



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

Date de Création : **23/05/2014**

Date de la remise à jour : 11/07/2016

	Nom	Hôpital	Date
Rédacteur(s)	Piton Amélie	CHU Strasbourg	23/05/2014
	Roux Anne-Françoise	CHU Montpellier	
	Girodon Emmanuelle	CHU Cochin	
	Groupe de travail ANPGM		
Approbateur(s)	Groupes de travail du réseau NGS-Diagnostic		Nov 2015
	Conseil d'Administration		25/07/2016

Groupe de travail ANPGM : Stéphanie Baert-Desurmont (Rouen), Marie-Pierre Buisine (Lille), Nelly Burnichon (HEGP, Paris), Laurent Castera (Caen), Christel Depienne (Strasbourg), Claude Houdayer (Institut Curie, Paris), Emmanuelle Girodon (Cochin, Paris), Eulalie Lasseaux (Bordeaux), Anne-Sophie Lèbre (Reims), Pascale Levy (ABM, Paris), Gert Matthijs (Leuven, Belgique), Amélie Piton (Strasbourg), Anne-Françoise Roux (Montpellier).

PREAMBULE

Le Séquençage de Nouvelle Génération (NGS pour Next Generation Sequencing) ou Massif en Parallèle (MPS pour Massive Parallel Sequencing), permet le criblage simultané d'un très grand nombre de séquences. A ce jour, il est utilisé pour analyser un seul gène, un panel de gènes plus ou moins important (quelques gènes à des centaines de gènes), ou encore l'exome ou « mendéliome ». Il trouve tout son intérêt dans l'analyse moléculaire de pathologies présentant une hétérogénéité génétique ou dans la résolution d'une errance diagnostique (cas des grands panels de gènes ou de l'exome). Cette approche est extrêmement puissante en terme de quantité de données générées et il convient de définir quels sont les variants à inclure dans un compte rendu de résultats à adresser au prescripteur et qui pourra être alors transmis au patient. Une analyse NGS doit répondre aux mêmes



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

exigences de qualité, y compris dans l'interprétation, quelle que soit l'approche technologique choisie, que les autres méthodes utilisées en diagnostic moléculaire.

Les présentes recommandations s'appuient sur des documents de référence, incluant des recommandations internationales, et respectent notamment les Bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales définies dans l'Arrêté du 27 mai 2013. Elles visent à définir les éléments essentiels liés à l'utilisation du NGS qui devront figurer dans le compte rendu.

Un compte rendu doit adopter le même format et contenir les mêmes informations sur la méthodologie, qu'il y ait présence de mutation(s) pathogène(s) (résultat « positif ») ou non (résultat « négatif » ou « non concluant »).

Le compte rendu doit être clair et concis pour être compréhensible du prescripteur (*Claustres et al., Eur J Hum Genet, 2014*), et suivre les exigences du chapitre 5.8 de la norme NF EN ISO 15189, comme les autres comptes rendus de génétique moléculaire. Selon les situations et la politique du laboratoire, il pourra être complété par des annexes contenant des informations plus détaillées sur la liste de gènes, la couverture, la liste des variants de signification inconnue (VSI ou VUS pour variant of unknown significance), la description des méthodes d'enrichissement ou du pipeline informatique, les données de séquençage du patient, etc. Certaines annexes pourront être systématiquement jointes au compte rendu, d'autres seront disponibles sur demande.

Il est important de vérifier que la prescription est cliniquement justifiée, notamment au regard des recommandations et arbres décisionnels en vigueur. Par ailleurs, il convient de rappeler que le compte rendu devra présenter des données en accord avec la prescription et le consentement signé par le patient (consentement type : <http://fondation-maladiesrares.org/actualite/consentement-a-letude-des-caracteristiques-genetiques>). Il est donc important de définir au préalable avec les cliniciens prescripteurs les analyses qui feront l'objet du compte rendu. Les prescripteurs devront être informés des mises à jour des panels de gènes et des gènes réellement analysés pour leurs patients.

Le présent document n'aborde pas la question de la découverte fortuite de variants génétiques sans lien direct avec la pathologie étudiée, notamment lors d'une analyse d'exome ou de génome. Cela fera l'objet d'une discussion au sein d'un groupe de travail multidisciplinaire incluant des cliniciens, et d'une prochaine version de recommandations.

LE COMPTE RENDU (CR)

1) Méthode d'analyse

Éléments à mentionner :



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

- a. Liste des gènes analysés qui font l'objet du CR avec les numéros d'accès des gènes étudiés (NCBI : NM_ ou LRG, s'ils existent). Si le nombre de gènes analysés est trop important pour figurer en 1^{ère} page, il est possible de mentionner la liste des gènes de façon concise (ex : panel de x gènes impliqués dans... ; cf annexe) ; les gènes seront alors listés dans une annexe qui sera intégrée au CR. Dans le cas de panels commerciaux, mentionner la version utilisée.

Dans les cas de panels conçus pour des raisons d'organisation au laboratoire et pour l'étude de différentes pathologies, ou bien de panels étendus incluant des gènes impliqués dans un même phénotype mais dont l'utilité clinique n'est pas clairement établie, seule la partie pertinente en rapport avec la prescription (ou discutée avec le clinicien) est mentionnée.

De la même façon, dans le cas où un panel de gènes est utilisé alors que la prescription en cible un nombre limité, parce que le phénotype oriente l'étude, seule la partie pertinente en rapport avec la prescription (ou discutée avec le clinicien) est rapportée.

- b. Technique d'enrichissement : Capture, amplification, etc
- c. Séquenceur : par exemple, PGM, MiSeq, NextSeq, etc
- d. Pipeline bioinformatique : « maison » ou commercial, en précisant la version.
- e. Pourcentage des régions des gènes analysés et rendues couvertes par le design (*par exemple : 98 % des régions codantes des gènes inclus dans le panel sont couvertes*) et définition de la profondeur de lecture minimale acceptée par le laboratoire (*ex : 40X*). Mention du recours ou non au séquençage Sanger pour certaines régions de couverture insuffisante (*ex : <40X*).

2) Sensibilité analytique et limitations de la technique

Elles devront être documentées lors de la validation de méthode : ex cette analyse détecte XX % des variants SNP ; indiquer si le seuil est inférieur pour les indels. Indiquer si les grands réarrangements (CNV) sont recherchés ou non par la méthode. Indiquer si les mosaïques sont recherchées ou si elles ne le sont pas, seulement si cela est pertinent, en fonction des gènes et de la pathologie. Une autre limite de la technique peut être la non détection de remaniements chromosomiques de type translocation ou inversion.

3) Confirmation des résultats



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

Au minimum, les variants probablement pathogènes (classe 4) et clairement pathogènes (classe 5) et qui seront discutés en conseil génétique (classes 4 et 5) doivent être confirmés par une autre méthode, pour des raisons techniques (vérification d'une insertion/délétion ou d'un variant d'un gène pour lequel existe un pseudogène) et/ou pour exclure une erreur d'échantillon. Le laboratoire doit l'indiquer, et préciser si les VUS (classe 3) font également l'objet d'une confirmation. Le CR doit faire mention des éventuelles confirmations sous-traitées dans le cadre d'un réseau d'expertise.

4) Mutations/variants à mentionner

- a. Variants probablement et clairement pathogènes (classes 4 et 5)
- b. Variants de signification inconnue (VUS, classe 3) : ils peuvent être mentionnés sur la 1^{ère} page du CR ou en annexe. S'ils apparaissent en 1^{ère} page du CR, bien les séparer des variants clairement pathogènes (en remarque par exemple), et indiquer qu'ils ne doivent pas être pris en considération pour tester les apparentés.
- c. Mentionner les variants en nomenclature HGVS : au minimum NM_xxx.x (il est fortement recommandé de préciser la version) : « c. » ou « g. » (avec version du génome) et « p. » si pertinent. Indiquer que la numérotation des variants suit la nomenclature HGVS.

5) Sensibilité diagnostique

Elle est à préciser si cela est pertinent, notamment pour des études de gènes uniques ou de panels restreints. Cela dépend de la pathologie, de l'indication, du recrutement éventuel du laboratoire et devra s'appuyer sur les données de la littérature.

6) Variants de découverte fortuite

Le laboratoire doit définir, en accord avec les cliniciens, sa politique de rendu de variants de découverte fortuite, s'ils sont clairement pathogènes dans des gènes «actionnables» (présentant un bénéfice pour la prise en charge du patient) (se référer au document « ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing »). Le cas échéant, il doit s'assurer que le consentement signé par le patient permet de rendre de tels résultats.



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

7) Edition d'un deuxième CR

Si un CR est établi pour un patient en complément d'analyse selon un pipeline bioinformatique différent ou pour d'autres gènes du design, indiquer que « ce compte rendu complète celui en date du... », et mentionner la raison de ce deuxième CR.

Il est fortement recommandé de soumettre les mutations et variants identifiés à des bases de données publiques, spécifiques de gènes (LSDB) ou générales type ClinVar.

L'analyse des données issues du séquençage haut-débit, et particulièrement de larges panels de gènes ou d'exomes (cliniques ou entiers) peut révéler l'existence de variants dans des gènes pour lesquels le laboratoire réalisant l'analyse n'a pas d'expertise particulière. Il est fortement recommandé de discuter des résultats, en amont du CR, à la fois avec le clinicien prescripteur (pour avis clinique) et, s'il en existe un, avec un laboratoire de référence pour le gène (pour avis expert).

DOCUMENTS de REFERENCE

- Practice guidelines for Targeted Next Generation Sequencing Analysis and Interpretation, ACGS , <http://www.acgs.uk.com/quality-committee/best-practice-guidelines/>, publié *online* le 9 mai 2014

- ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Rehm H et al., Genet Med. 2013 Sep;15(9):733-47.

- EuroGentest guidelines

- Recommandations ACPA

- Arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales

- Claustres M, Kožich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K, Oosterwijk C, Peterlin B, van Ravenswaaij-Arts C, Zimmermann U, Zuffardi O, Hastings RJ, Barton DE. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). Eur J Hum Genet. 2014 Feb;22(2):160-70. PMID: 23942201

- « ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing »



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

LISTE DES ANNEXES QUI PEUVENT ETRE JOINTES AU COMPTE RENDU

ANNEXE 1 Liste des gènes (si non détaillée dans le CR)

- Il est recommandé de joindre cette annexe au CR
- Liste des gènes avec les NM_

ANNEXE 2 Information sur la couverture des gènes (pour le patient)

- Il est recommandé de joindre cette annexe au CR
- Les informations sur les régions non-couvertes (en-dessous du seuil de profondeur de lecture spécifié) seront données. Elles pourront être listées ou présentées sous forme graphique et pourront éventuellement être incorporées dans l'annexe 1.

ANNEXE 3 Données techniques du patient

- Il n'est pas nécessaire de joindre cette annexe au CR. Elle est à stocker au laboratoire, dans le dossier patient
- Design, plateforme, nombre de séquences, nombre de variants identifiés, etc...

ANNEXE 4 Pipeline bioinformatique

- Il n'est pas nécessaire de joindre cette annexe au CR. Elle est à stocker au laboratoire, dans le dossier patient
- Pipeline bioinformatique à détailler. Indiquer la version du ou des logiciels
- Critères de filtres et de classement de variants

ANNEXE 5 Liste des variants de signification inconnue identifiés chez le patient

- La liste des variants de signification inconnue (classe 3, VUS, VSI) peut être jointe au compte-rendu ou être disponible sur demande, suivant la pertinence biologique de ces variants.



Recommandations ANPGM pour l'élaboration d'un compte rendu de résultats obtenus par analyse de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Référence : **BP-ANPGM_009**

Numéro de version : **1**

Exemples de Compte rendu

Séquençage petit panel : résultat positif (2 pages)

Séquençage large panel : résultat négatif (2 pages)

Séquençage large panel : résultat positif (2 pages)

Séquençage large panel : résultat variant de signification inconnue (3 pages)

Séquençage petit panel d'oncogénétique : résultat positif (3 pages)

Séquençage petit panel d'oncogénétique : résultat négatif (3 pages)

Séquençage petit panel d'oncogénétique : variant de signification inconnue (3 pages)