception, de stockage, de conservation des réactifs (température ambiante, réfrigération ou congélation), durée, gestion des stocks
	Suivi de lots de réactifs	3	Réactovigilance, identification des numéros de lots utilisés pour la réalisation des examens
Méthode	Maitrise de la méthode	3	Processus de réalisation
Main d'œuvre (personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	3	Compétences des personnels

- Maitrise des conditions environnementales (chapitre 5.2 de la norme) :

Pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité, il a fallu avant la mise en place de cette technique évaluer la maitrise des conditions environnementales. Ceci pour démontrer que les conditions ambiantes du laboratoire sont en adéquation avec les tâches à réaliser.

Cette évaluation concerne notamment :

- La température des pièces
 - Les lieux de stockage des réactifs, des consommables et des échantillons à analyser
 - Des pièces de pré et post amplification dont l'accès est limité aux agents habilités et respectant un sens de marche « en avant ».
 - Un circuit des déchets adapté et une élimination appropriée.
- Maitrise de l'échantillon primaire : Maitrise du processus Pré-analytique (chapitre 5.4 de la norme NF EN ISO 15189 pages 26 à 30)

La maitrise de l'échantillon primaire est primordiale et représente encore la majeure partie des non conformités (Identification, prélèvement, le type de contenant et le délai et la température d'acheminement). C'est pour cela que le laboratoire a mis en place des procédures générales, des instructions de travail, des modes opératoires et un manuel de prélèvement qui est accessible sur le site de l'hôpital et dans le base de gestion documentaire (Kalilab).

Ces documents stipulent, que l'analyse NGS, est réalisée à partir d'un échantillon de sang ou de moelle osseuse, prélevé sur EDTA, conservé à une température comprise entre 15 et 30°C, et que le délai d'acheminement est de 72h.

A réception, le laboratoire s'assure de la conformité du prélèvement, puis réalise l'enregistrement de la demande, l'aliquotage et la conservation de l'échantillon avant extraction de l'ADN.

- Maitrise continue des équipements :

Le laboratoire doit s'assurer de la maîtrise de ses équipements et de la sauvegarde des résultats. Cela comprend :

- Séquenceur : données métrologiques, maintenance.
- Les équipements qui interviennent dans le processus analytique mais qui n'interviennent pas dans la mesure (étuve à 37°C, thermocycleur, centrifugeuse, congélateur).
- Les logiciels informatiques : logiciel de bord, logiciel d'analyse et logiciel de gestion du laboratoire (« Glims »...)
- Et les équipements de mesure : pipettes, Qubit.

Pour cela, le laboratoire a mis en place à l'aide de procédures générales, d'instructions de travail et de modes opératoires techniques

- Un cahier de vie et un tableau de maintenance pour le séquenceur.
- Des contrôles réguliers pour les instruments de mesure n'ayant pas d'influence sur la qualité des résultats.
- Des suivis annuels des équipements critiques par des sociétés de métrologie prestataires de service accréditées Cofrac (chapitre 5.3.1.4 de la norme NF EN ISO 15189 page 24).
- Des sauvegardes automatiques des données brutes, sur le réseau hospitalier auquel est relié le MiSeq, et également sur la plateforme de bioinformatique de l'APHP : SequOIA-IT, dédiée au traitement des données de séquençage pour la mise en place de la médecine génomique de précision.
- Des dossiers tests pour vérifier que les comptes rendus restent identiques durant tout le temps de leurs conservations. (cela pour répondre au chapitre 5.10.3 f. de la norme NF EN ISO 15189 page 39)

- Des surveillances de température (pièces et lieux de stockage) par des sondes certifiées (cela permet de répondre au chapitre 5.3.1.4 de la norme NF EN ISO 15189 page 24)
 - Et pour s'assurer que la température est bien homogène sur l'ensemble du thermocycleur, à chaque série l'emplacement du CIQ dans la plaque est changé.
- Maitrise des réactifs et des consommables (chapitre 5.3.2 de la norme NF EN ISO 15189 pages 25 et 26)

La norme spécifie entre autres que le laboratoire doit :

- s'assurer de la traçabilité des lots.
- Vérifier à chaque changement de lot ou de date de livraison, que les réactifs soient conformes aux exigences définies par le laboratoire.

Cependant, dans le cas du NGS, le coût, le temps technique et la durée du run ne permettent pas d'avoir au laboratoire de période probatoire aussi bien pour les réactifs que pour les CIQ. C'est pour cette raison que des recommandations générales de gestions des stocks ont été mises en place au sein du service. Afin d'éviter une dégradation de la qualité des séquences générées dépendante du déroulement d'un run et pouvant être liée à un problème de stabilité des réactifs, la température et la durée de conservation des réactifs suivent rigoureusement les recommandations du fournisseur.

Par ailleurs, la procédure générale de gestion des stocks, des réactifs et des consommables du laboratoire stipule qu'il est nécessaire de récupérer quand cela est possible, les fiches de stress de chaque réactif, pour répondre par des mesures correctives et/ou préventives à toute dégradation des conditions de conservation.

- Main d'œuvre : Formation , habilitation et maintien des compétences des différents opérateurs (chapitre 5.1 de la norme)

La maîtrise de la qualité passe obligatoirement par la formation, l'habilitation du personnel et le maintien des compétences.

Ainsi, pour s'assurer de la maîtrise des procédures et des équipements, il a été mis en place au sein du laboratoire : une grille de formation, une grille d'habilitation et de tracabilité du tutorat ainsi qu'un formulaire de maintien d'habilitation.

- Méthode : Maîtrise du processus analytique (chapitre 5.5 de la norme)

Pour s'assurer que le processus analytique se déroule dans les conditions préétablies, il a fallu rédiger des procédures dont la lecture a été attestée par le personnel habilité.

Et pour éviter toute modification inappropriée, la feuille de calcul Excel utilisée pour les normalisations et les dilutions de l'ADN est verrouillée.

3. Vérification bibliographique

Pour améliorer les connaissances du laboratoire sur les performances de sa méthode, il est nécessaire de faire des recherches bibliographiques qui seront intégrées dans le dossier de vérification.

Dans la mesure du possible, il est nécessaire de suivre les recommandations fournies par la haute autorité de santé (HAS), ou les textes réglementaires, ou les sociétés savantes pour définir les limites acceptables, seront appliquées par le laboratoire.

- SFBC : Spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage des validations des techniques.
- RICOS :cf glossaire.
- Flandrin 2015 ABC
- Barosi 2013 critères de réponse PV et ELN
- Institut National du cancer de Mars 2016 : Validation de methode NGS_FR FINAL9

4. Vérifications expérimentales

Les vérifications expérimentales permettent d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire et de prouver que la méthode répond bien aux besoins définis par le laboratoire.

En effet, la maîtrise du processus analytique est indispensable pour s'assurer que :

- les indicateurs mis en place à la suite de l'analyse de risque sont adéquats
- les performances de la méthode restent conformes aux spécifications du laboratoire au cours du temps.
- la qualité du résultat est fiable.

4.1. Les contrôles de qualité

Le GTA 06 « Guide technique d'accréditation contrôle de qualité en biologie médicale » est une aide possible pour cette démarche.

4.1.1. Les CIQ et leur exploitation

Ceux-ci doivent être choisis pour avoir un comportement le plus proche possible des échantillons patients et avoir des concentrations ou des pourcentages d'allèles mutés, les plus proches possible des seuils de décision clinique.

Dans l'idéal il faut des CIQ dépendants du fournisseur et des CIQ indépendants ou le cas échéant un pool d'échantillons.

Les valeurs cibles étant connues de l'opérateur, les CIQ sont utilisés pour vérifier la conformité analytique des résultats en temps réel.

Le passage régulier de ces contrôles permet de vérifier la fidélité du processus analytique et donc d'anticiper la dérive du système dans le temps.

Ces résultats sont également utiles pour suivre la fidélité intermédiaire de la méthode par le calcul du coefficient de variation. Et le passage régulier permet de vérifier la fidélité du processus analytique et donc d'anticiper la dérive du système dans le temps.

4.1.2. Exploitation des EEQ et des CIQ externalisés

Conformément à la norme 15189 et au SH Ref 02 « Recueil des exigences spécifique pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale », le laboratoire doit établir un planning de participation à des comparaisons inter-laboratoires (CIL). La liste des organisateurs est disponible dans le SH INF 19 « Liste des organisateurs d'évaluations externes de la qualité ».

Pour les méthodes quantitatives, les CIL, vont permettre de suivre la justesse et l'inexactitude de la méthode. Et pour les méthodes qualitatives, ils contribuent aussi à évaluer l'interprétation des résultats et la qualité des rendus de résultats.

Il existe deux types de contrôle inter-laboratoire :

- L'EEQ, qui est une procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison inter-laboratoires réalisée par un organisme à l'aide d'échantillon de contrôle connu.
- Le CNQ, qui est un contrôle national de la qualité obligatoire

Les CIQ externalisés sont réalisés par plusieurs laboratoires, sur un même lot d'échantillons de contrôle. Les résultats obtenus sont confrontés entre eux par l'établissement organisateur.

A réception du compte rendu, le biologiste confronte les résultats du laboratoire avec les résultats attendus. Il informe les techniciens des résultats obtenus et met en place si nécessaire, les actions curatives, voire correctives nécessaires.

Les résultats obtenus, les commentaires, les écarts et les éventuelles mesures correctives doivent être tracés.

Remarque : En l'absence d'EEQ et de CNQ, il faut procéder à des échanges inter-laboratoire. C'est le laboratoire expéditeur qui formalise les limites acceptables et qui évalue l'exactitude (justesse et fidélité).

4.2 Répétabilité

L'évaluation de la répétabilité est effectuée par la mesure répétée, d'un CIQ ou d'un échantillon, sur 2 niveaux de mesure choisis en fonction des seuils de décision.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne, l'écart type puis le coefficient de variation en pourcentage et de comparer ce dernier avec le CV limite admissible défini au préalable dans le laboratoire

$$CV(\%) = (S/m) * 100$$

Avec m=moyenne ; S= écart-type et CV=coefficient de variation

En général l'échantillon est à repasser 30 fois et si le nombre d'essais est inférieur il faut pouvoir le justifier (coût, durée...).

4.3 Fidélité intermédiaire

Pour cela il faut réaliser plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon ou d'un CIQ en faisant varier les conditions opératoires (opérateur, conditions ambiantes, lots de réactifs,...). L'exploitation des résultats est similaire à la répétabilité

4.4. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude

Pour cette évaluation nous avons à notre disposition le SH GTA 06 « Représentation de la justesse et de l'inexactitude ».

Par définition, la mesure de la justesse a pour but d'évaluer le biais de la méthode.

Pour cela on compare la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon de

contrôle (CIQ), à la valeur cible ou à une valeur vraie quand un matériau de référence certifié (MRC) existe, mais il en existe peu en biologie médicale. La justesse est donc estimée en comparant la moyenne (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire, établie sur le dosage ou la quantification de la charge allélique du CIQ, à la valeur attendue (v).

La valeur cible retenue est

- La moyenne des résultats obtenus avec la même méthode (groupe de pairs)

ou

- La moyenne de l'ensemble des participants si le seuil de décision pour le paramètre sont standardisés (HAS, consensus)

$$\text{Biais(\%)} = ((m-v)/ v)*100$$

En l'absence de CIQ externalisés, on établit l'inexactitude de la méthode.

- L'évaluation de l'exactitude correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage ou de la quantification de la charge allélique, d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle. L'écart observé, correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude)

$$\text{Inexactitude (\%)} = ((x-v)/ v)*100$$

Avec x = valeur trouvée pour un échantillon EEQ

et v = valeur cible obtenue par les pairs

Le biais et l'inexactitude expérimentaux seront comparés aux limites acceptables préalablement fixées (recommandations SFBC ou Ricos)

4.5 Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est un indicateur de la qualité et de la fiabilité d'un résultat. Elle constitue une aide pour l'interprétation des résultats et une aide pour le clinicien dans sa prise de décision diagnostique ou thérapeutique.

Pour évaluer celle-ci nous avons à notre disposition le GTA 14 « Guide des techniques d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale ». Cependant, la norme précise que l'incertitude des résultats doit être déterminée dans le cas où cela est « possible et pertinent ».

Toutefois quand cela est possible, il est recommandé d'utiliser la méthode CIQ/EEQ. Cette méthode se décompose de la façon suivante :

- Calcul de l'incertitude u_2 (CIQ) liée à la fidélité intermédiaire, à partir des résultats des CIQ.
- Calcul de l'incertitude v_2 (EEQ), liée à la justesse, à partir des résultats des EEQ.
- Calcul de l'incertitude type $u(C)$, la résultante des 2 incertitudes précédentes calculées.

$$u(c) = \sqrt{u_2^2(CIQ) + v_2^2(EEQ)}$$

- Calcul de l'incertitude élargie $U(c)$ après application d'un facteur d'élargissement k égal à 2 permettant un intervalle de confiance pour l'incertitude finale d'au moins 95%.

$$U(c) = 2 * u(c)$$

Une fois l'incertitude estimée, les résultats doivent être comparés aux limites acceptables définies par le laboratoire.

4.6 Evaluation des interférences et des contaminations

Les interférences et les contaminations peuvent affecter les résultats des échantillons à analyser : présence d'inhibiteur de PCR dans l'éluat d'ADN, contamination inter-échantillons ou inter-réactifs.

4.7. Robustesse

Pour évaluer la robustesse d'une méthode, le laboratoire doit prendre en compte l'ensemble des paramètres pouvant varier dans le laboratoire et vérifier que les résultats n'en sont pas affectés. (ex température d'incubation, opérateur...).

C'est pourquoi il est important pour les techniques manuelles ou semi-manuelles et si l'effet opérateur est considéré comme significatif, de réaliser au moment de la validation de méthode et de façon régulière, des essais inter-opérateurs.

4.8. Vérification des intervalles de référence biologique (valeurs usuelles)

Les intervalles de références sont définies et documentées par le laboratoire à partir des données fournisseurs, de celles des sociétés savantes, des recommandations de l'HAS. Elles sont fonctions de l'âge, du sexe... et sont définies par l'étude d'une population de sujets sains.

4.9. Limite de quantification et de linéarité

Chaque technique possède une limite de quantification et de linéarité, celles-ci doivent être définies par le fabricant. Dans le cas contraire et quand cela est pertinent, le laboratoire doit les étudier.

4.10 Sensibilité et spécificité diagnostique

La sensibilité et la spécificité diagnostique sont les critères de performances les plus importants pour une analyse. En effet, Ces termes définissent la capacité d'un examen de biologie à établir le diagnostic d'une pathologie.

La sensibilité et la spécificité représentent respectivement le pourcentage de vrais positifs parmi une population de patients présentant la pathologie et les vrais négatifs parmi une population témoin.

Sensibilité = ((Nombre de vrai positif / (Nombre de vrai positif + le nombre de faux négatif))

Spécificité= ((Nombre de vrai négatif / (Nombre de vrai négatif + le nombre de faux positif))

Concernant les recherches de mutations par NGS dans les NMP, l'analyse de la littérature permet lors de la validation biologique de rendre les mutations les plus pertinentes pour la prise en charge des NMPs, c'est-à-dire les mutations non retrouvées dans la population générale et trouvées dans les NMP

5. Vérifications expérimentales du NGS

5.1. Le CIQ

Pour le NGS, le laboratoire utilise un CIQ commercial contenant un mélange d'ADN de lignées cellulaires mutées dans des gènes de notre panel.

5.2. La répétabilité

Dans le cas du NGS les réactifs sont très coûteux et les cartouches de séquençage ne nous permettent de réaliser que 20 tests par run. Pour étudier ce paramètre il nous faudra réaliser une manip en répétant 10 fois le CIQ pur et 10 fois le CIQ dilué pour avoir des fréquences alléliques différentes.

5.3. Fidélité intermédiaire

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus après mélange de 2 CIQ de la société horizon diagnostics Truq-Q blend 1 et Truq-Q blend 2, sur 11 séries différentes

Mutation	Nbr de Valeur	Moyenne (%)	Ecart-type	CV (%)	CV fournisseur (%)	CV limite du laboratoire (%)	Conclusion
JAK2 c.1849G>T, p.V617F	11	2,7	0,4	16.73	Non fournis	50	Conforme
TET2 c.3985C>A	11	20,2	0,7	3.39	Non fournis	25	Conforme

Mutation	Nbr de Valeur	Moyenne (%)	Ecart-type	CV (%)	CV fournisseur (%)	CV limite du laboratoire (%)	Conclusion
p.L1329M							
TET2 c.2033G>A p.G678D	11	5,0	0,5	9.04	Non fournis	50	Conforme
TET2 c.5942A>G p.D1981G	11	4,4	1,6	35.94	Non fournis	50	Conforme
ASXL1 c.3745A>G p.M1249V	11	23,3	1,4	6.20	Non fournis	25	Conforme
EZH2 c.1184delG p.G395Efs*29	11	16,1	0,5	3.28	Non fournis	25	Conforme
EZH2 c.505G>A p.E169K	11	3,6	0,4	10.83	Non fournis	50	Conforme
IDH1 c.394C>T p.R132C	11	3,3	0,6	17.72	Non fournis	50	Conforme
CSF3R c.1918A>G, p.T640A	11	20,1	0,9	4.33	Non fournis	25	Conforme
CSF3R c.2051A>G p.Q684R	11	3,1	0,4	12.32	Non fournis	50	Conforme
NRAS c.182A>T p.Q61L	11	5,0	1,4	27.93	Non fournis	50	Conforme
NRAS c.181C>A p.Q61K	11	5,4	1,2	22.50	Non fournis	50	Conforme
NFE2 c.661delG p.E221Rfs*13	11	25,9	0,7	2.53	Non fournis	25	Conforme
KRAS c.38G>A p.G13D	11	25,9	1,9	7.24	Non fournis	25	Conforme
KRAS c.34G>C p.G12R	11	2,3	0,9	37.29	Non fournis	50	Conforme
KRAS c.35G>C p.G12A	11	2,3	0,3	14.68	Non fournis	50	Conforme
SETBP1 c.2213delC p.P738Hfs*46	11	18,6	0,6	3.02	Non fournis	25	Conforme
IKZF1 c.202G>A p.G68R	11	16,5	1,0	5.96	Non fournis	25	Conforme

En se basant sur les publications de Flandrin (ref : Flandrin 2015 ABC), le laboratoire a fixé un CV limite de 50% pour les pourcentages d'allèles mutés <10% et CV limite de 25% pour les pourcentages d'allèles mutés >10%.

La fidélité intermédiaire obtenue avec le CIQ horizon, est conforme aux limites acceptables définies par le laboratoire (Cf Annexe 1).

5.4. Evaluation de la justesse ou de l'inexactitude

A ce jour, le laboratoire étudie l'exactitude de la méthode grâce à des EEQ de l'association GBMHM. (Cf. Annexe 2).

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus par notre laboratoire pour l'échantillon d'EEQ du GBMHM d'avril 2017.

Mutation	Valeur du laboratoire (%)	Valeur attendue (%)	Inexactitude (%)	Inexactitude limite du laboratoire (%)	Conclusion
TET2 c.3973_3995dupCATTG CAAAACCTGTCCACTCT	14	11	27.27	50	Conforme
TET2 c.4079T>C	15	15	0	50	Conforme
DNMT3A c.2645G>A	46	45	2.22	50	Conforme
EZH2 c.1638T>G	16	16	0	50	Conforme
NRAS c.35G>A	46	45	2.22	50	Conforme
TP53 c.524G>A	21	22	-4.55	50	Conforme
ASXL1 c.1934dupG	0	13	-100	50	Non conforme
ASXL1 c.2269C>T	29	30	-3.33	50	Conforme
TET2 c.762_765delTCAG	19	16	18.75	50	Conforme
TET2 c.4133G>T	17	17	0	50	Conforme
IDH1 c.394C>T	17	16	6.25	50	Conforme
IDH2 c.419G>A	14	15	6.67	50	Conforme

Les limites du laboratoire suivent les recommandations de Barosi (Réf : Barosi 2013 critères réponse PV ET ELN)

Conclusion : les résultats de cet échantillon d'EEQ sont conformes sauf pour la recherche de la mutation ASXL1 c.1934dupG

En effet, cette région homopolymérique (8 G) est sujette à un artéfact de séquençage qui se traduit par l'insertion et la délétion d'un G de manière systématique (donc pour tous les échantillons du run).

Pour éviter les faux négatifs, l'algorithme de Sophia genetics a été mis à jour et les patients ont été vérifiés pour ce variant, aucun changement n'a été constaté.

Le repassage de cet EEQ, montre que cette région comporte plus de bruit de fond que d'habitude, expliquant que dans cette région complexe, l'algorithme n'a pas pu détecter cette duplication.

5.5. Estimation de l'incertitude de mesure

L'incertitude de mesure n'a pu être évaluée car un seul échantillon d'EEQ a été analysé.

5.6. Evaluation des interférences et des contaminations

Pour maîtriser ce risque, une étude de contamination a été réalisée au moment de la validation initiale en réalisant un blanc suivant tout le parcours de l'échantillon. Celui-ci est répété de façon régulière et à intervalle prédéfini. De plus, un contrôle d'amplification du CIQ est réalisé en systématique sur gel d'agarose.

5.7. Robustesse

Dans le cas du NGS, le laboratoire évalue la robustesse de la méthode par le passage régulier du CIQ et son suivi à long terme.

5.8. Vérification des intervalles de référence biologique

En génétique somatique, il n'existe pas d'intervalle de référence, la présence d'une mutation d'intérêt dans le cadre des NMP, induit automatiquement la surveillance et le suivi du patient.

5.9. Intervalle de mesure et limite de détection

Les résultats de NGS sont exprimés en% d'allèles mutés qui est calculé ainsi par le logiciel d'analyse :

$$\% \text{ d'allèles mutés} = \text{nombre de reads mutés} * 100 / \text{nombre total de reads.}$$

L'intervalle de mesure est donc théoriquement de 0 à 100%.

En principe, la limite de détection correspond au plus petit % d'allèles mutés donnant un signal différent de 0.

Dans les analyses de NGS par technique Amplicon, le calcul de la limite de détection est difficile à vérifier expérimentalement pour plusieurs raisons :

- La mesure d'un « blanc », avec un échantillon d'eau par exemple, ne donnera aucun signal exploitable.
- La mesure d'un « blanc », avec un échantillon de sang de sujet sain par exemple, montrera forcément des mutations cliniquement non significatives, à des % d'allèles mutés très variables, mais réellement présentes.

En pratique, en se basant sur l'expérience acquise et sur les recommandations émises par les groupes de travail spécialisés, il a été décidé au laboratoire que : si le taux d'allèles mutés est supérieur à 5% avec une profondeur supérieure à 50X, le résultat est rendu positif.

Par ailleurs, si le taux d'allèles mutés est inférieur à 5%, le variant est classé comme de faible significativité (« low confidence ») par le logiciel d'analyse.

L'intervalle de mesure est donc de 5% à 100% d'allèles mutés.

6. Comparaison de méthode

Cette comparaison permet de mesurer la corrélation entre 2 méthodes ou 2 équipements qui rendent des résultats similaires sur un même paramètre (miroir, back-up, changement d'automate ou de technique).

Dans le dossier initial de validation, une analyse par comparaison de méthode doit être effectuée sur un nombre suffisant d'échantillons mutés et d'échantillons négatifs. L'analyse des discordances doit être faite le cas échéant.

En amont de la mise en place de la technique de NGS au laboratoire, 60 échantillons contenant des mutants connus ont été envoyés à la société Sophia Genetics pour analyse et validation.

Ensuite la comparaison de la méthode de NGS avec les autres méthodes de recherche ou de quantification de mutations utilisées au laboratoire a été effectuée pour les gènes : JAK2 V617F, JAK2 exon12 et MPL.

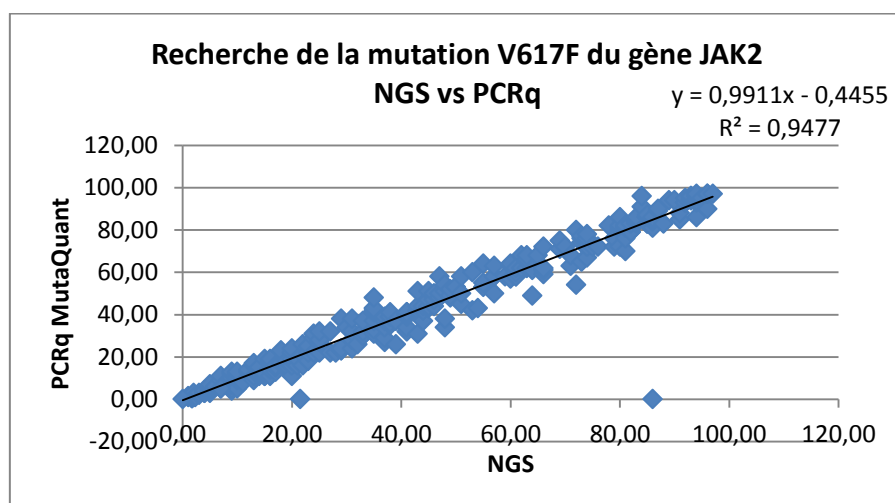
6.1. Comparaison de méthode « Recherche de la mutation JAK2 V617F » **(Cf. Annexe 3)**

Au laboratoire la recherche et la quantification de la mutation V617F du gène JAK2 sont réalisées en PCRq à l'aide du Kit Ipsogen « MutaQuant » marqué CE.

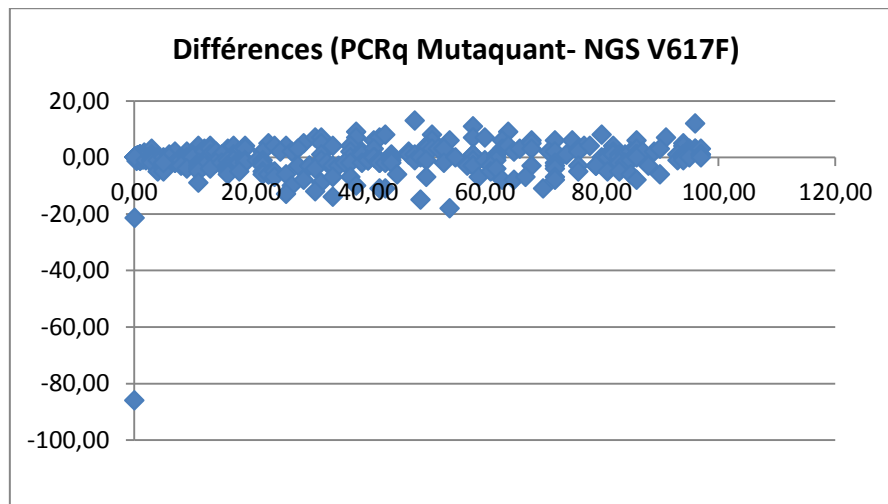
Pour réaliser cette étude nous avons recherché dans la base de données du laboratoire les résultats obtenus sur les échantillons passés à la fois en PCRq et en NGS, soit 472 dossiers

La figure ci-dessous montre les résultats obtenus dans 300 échantillons positifs. L'équation de la droite de régression montre une pente très proche de 1 (0.99) et une ordonnée à l'origine très proche de 0 (0.45). Le coefficient de régression est très proche de 1 ($r^2 = 0.9477$)

Les résultats obtenus par les deux méthodes sont donc statistiquement très bien corrélés.



La graphique ci-dessous montre que la différence des résultats obtenus pour les 300 échantillons positifs n'excède pas les 20% et confirme donc la corrélation des 2 méthodes.



Le tableau ci-dessous montre le nombre de cas d'échantillons pour lesquels les résultats obtenus par chaque méthode sont positifs ou négatifs (appelé tableau de contingence)

	NGS Négatif	NGS Positif	Total
Mutaquant Négatif	172	2	174
Mutaquant Positif	22	276	298
Total	194	278	472

$$\Rightarrow ((172+276) / 472) * 100 = 95\% \text{ de concordance avec les 2 techniques}$$

Comme on peut le voir, 20 échantillons dont la charge allélique est inférieure à 1% avec la technique de référence Mutaquant ne sont pas détectés par le panel NGS prouvant que la sensibilité analytique de la technique NGS est inférieure à celle de la PCRq.

Et inversement 2 échantillons sur 472 ne sont pas détectés avec la technique de référence Mutaquant en PCRq. Ceci est dû à la présence d'une double mutation qui entraîne l'absence d'amplification de l'ADN muté en PCRq.

6.2. Comparaison de méthode sur la recherche de la mutation dans l'exon 12 du gène JAK2 (Cf. Annexe 4)

Au laboratoire la recherche de la mutation dans l'exon 12 du gène JAK2 se fait en 2 étapes. La première étape est une méthode de screening par une technique HRM, la deuxième étape permet la confirmation et l'identification de la mutation présente par séquençage (Sanger)

Pour cette comparaison de méthode, seuls 45 échantillons ont été passés en parallèle avec les 2 techniques, parmi lesquels seuls 4 échantillons sont positifs

Tableau de contingence

	NGS Négatif	NGS Positif	Total
HRM Négatif	41	0	41
HRM Positif	0	4	4
Total	41	4	45

⇒ On observe donc 100% de concordance avec les 2 techniques

Les résultats obtenus sont tous concordants mais vu le faible nombre d'échantillons positifs, il faudra réaliser cette comparaison de méthode sur un plus grand nombre d'échantillons.

6.3. Comparaison de méthode sur la mutation MPL (Cf. Annexe 5)

La recherche de la mutation du gène MPL au laboratoire se fait par discrimination allélique avec le kit Ipsogen MPL W515 L/K Mutascreen, les autres mutations du codon 515 sont identifiées par séquençage Sanger.

Nous avons testé 151 échantillons, dont 16 positifs pour les mutations K, L ou R

Tableau de contingence

	NGS Négatif	NGS Positif	Total
Discrimination allélique Négatif	135	1	136
Discrimination allélique Positif	0	15	15
Total	135	16	151

⇒ 99% de concordance avec les 2 techniques

Une seule discordance est observée, qui s'explique par le fait que l'échantillon possède une mutation sur le codon 505 et non sur le codon 515.

Conclusion

Avant de demander l'accréditation de l'analyse de ce panel de mutation par NGS, le laboratoire devra réaliser un run pour tester la répétabilité et poursuivre les comparaisons de méthode tout en suivant les résultats du CIQ et des EEQ. Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que la technique de NGS présente des performances conformes aux exigences du laboratoire, en ce qui concerne la fidélité intermédiaire et l'exactitude. La méthode NGS donne des résultats globalement comparables aux autres techniques utilisées au laboratoire. Plusieurs limites de la méthode ont été mises en évidence, comme la sensibilité analytique plus faible que la méthode de qPCR pour la mutation JAK2 V617F et la difficulté à détecter la mutation ASXL1 c.1934dupG.

Annexes

Annexe 1 Analyse du CIQ

Annexe 2 Résultat de l'évaluation de l'exactitude par l'association GBMHH

Annexe 3 Données pour la mutation JAK2V617F

Annexe 4 Données pour l'analyse de la mutation dans l'exon 12 du gène JAK2

Annexe 5 Données pour la recherche de la mutation MPL

Annexe 1 Suivi du CIQ

	valeurs cibles en %	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	serie 7	serie 8	serie 9	serie 10	serie 11	moyenne en %	ecart type	cv	Biais(%)
JAK2 c.1849G>T, p.V617F	2,5	2,7	2,4	2,3	2,6	2,3	2,8	2,5	2,7	3,9	2,4	2,7	2,7	0,4	16,73	6,55
TET2 c.3985C>A p.L1329M		21,1	21,1	20	20	20,4	19,6	19,6	20,9	18,9	20,4	20,2	20,2	0,7	3,39	
TET2 c.2033G>A p.G678D		4,9	4	4,5	5,5	5	5,3	5,3	5,6	5	5	5	5,0	0,5	9,04	
TET2 c.5942A>G p.D1981G		4,2	4,9	3,8	4,5	4,9	5,2	5,6	4%	5,4	5,7	4	4,4	1,6	35,94	
ASXL1 c.3745A>G p.M1249V		22,1	21,7	24	23	26,8	22,2	23,4	23,1	23,7	24,1	21,9	23,3	1,4	6,20	
EZH2 c.1184delG p.G395Efs*29		16,3	17	16	16	16	15,4	15	16,1	16,5	16,3	16	16,1	0,5	3,28	
EZH2 c.505G>A p.E169K		4,2	3,1	2,9	3,5	3,4	3,9	3,9	3,7	4	3,5	3,8	3,6	0,4	10,83	
IDH1 c.394C>T p.R132C	2,5	2,4	3,4	3,2	4	3,3	4	3,4	2,5	2,5	3,8	3,3	3,3	0,6	17,72	30,18
CSF3R c.1918A>G, p.T640A		20,9	20,9	20,7	19	19,7	20,4	20	21,6	20	19	19,1	20,1	0,9	4,33	
CSF3R c.2051A>G p.Q684R		3,6	2,6	2,8	3,1	3,5	2,7	3,4	3,2	3,4	2,8	2,6	3,1	0,4	12,32	
NRAS c.182A>T p.Q61L		6,1	7,8	5	5	3,7	3	6,1	5,3	3,4	5,7	4,2	5,0	1,4	27,93	
NRAS c.181C>A p.Q61K	2,5	5,2	6,7	4,7	4,5	4,2	4,8	4,4	6,7	5,7	4,3	7,8	5,4	1,2	22,50	114,55
NFE2 c.661delG p.E221Rfs*13		25,7	26,9	26	26	26	25,2	25,9	25,4	26,9	24,7	25,7	25,9	0,7	2,53	
KRAS c.38G>A p.G13D	25	27,4	27,4	27,5	26	25,8	22,6	27,1	22,2	26,2	25,6	27,3	25,9	1,9	7,24	3,67
KRAS c.34G>C p.G12R	2,5	2,7	3,1	3	2,3	2,7	2%	2,4	2,2	2	3,1	2	2,3	0,9	37,29	-7,20
KRAS c.35G>C p.G12A	2,5	2,5	2,2	2,2	2,3	2	3,2	2,1	2,2	2,2	2	2,5	2,3	0,3	14,68	-7,64
SETBP1 c.2213delC p.P738Hfs*46		19,7	18,8	19	18	18,6	18	19	17,7	18,7	18,8	18,8	18,6	0,6	3,02	
IKZF1 c.202G>A p.G68R		16	16,6	19	17	15,9	15,8	16,4	16,4	17,1	15,3	16	16,5	1,0	5,96	

Annexe 2 Résultat de l'évaluation de l'exactitude par l'association GBMHM



PROGRAMME D'ÉVALUATION EXTERNE DE LA QUALITÉ

ASSOCIATION GBMHM

CERTIFICAT DE PERFORMANCES

3^{ème} Campagne d'EEQ : NGS PANEL MYELOIDE

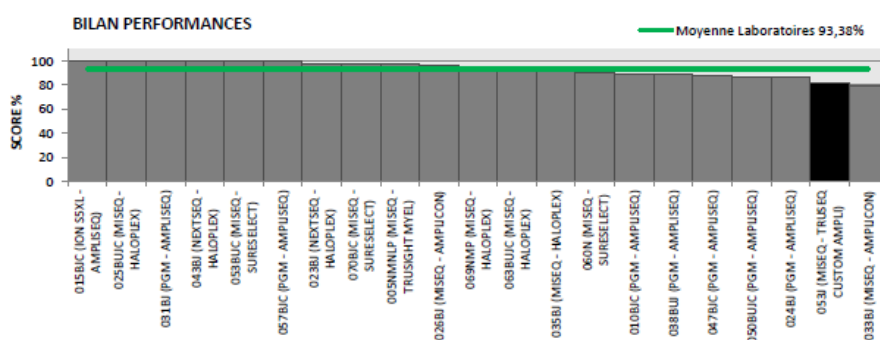
Délivré au:

APHP Hôpital Saint Louis - PARIS
Unité de Biologie Cellulaire

le:

14/04/2017

	Vos Performances EEQ N°3 (%)	Moyennes des Laboratoires (%)
% COUVERTURE	53,33	92,70
POOL A	100,00	97,09
POOL B	90,91	90,39
TOTAL	81,41	93,38



Votre laboratoire apparaît en noir

Carole MAUTE

(Ingénieur d'étude Coordinatrice de la Plateforme d'EEQ du GBMHM)

Compte rendu détaillé de vos performances

Les performances pour l'analyse des gènes du panel myéloïde avec la technologie NGS sont calculées selon 2 critères :

- **La couverture des gènes par le panel (% de couverture) :** le pourcentage de couverture est calculé en comparant les gènes analysés par le laboratoire à ceux indiqués dans l'EEQ (Exemple : (14 gènes Labo/ 15 gènes EEQ) X100 = 93% de couverture).
- **La recherche de mutation (absence ou présence) :** une réponse de référence est attribuée en fonction des résultats des participants. Elle correspond à la réponse donnée par plus de 50% des laboratoires. L'attribution des notes est faite selon le degré de concordance entre la réponse donnée par le laboratoire et la réponse de référence. Les polymorphismes n'interviennent pas dans la notation. Ils sont cependant indiqués dans les résultats pour information.

A chaque résultat, une valeur numérique (0 ; 0,5 ou 1) est attribuée. Cette valeur permettra de calculer le score du laboratoire en %. Les critères d'évaluation des réponses données par les laboratoires sont regroupés dans le tableau suivant:

REPONSE DONNEE PAR PLUS DE 50% DES LABORATOIRES	DIFFERENCE	TRES NETTE DIFFERENCE
1	0,5	0
EXEMPLES		
PRESENCE DE LA MUTATION X	/	NON MUTE
PRESENCE DE LA MUTATION X	/	PRESENCE DE LA MUTATION Y (délétère)
PRESENCE DE LA MUTATION X	/	PRESENCE DE LA MUTATION Z (indéterminée, bénin)
NON MUTE	PRESENCE DE LA MUTATION Z (indéterminée, bénin)	PRESENCE DE LA MUTATION Y (délétère)

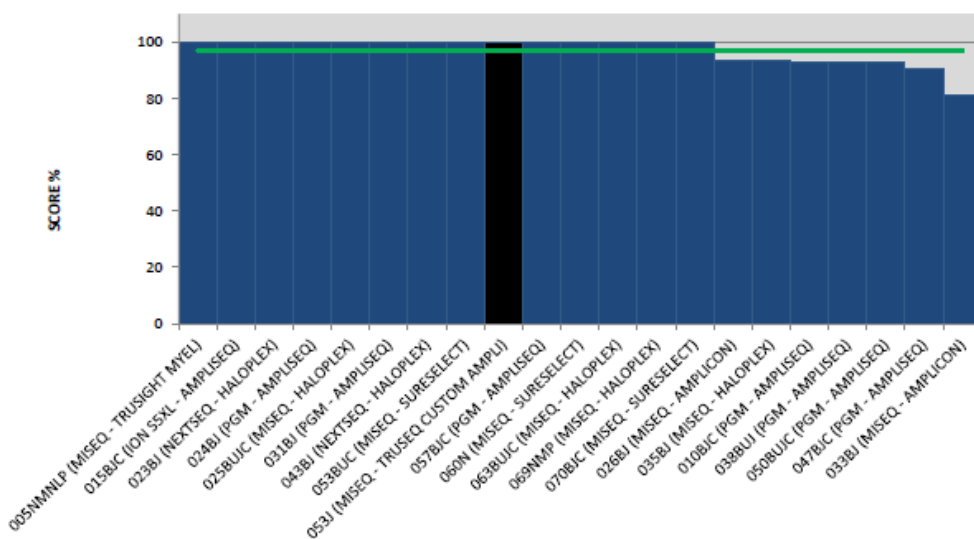
POOLA

- Résultats qualitatifs : absence ou présence de la mutation

GENES	RESULTATS DONNEES PAR PLUS DE 50% DES LABORATOIRES	VOS RESULTATS	NOTE
TP53	NON MUTE	NON MUTE	1
ASXL1	NON MUTE	NON MUTE	1
TET2	c.3973_3995dupCATTGCAAAACCTGTCCACTCT c.4079T>C	c.3973_3995dup c.4079T>C	1 1
DNMT3A	c.2645G>A	c.2645G>A	1
NPM1	c.860_863dupTCTG/c.773_776dupTCTG	NON FAIT	/
RUNX1	NON MUTE	NON FAIT	/
IDH1	NON MUTE	NON MUTE	1
IDH2	NON MUTE	NON MUTE	1
EZH2	c.1638T>G	c.1638T>G	1
CEBPA	NON MUTE	NON FAIT	/
NRAS	c.35G>A	c.35G>A	1
KRAS	NON MUTE	NON MUTE	1
KIT	NON MUTE	NON FAIT	/
ETV6	NON MUTE	NON FAIT	/
WT1	NON MUTE	NON FAIT	/
SCORE POOL A (%)			100,00

SCORE POOL A

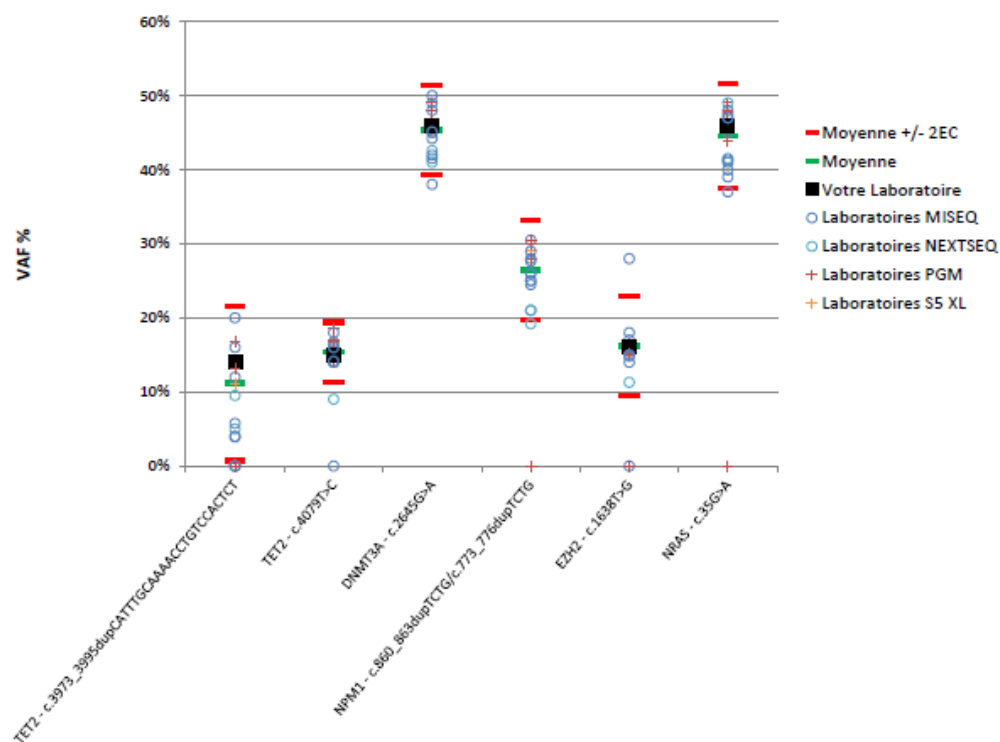
MOYENNE DES LABORATOIRES 97,09%



▪ Résultats quantitatifs : fréquence allélique (%)

GENES	MUTATIONS	MOYENNE VAF%	VOS VAF %	ECART TYPE VAF%
TP53	NON MUTE	/	/	/
ASXL1	NON MUTE	/	/	/
TET2	c.3973_3995dupCATTGCAAAACCTGTCCACTCT	11%	14,00%	5%
	c.4079T>C	15%	15%	2%
DNMT3A	c.2645G>A	45%	46%	3%
NPM1	c.860_863dupTCTG/c.773_776dupTCTG	26%	NON FAIT	3%
RUNX1	NON MUTE	/	/	/
IDH1	NON MUTE	/	/	/
IDH2	NON MUTE	/	/	/
EZH2	c.1638T>G	16%	16%	3%
CEBPA	NON MUTE	/	/	/
NRAS	c.35G>A	45%	46%	4%
KRAS	NON MUTE	/	/	/
KIT	NON MUTE	/	/	/
ETV6	NON MUTE	/	/	/
WT1	NON MUTE	/	/	/

VAF en fonction des séquenceurs

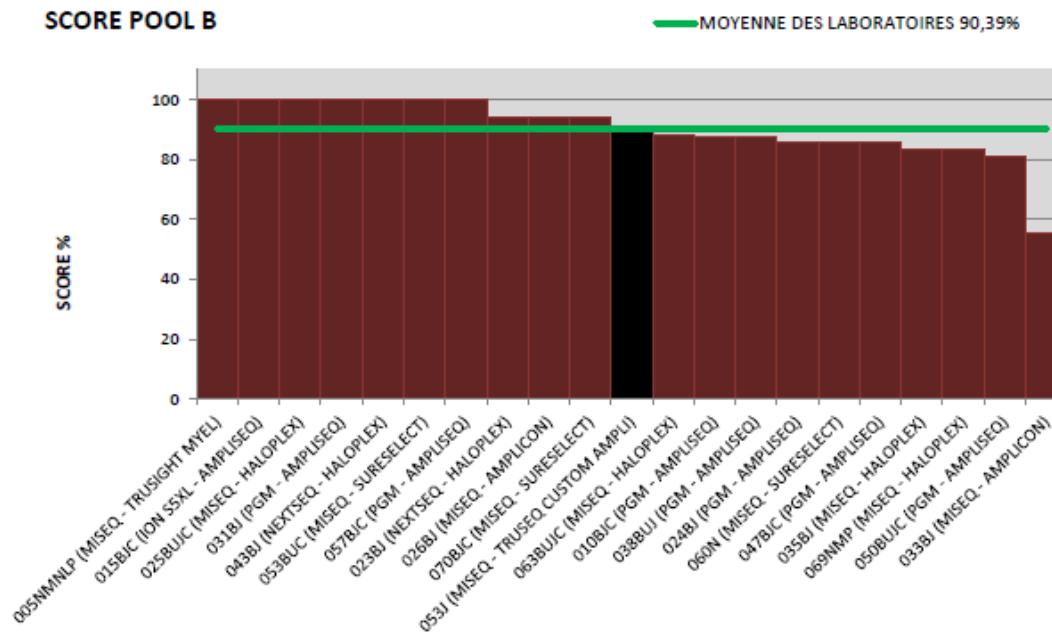


POOL B

- Résultats qualitatifs : absence ou présence de la mutation

GENES	RESULTATS DONNEES PAR PLUS DE 50% DES LABORATOIRES	VOS RESULTATS	NOTE
TP53	c.524G>A	c.524G>A	1
ASXL1	c.1934dupG	NON MUTE	0
	c.2269C>T	c.2269C>T	1
TET2	c.762_765delTCAG	c.762_765delTCAG	1
	c.4133G>T	c.4133G>T	1
DNMT3A	NON MUTE	NON MUTE	1
NPM1	NON MUTE	NON FAIT	/
RUNX1	c.209_212delTCCT	NON FAIT	/
	c.1228_1229delAC	NON FAIT	/
IDH1	c.394C>T	c.394C>T	1
IDH2	c.419 G>A	c.419G>A	1
EZH2	NON MUTE	NON MUTE	1
CEBPA	NON MUTE	NON FAIT	/
NRAS	NON MUTE	NON MUTE	1
KRAS	NON MUTE	NON MUTE	1
KIT	NON MUTE	NON FAIT	/
ETV6	c.145C>T	NON FAIT	/
WT1	NON MUTE	NON FAIT	/
SCORE POOL B (%)			90,91

SCORE POOL B



14/04/2017

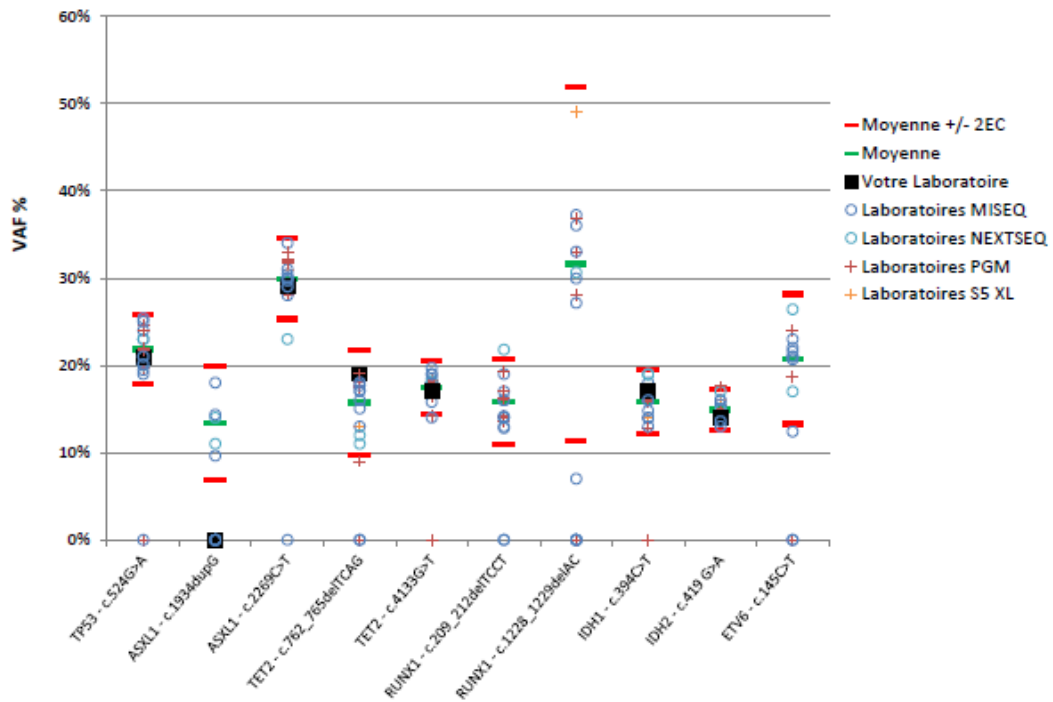
7

EEQ NGS PANEL MYELOIDE N°3

▪ Résultats quantitatifs : fréquence allélique (%)

GENES	MUTATIONS	MOYENNE VAF%	VOS VAF %	ECART TYPE
TP53	c.524G>A	22%	21%	2%
ASXL1	c.1934dupG	13%	NON TROUVE	3%
	c.2269C>T	30%	29%	2%
TET2	c.762_765delTCAG	16%	19%	3%
	c.4133G>T	17%	17%	2%
DNMT3A	NON MUTE	/	/	/
NPM1	NON MUTE	/	/	/
RUNX1	c.209_212delTCCT	16%	NON FAIT	2%
	c.1228_1229delAAC	32%	NON FAIT	10%
IDH1	c.394C>T	16%	17%	2%
IDH2	c.419 G>A	15%	14%	1%
EZH2	NON MUTE	/	/	/
CEBPA	NON MUTE	/	/	/
NRAS	NON MUTE	/	/	/
KRAS	NON MUTE	/	/	/
KIT	NON MUTE	/	/	/
ETV6	c.145C>T	21%	NON FAIT	4%
WT1	NON MUTE	/	/	/

VAF en fonction des séquenceurs



Résultats de l'ensemble des laboratoires (votre laboratoire apparaît en gras dans le tableau)

GENES	MUTATIONS	LABORATOIRES																				
		005NMNLP (MISEQ - TRUSIGHT MYELO)	010BIC (PGM - AMPLISEQ)	015BIC (ION S5XL - AMPLISEQ)	025BINMP (NEXTSEQ - HALOPLEX)	026BINM (PGM - AMPLISEQ)	025BUCNMNP (MISEQ - HALOPLEX)	026BINMP (MISEQ - AMPLICON)	031BINMP (PGM - AMPLISEQ)	033BINMNP (MISEQ - AMPLICON)	035BINMP (MISEQ - HALOPLEX)	038BUJ (PGM - AMPLISEQ)	043BINMNP (NEXTSEQ - HALOPLEX)	047BIC (PGM - AMPLISEQ)	050BUCNMNP (PGM - AMPLISEQ)	053BUCNM (MISEQ - SURESELECT)	053INMP (MISEQ - TRUSEQ CUSTOM AMPLI)	057BIC (PGM - AMPLISEQ)	060N (MISEQ - SURESELECT)	065BUCNM (MISEQ - HALOPLEX)	069NMP (MISEQ - HALOPLEX)	075BUCNMNP (MISEQ - SURESELECT)
TP53	c.524G>A	23%	NM*	21%	23%	20%	21%	25%	22%	NM	24%	21%	20%	24%	25%	19%	21%	22%	19%	21%	25%	20%
	c.711G>A		17%																			
	c.215C>G (Polymorphisme)		68%																	68%		
ASXL1	c.1934dupG	18,0%	NC	5***	14,0%	5	9,7%	NM	5	NM	NM	NM	11,0%	NM	NM	14,4%	NM	5	NM	NM	NM	NM
	c.2269C>T c.3759T>C	34,0%	33,0%	31,0%	29,0%	32,1%	31,0%	30,4%	28,0%	NM	30,0%	29,0%	23,0%	32,0%	29,0%	28,0%	29,0%	31,8%	29,0%	30,0%	30,0%	29,7%
TET2	c.762_765delTCAG	16,0%	17,5%	13,0%	11,0%	NM	13,0%	17,0%	9,0%	NM	NM	17,6%	12,0%	18,0%	17,4%	17,2%	19,0%	19,0%	NF*	17,7%	18,0%	15,0%
	c.4133G>T	18,0%	16,5%	17,0%	18,0%	18,1%	15,8%	18,5%	18,0%	18,0%	17,0%	18,3%	18,2%	NA	NM	19,7%	17,0%	14,3%	NF	19,0%	19,0%	14,0%
DNMT3A	NON MUTE	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
	c.1266G>A (Polymorphisme)		19%																	19%		
NPM1	NON MUTE	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM
	c.209_212delTCCT c.1228_1229delTAC	16,0%	16,0%	17,0%	14,0%	14,2%	16,0%	17,0%	17,0%	NM	19,0%	13,5%	21,8%	14,0%	16,2%	12,8%	NF	19,3%	NM	13,0%	14,0%	14,2%
RUNX1	c.209_212delTCCT c.1228_1229delTAC	36,0%	NM	49,0%	NM	28,1%	7,0%	37,2%	33,0%	NM	NM	NM	30,6%	NM	NM	29,9%	NF	36,9%	33,0%	NM	NM	27,1%
	c.394C>T	18,0%	16,5%	14,0%	19,0%	15,8%	14,0%	17,1%	16,0%	NM	16,0%	16,5%	18,9%	NA	16,2%	14,0%	17,0%	12,8%	NF	13,0%	16,0%	14,8%
IDH1	c.419 G>A	16,0%	15,5%	16,0%	17,0%	13,8%	14,0%	15,5%	15,0%	15,0%	15,0%	14,7%	14,9%	14,0%	14,8%	13,6%	14,0%	17,6%	NF	13,0%	16,0%	13,6%
	NON MUTE	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
EZH2	c.1852-21 T>C (Polymorphisme)		NF									NF			NF							
	NON MUTE		NF									NF			NF					85,0%		
CEBPA	NON MUTE	NF	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM
	NON MUTE	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
NRAS	NON MUTE	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
	c.483G>A Polymorphisme																			100%		
KIT	NON MUTE	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM
	c.145C>T	22%	NF	NC	17%	NM	21%	22%	24%	NM	21%	NF	26%	NF	NF	21%	NF	19%	23%	NF	NM	12%
WT1	NON MUTE	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NF	NM	NM	NM	NM	NM
	SCORE POOL B (%)	100,00	87,50	100,00	94,44	85,71	100,00	94,44	100,00	55,56	83,33	87,50	100,00	85,71	81,25	100,00	90,91	100,00	85,71	88,24	83,33	94,44

*NM : NON MUTE
**NF : NON FAIT
***S : SANGER

Bilan des résultats du POOL B

GENES	NOMBRE DE LABORATOIRES QUI ANALYSENT LE GENE	MUTATIONS	MOYENNE VAF POUR LES MUTATIONS DETECTEES (%)	NOMBRE DE LABORATOIRES QUI DETECTENT LA MUTATION	CV (%) VAF
TP53	21	c.524G>A	22%	19	9%
		c.711G>A	17%	1	/
		c.215C>G (Polymorphisme)	68%	2	0%
ASXL1	21	c.1934dupG	13%	10	24%
		c.2269C>T	30%	20	8%
		c.3759T>C	36%	1	/
TET2	20	c.762_765delTCAG	16%	17	19%
		c.4133G>T	17%	18	9%
DNMT3A	21	NON MUTE	/	/	/
		c.1266G>A (Polymorphisme)	19%	2	4%
NPM1	19	NON MUTE	/	/	/
RUNX1	20	c.209_212delTCCT	16%	18	15%
		c.1228_1229delAC	32%	11	32%
IDH1	21	c.394C>T	16%	18	12%
IDH2	19	c.419 G>A	15%	20	8%
EZH2	18	NON MUTE	/	/	/
		c.1852-21 T>C (Polymorphisme)	85%	1	/
CEBPA	17	NON MUTE	/	/	/
NRAS	21	NON MUTE	/	/	/
KRAS	21	NON MUTE	/	/	/
		c.483G>A Polymorphisme	100%	1	/
KIT	19	NON MUTE	/	/	/
ETV6	15	c.145C>T	21%	12	18%
WT1	19	NON MUTE	/	/	/

14/04/2017

10

Annexe 3 Données pour la mutation JAK2V617F

Comparaison des techniques de qPCR (Mutaquant) et de NGS

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00
13	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,00
22	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00
31	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,00
33	0,00	0,00	0,00
34	0,00	0,00	0,00
35	0,00	0,00	0,00
36	0,00	0,00	0,00
37	0,00	0,00	0,00
38	0,00	0,00	0,00
39	0,00	0,00	0,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
40	0,00	0,00	0,00
41	0,00	0,00	0,00
42	0,00	0,00	0,00
43	0,00	0,00	0,00
44	0,00	0,00	0,00
45	0,00	0,00	0,00
46	0,00	0,00	0,00
47	0,00	0,00	0,00
48	0,00	0,00	0,00
49	0,00	0,00	0,00
50	0,00	0,00	0,00
51	0,00	0,00	0,00
52	0,00	0,00	0,00
53	0,00	0,00	0,00
54	0,00	0,00	0,00
55	0,00	0,00	0,00
56	0,00	0,00	0,00
57	0,00	0,00	0,00
58	0,00	0,00	0,00
59	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00
61	0,00	0,00	0,00
62	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,00	0,00
64	0,00	0,00	0,00
65	0,00	0,00	0,00
66	0,00	0,00	0,00
67	0,00	0,00	0,00
68	0,00	0,00	0,00
69	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00
71	0,00	0,00	0,00
72	0,00	0,00	0,00
73	0,00	0,00	0,00
74	0,00	0,00	0,00
75	0,00	0,00	0,00
76	0,00	0,00	0,00
77	0,00	0,00	0,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
78	0,00	0,00	0,00
79	0,00	0,00	0,00
80	0,00	0,00	0,00
81	0,00	0,00	0,00
82	0,00	0,00	0,00
83	0,00	0,00	0,00
84	0,00	0,00	0,00
85	0,00	0,00	0,00
86	0,00	0,00	0,00
87	0,00	0,00	0,00
88	0,00	0,00	0,00
89	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	0,00
91	0,00	0,00	0,00
92	0,00	0,00	0,00
93	0,00	0,00	0,00
94	0,00	0,00	0,00
95	0,00	0,00	0,00
96	0,00	0,00	0,00
97	0,00	0,00	0,00
98	0,00	0,00	0,00
99	0,00	0,00	0,00
100	0,00	0,00	0,00
101	0,00	0,00	0,00
102	0,00	0,00	0,00
103	0,00	0,00	0,00
104	0,00	0,00	0,00
105	0,00	0,00	0,00
106	0,00	0,00	0,00
107	0,00	0,00	0,00
108	0,00	0,00	0,00
109	0,00	0,00	0,00
110	0,00	0,00	0,00
111	0,00	0,00	0,00
112	0,00	0,00	0,00
113	0,00	0,00	0,00
114	0,00	0,00	0,00
115	0,00	0,00	0,00
116	0,00	0,00	0,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
117	0,00	0,00	0,00
118	0,00	0,00	0,00
119	0,00	0,00	0,00
120	0,00	0,00	0,00
121	0,00	0,00	0,00
122	0,00	0,00	0,00
123	0,00	0,00	0,00
124	0,00	0,00	0,00
125	0,00	0,00	0,00
126	0,00	0,00	0,00
127	0,00	0,00	0,00
128	0,00	0,00	0,00
129	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00
131	0,00	0,00	0,00
132	0,00	0,00	0,00
133	0,00	0,00	0,00
134	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00
136	0,00	0,00	0,00
137	0,00	0,00	0,00
138	0,00	0,00	0,00
139	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00
141	0,00	0,00	0,00
142	0,00	0,00	0,00
143	0,00	0,00	0,00
144	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00
146	0,00	0,00	0,00
147	0,00	0,00	0,00
148	0,00	0,00	0,00
149	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00
151	0,00	0,00	0,00
152	0,00	0,00	0,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
153	0,00	0,00	0,00
154	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00
156	0,00	0,00	0,00
157	0,00	0,00	0,00
158	0,00	0,00	0,00
159	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00
161	0,00	0,00	0,00
162	0,00	0,00	0,00
163	0,00	0,00	0,00
164	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00
166	0,00	0,00	0,00
167	0,00	0,00	0,00
168	0,00	0,00	0,00
169	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00
171	0,00	0,00	0,00
172	0,00	0,00	0,00
173	0,00	0,10	0,10
174	0,00	0,10	0,10
175	0,00	0,10	0,10
176	0,00	0,10	0,10
177	0,00	0,10	0,10
178	0,00	0,10	0,10
179	0,00	0,20	0,20
180	0,00	0,20	0,20
181	0,00	0,20	0,20
182	0,00	0,20	0,20
183	0,00	0,40	0,40
184	0,00	0,40	0,40
185	0,00	0,50	0,50
186	0,00	0,60	0,60
187	0,00	0,70	0,70
188	0,00	0,90	0,90

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
189	0,00	1,00	1,00
190	0,00	1,00	1,00
191	0,00	1,00	1,00
192	0,00	1,70	1,70
193	0,00	3,00	3,00
194	1,00	1,00	0,00
195	1,00	1,40	0,40
196	1,60	0,80	-0,80
197	1,70	0,40	-1,30
198	1,80	1,60	-0,20
199	2,00	1,00	-1,00
200	2,00	2,00	0,00
201	2,00	2,00	0,00
202	2,00	2,00	0,00
203	2,00	3,00	1,00
204	2,30	1,00	-1,30
205	2,30	1,50	-0,80
206	0,00	0,10	0,10
207	3,00	2,00	-1,00
208	3,00	3,00	0,00
209	4,00	3,00	-1,00
210	4,00	3,00	-1,00
211	4,00	4,00	0,00
212	4,00	4,00	0,00
213	5,00	3,00	-2,00
214	5,00	4,00	-1,00
215	5,00	5,00	0,00
216	5,00	6,00	1,00
217	5,00	7,00	2,00
218	6,00	6,00	0,00
219	6,00	6,00	0,00
220	7,00	5,00	-2,00
221	7,00	9,00	2,00
222	7,00	11,00	4,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
223	8,00	8,00	0,00
224	9,00	4,00	-5,00
225	9,00	5,00	-4,00
226	9,00	7,00	-2,00
227	9,00	7,00	-2,00
228	9,00	8,00	-1,00
229	9,00	9,00	0,00
230	9,00	10,00	1,00
231	9,00	12,00	3,00
232	9,00	13,00	4,00
233	10,00	5,00	-5,00
234	10,00	9,00	-1,00
235	10,00	10,00	0,00
236	10,00	12,00	2,00
237	10,00	13,00	3,00
238	11,00	8,00	-3,00
239	12,00	13,00	1,00
240	12,00	14,00	2,00
241	13,00	9,00	-4,00
242	13,00	11,00	-2,00
243	13,00	16,00	3,00
244	13,00	17,00	4,00
245	14,00	11,00	-3,00
246	14,00	12,00	-2,00
247	14,00	12,00	-2,00
248	14,00	15,00	1,00
249	15,00	11,00	-4,00
250	15,00	11,00	-4,00
251	15,00	12,00	-3,00
252	15,00	19,00	4,00
253	16,00	11,00	-5,00
254	16,00	14,00	-2,00
255	16,00	17,00	1,00
256	16,00	18,00	2,00
257	16,00	19,00	3,00
258	17,00	13,00	-4,00
259	17,00	15,00	-2,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
260	17,00	16,00	-1,00
261	18,00	17,00	-1,00
262	18,00	17,00	-1,00
263	18,00	23,00	5,00
264	19,00	16,00	-3,00
265	19,00	16,00	-3,00
266	19,00	18,00	-1,00
267	20,00	11,00	-9,00
268	20,00	16,00	-4,00
269	20,00	18,00	-2,00
270	20,00	19,00	-1,00
271	20,00	22,00	2,00
272	20,00	24,00	4,00
273	21,00	16,00	-5,00
274	21,00	19,00	-2,00
275	21,50	0,10	-21,40
276	22,00	16,00	-6,00
277	22,00	21,00	-1,00
278	22,00	26,00	4,00
279	23,00	18,00	-5,00
280	23,00	22,00	-1,00
281	23,00	25,00	2,00
282	24,00	22,00	-2,00
283	24,00	29,00	5,00
284	24,00	31,00	7,00
285	25,00	22,00	-3,00
286	25,00	27,00	2,00
287	25,00	28,00	3,00
288	25,00	32,00	7,00
289	27,00	22,00	-5,00
290	27,00	32,00	5,00
291	28,00	22,00	-6,00
292	29,00	23,00	-6,00
293	29,00	23,00	-6,00
294	29,00	24,00	-5,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
295	29,00	38,00	9,00
296	30,00	34,00	4,00
297	31,00	24,00	-7,00
298	31,00	28,00	-3,00
299	31,00	32,00	1,00
300	31,00	38,00	7,00
301	32,00	26,00	-6,00
302	33,00	30,00	-3,00
303	33,00	30,00	-3,00
304	33,00	32,00	-1,00
305	33,00	37,00	4,00
306	35,00	31,00	-4,00
307	35,00	33,00	-2,00
308	35,00	37,00	2,00
309	35,00	41,00	6,00
310	35,00	42,00	7,00
311	35,00	43,00	8,00
312	35,00	48,00	13,00
313	37,00	27,00	-10,00
314	37,00	29,00	-8,00
315	37,00	34,00	-3,00
316	37,00	37,00	0,00
317	37,00	39,00	2,00
318	38,00	35,00	-3,00
319	38,00	36,00	-2,00
320	38,00	39,00	1,00
321	38,00	41,00	3,00
322	7,00	5,00	-2,00
323	39,00	26,00	-13,00
324	39,00	37,00	-2,00
325	41,00	32,00	-9,00
326	41,00	34,00	-7,00
327	41,00	39,00	-2,00
328	41,00	40,00	-1,00
329	41,00	40,00	-1,00
330	41,00	40,00	-1,00
331	41,00	41,00	0,00
332	41,00	41,00	0,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
333	43,00	31,00	-12,00
334	43,00	42,00	-1,00
335	43,00	42,00	-1,00
336	43,00	44,00	1,00
337	43,00	51,00	8,00
338	44,00	37,00	-7,00
339	44,00	42,00	-2,00
340	44,00	42,00	-2,00
341	44,00	44,00	0,00
342	45,00	43,00	-2,00
343	45,00	44,00	-1,00
344	45,00	47,00	2,00
345	45,00	51,00	6,00
346	46,00	44,00	-2,00
347	46,00	47,00	1,00
348	46,00	50,00	4,00
349	47,00	48,00	1,00
350	47,00	50,00	3,00
351	47,00	58,00	11,00
352	48,00	34,00	-14,00
353	48,00	38,00	-10,00
354	48,00	51,00	3,00
355	48,00	54,00	6,00
356	49,00	48,00	-1,00
357	49,00	49,00	0,00
358	49,00	52,00	3,00
359	50,00	53,00	3,00
360	50,00	53,00	3,00
361	51,00	45,00	-6,00
362	51,00	50,00	-1,00
363	51,00	58,00	7,00
364	53,00	42,00	-11,00
365	53,00	60,00	7,00
366	54,00	43,00	-11,00
367	55,00	53,00	-2,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
368	55,00	55,00	0,00
369	55,00	64,00	9,00
370	57,00	50,00	-7,00
371	57,00	58,00	1,00
372	57,00	58,00	1,00
373	57,00	63,00	6,00
374	59,00	58,00	-1,00
375	60,00	57,00	-3,00
376	60,00	63,00	3,00
377	60,00	64,00	4,00
378	61,00	58,00	-3,00
379	61,00	58,00	-3,00
380	61,00	60,00	-1,00
381	61,00	62,00	1,00
382	62,00	62,00	0,00
383	62,00	68,00	6,00
384	63,00	62,00	-1,00
385	63,00	65,00	2,00
386	63,00	66,00	3,00
387	63,00	68,00	5,00
388	64,00	49,00	-15,00
389	64,00	61,00	-3,00
390	65,00	68,00	3,00
391	66,00	59,00	-7,00
392	66,00	61,00	-5,00
393	66,00	62,00	-4,00
394	66,00	72,00	6,00
395	69,00	71,00	2,00
396	69,00	75,00	6,00
397	70,00	72,00	2,00
398	71,00	63,00	-8,00
399	71,00	68,00	-3,00
400	72,00	54,00	-18,00
401	72,00	80,00	8,00
402	73,00	65,00	-8,00
403	73,00	74,00	1,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
404	73,00	74,00	1,00
405	73,00	76,00	3,00
406	73,00	77,00	4,00
407	74,00	67,00	-7,00
408	74,00	72,00	-2,00
409	74,00	76,00	2,00
410	74,00	78,00	4,00
411	75,00	72,00	-3,00
412	76,00	72,00	-4,00
413	78,00	82,00	4,00
414	79,00	72,00	-7,00
415	79,00	76,00	-3,00
416	80,00	72,00	-8,00
417	80,00	80,00	0,00
418	80,00	81,00	1,00
419	80,00	82,00	2,00
420	80,00	86,00	6,00
421	81,00	70,00	-11,00
422	81,00	76,00	-5,00
423	81,00	81,00	0,00
424	81,00	82,00	1,00
425	81,00	82,00	1,00
426	82,00	79,00	-3,00
427	82,00	79,00	-3,00
428	82,00	83,00	1,00
429	83,00	83,00	0,00
430	83,00	84,00	1,00
431	83,00	85,00	2,00
432	83,00	86,00	3,00
433	84,00	91,00	7,00
434	84,00	96,00	12,00
435	85,00	83,00	-2,00
436	85,00	83,00	-2,00
437	85,00	86,00	1,00
438	85,00	86,00	1,00

Echantillon	NGS V617F	Mutaquant	Différence
439	85,00	86,00	1,00
440	85,00	87,00	2,00
441	86,00	0,00	-86,00
442	86,00	81,00	-5,00
443	86,00	84,00	-2,00
444	86,00	85,00	-1,00
445	86,00	86,00	0,00
446	87,00	89,00	2,00
447	87,00	90,00	3,00
448	88,00	83,00	-5,00
449	89,00	94,00	5,00
450	90,00	94,00	4,00
451	91,00	85,00	-6,00
452	91,00	88,00	-3,00
453	92,00	93,00	1,00
454	92,00	93,00	1,00
455	92,00	95,00	3,00
456	93,00	94,00	1,00
457	93,00	94,00	1,00
458	93,00	95,00	2,00
459	93,00	96,00	3,00
460	93,00	96,00	3,00
461	94,00	86,00	-8,00
462	94,00	93,00	-1,00
463	94,00	94,00	0,00
464	94,00	94,00	0,00
465	94,00	96,00	2,00
466	94,00	97,00	3,00
467	95,00	94,00	-1,00
468	95,00	95,00	0,00
469	96,00	90,00	-6,00
470	96,00	97,00	1,00
471	96,00	97,00	1,00
472	97,00	97,00	0,00

Annexe 4 Données pour l'analyse de la mutation dans l'exon 12 du gène JAK2

Echantillon	NGS	HRM
1	négatif	négatif
2	négatif	négatif
3	négatif	négatif
4	négatif	négatif
5	négatif	négatif
6	négatif	négatif
7	négatif	négatif
8	négatif	négatif
9	négatif	négatif
10	négatif	négatif
11	négatif	négatif
12	négatif	négatif
13	négatif	négatif
14	négatif	négatif
15	négatif	négatif
16	négatif	négatif
17	négatif	négatif
18	négatif	négatif
19	négatif	négatif
20	négatif	négatif
21	négatif	négatif
22	négatif	négatif
23	négatif	négatif
24	négatif	négatif
25	négatif	négatif
26	négatif	négatif
27	négatif	négatif
28	négatif	négatif
29	négatif	négatif
30	positif	positif
31	négatif	négatif
32	négatif	négatif
33	positif	positif
34	négatif	négatif
35	négatif	négatif
36	négatif	négatif
37	négatif	négatif
38	négatif	négatif
39	négatif	négatif
40	négatif	négatif
41	négatif	négatif
42	négatif	négatif
43	positif	positif
44	négatif	négatif
45	positif	positif

Echantillon	NGS	HRM
46	négatif	négatif
47	négatif	négatif
48	négatif	négatif

Annexe 5 Données pour la recherche de la mutation MPL

Echantillon	Discrimination Allélique	NGS
1	NEG	NEG
2	NEG	NEG
3	NEG	NEG
4	NEG	NEG
5	NEG	NEG
6	NEG	NEG
7	NEG	NEG
8	NEG	NEG
9	NEG	NEG
10	NEG	NEG
11	NEG	NEG
12	NEG	NEG
13	NEG	NEG
14	NEG	NEG
15	NEG	NEG
16	NEG	NEG
17	NEG	NEG
18	POS L	POS L
19	NEG	NEG
20	NEG	NEG
21	NEG	NEG
22	NEG	NEG
23	NEG	NEG
24	NEG	NEG
25	NEG	NEG
26	POS K	POS K
27	NEG	NEG
28	NEG	NEG
29	NEG	NEG
30	NEG	NEG
31	NEG	NEG
32	NEG	NEG
33	NEG	NEG
34	NEG	NEG
35	NEG	NEG
36	NEG	NEG
37	NEG	NEG
38	NEG	NEG
39	NEG	NEG
40	NEG	NEG
41	NEG	NEG
42	NEG	NEG
43	NEG	NEG
44	NEG	NEG
45	NEG	NEG

Echantillon	Discrimination Allélique	NGS
46	NEG	NEG
47	NEG	NEG
48	NEG	NEG
49	NEG	NEG
50	NEG	NEG
51	POS L	POS L
52	NEG	NEG
53	NEG	NEG
54	NEG	NEG
55	POS K	POS K
56	NEG	NEG
57	NEG	NEG
58	NEG	NEG
59	NEG	NEG
60	POS L	POS L
61	POS L	POS L
62	NEG	NEG
63	NEG	NEG
64	NEG	NEG
65	NEG	NEG
66	NEG	NEG
67	NEG	NEG
68	NEG	NEG
69	NEG	NEG
70	NEG	NEG
71	NEG	NEG
72	NEG	NEG
73	NEG	NEG
74	NEG	NEG
75	POS R	POS R
76	NEG	NEG
77	NEG	NEG
78	NEG	NEG
79	NEG	NEG
80	NEG	NEG
81	NEG	NEG
82	NEG	NEG
83	NEG	NEG
84	NEG	NEG
85	NEG	NEG
86	NEG	NEG
87	NEG	POS S505N
88	NEG	NEG
89	NEG	NEG
90	NEG	NEG
91	POS L	POS L
92	NEG	NEG
93	NEG	NEG

Echantillon	Discrimination Allélique	NGS
94	NEG	NEG
95	POS K	POS K
96	NEG	NEG
97	NEG	NEG
98	NEG	NEG
99	NEG	NEG
100	NEG	NEG
101	NEG	NEG
102	NEG	NEG
103	POS K	POS K
104	NEG	NEG
105	NEG	NEG
106	NEG	NEG
107	NEG	NEG
108	NEG	NEG
109	NEG	NEG
110	NEG	NEG
111	POS L	POS L
112	NEG	NEG
113	NEG	NEG
114	NEG	NEG
115	NEG	NEG
116	NEG	NEG
117	NEG	NEG
118	NEG	NEG
119	NEG	NEG
120	NEG	NEG
121	NEG	NEG
122	POS K	POS K
123	NEG	NEG
124	NEG	NEG
125	NEG	NEG
126	NEG	NEG
127	NEG	NEG
128	NEG	NEG
129	NEG	NEG
130	NEG	NEG
131	NEG	NEG
132	NEG	NEG
133	NEG	NEG
134	NEG	NEG
135	NEG	NEG
136	NEG	NEG
137	NEG	NEG
138	NEG	NEG
139	POS K	POS K

Echantillon	Discrimination Allélique	NGS
140	NEG	NEG
141	NEG	NEG
142	NEG	NEG
143	POS L	POS L
144	POS L	POS L
145	NEG	NEG
146	NEG	NEG
147	NEG	NEG
148	NEG	NEG
149	NEG	NEG
150	NEG	NEG
151	NEG	NEG

Résumé

L'objectif de ce mémoire est de présenter la démarche d'accréditation d'un panel de NGS (Next Generation Sequencing) dans le laboratoire de l'Unité de Biologie Cellulaire de l'hôpital Saint-Louis, qui est référent dans la prise en charge des Néoplasies Myéloprolifératives.

Après avoir réalisé l'analyse de risque (méthode des 5M), notre étude a porté essentiellement sur la validation de méthode, qui a été effectuée par des vérifications bibliographiques ou expérimentales au laboratoire.

Nous nous sommes aidés des documents disponibles, opposables ou non, comme par exemple : les guides techniques d'accréditation (GTA 04, GTA06 ou GTA 14 par exemple), le formulaire SH FORM 43, ou des publications scientifiques.

Ce travail permettra au laboratoire de demander au COFRAC l'accréditation de cet examen.

