

GÉNOTYPAGE HLA-A, B, C, DRB1 ET DQB1 EN HAUTE RÉOLUTION PAR SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (RÉFÉRENCE – 2014.03.04)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Hôpital Maisonneuve-Rosemont
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 26 août 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 1^{er} novembre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Le D^r Lambert Busque et la D^{re} Annie-Claude Labbé, de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, se retirent au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Séquençage de nouvelle génération (massivement parallèle) des loci HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'analyse proposée par le demandeur vise à séquencer les loci HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 grâce à une approche de nouvelle génération (NGS) pour déterminer les allèles présents chez le receveur et les donneurs potentiels de façon à identifier le meilleur donneur pour une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSC).

L'approche technique est constituée des étapes suivantes et schématisée à l'annexe A :

- Une amplification spécifique des gènes du locus HLA est effectuée par PCR à grande échelle (*Long Range PCR*) avec la trousse NGSgo®-AmpX. La longueur des fragments obtenus se situe entre 0,4 et 5,8 kilobases (kb). Les amorces permettent l'amplification du gène entier de la majorité des HLA de classes I et II (HLA-A, B, C, DQA1, DPA1 et DPB1) à l'exception des gènes HLA-DRB1, DRB3/4/5 et DQB1 dont les exons 2 à 4 (incluant les introns) seulement sont amplifiés.
- La librairie est construite en fragmentant les amplicons générés à l'étape 1. Les fragments sont liés à des adaptateurs de séquences : X-adapters et P-adapters. Les premiers, qui sont biotinylés, contiennent des séquences spécifiques permettant d'associer les fragments à un individu particulier et rendent possible le séquençage subséquent de plusieurs individus simultanément sur une même micropuce. Les P-adapters permettent la liaison aux IPS (*Ion Sphere Particle*) lors de l'amplification en émulsion. Par la suite, les fragments avec une taille minimale de 400 pb sont sélectionnés à l'aide de billes magnétiques.
- Chaque molécule d'ADN est liée à un IPS par l'intermédiaire du P-adapter. Une amplification clonale en émulsion est effectuée grâce à l'Ion One Touch 2 system™.
- Un enrichissement des IPS couplés à des fragments d'ADN est réalisé par purification sur billes magnétiques recouvertes de streptavidine.
- Chaque IPS individuel est distribué dans un des puits retrouvés sur une micropuce. Les fragments d'ADN recouvrant l'IPS sont ensuite séquencés selon un principe de base similaire à l'approche de Sanger. La séquence nucléotidique de chaque fragment est identifiée au cours de la synthèse cyclique d'un brin complémentaire à la matrice. Par vagues successives, chaque type de nucléotides est mis en contact avec les brins naissant de l'ADN. Si un nucléotide est incorporé dans un puits en particulier, le relâchement d'ion H⁺ est détecté sous la forme d'un changement de pH par le PGM (Personal Genome Machine®). La mesure est quantitative et permet de détecter le nombre d'un même nucléotide incorporé. L'ensemble des cibles pour différents patients sont amplifiées simultanément.
- Finalement, les séquences consensus obtenues sont assemblées et comparées à la banque de données IMGT¹⁰/HLA [Robinson *et al.*, 2013] et le type HLA est assigné. L'analyse bioinformatique est effectuée en parallèle par le logiciel NGSengine® et l'Omixon Target.

2.3 Société ou développeur

La compagnie GenDx produit les trousse HLA-NGS Go® (AmpX, FragX, LibrX et IndX), de même que le logiciel NGSengine® utilisés par le demandeur.

La plateforme de séquençage PGM est fabriquée par Ion Torrent et distribuée par LifeTechnologies. Elle est constituée du PGM, de l'Ion OneTouch2 System® et du Qubit®. Les trousse utilisées pour l'amplification et le séquençage sont produites par la compagnie Ion Torrent et distribuées par LifeTechnologies

Omixon produit le deuxième logiciel bioinformatique (Target) utilisé pour l'assignation des allèles HLA.

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : Ne s'applique pas.

¹⁰ IMGT : International ImMunoGeneTics databases, disponible à : <http://www.imgt.org/>.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les trousse NGS Go[®] utilisées par le demandeur sont homologuées CE-IVD par l'Union Européenne (2014-06-24).

2.7 Valeur pondérée : 619,4 (123,9 par locus).

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Les patients en attente d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques et leurs donneurs potentiels.

3.2 Description de la maladie visée

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) est la forme d'immunothérapie tumorale la plus efficace disponible jusqu'à présent. Elle est utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hématologiques ou maladies hématologiques bénignes telles que les aplasies médullaires et les déficits immunitaires. Plusieurs facteurs influencent le succès de la HSCT allogénique; un facteur essentiel étant la compatibilité du système HLA.

Les gènes HLA codent pour des glycoprotéines de surface impliquées dans la présentation des antigènes au système immunitaire (cellules T et NK). Ils constituent donc une composante importante du système immunitaire et sont impliqués dans la réponse aux infections, diverses maladies monogéniques, la susceptibilité aux maladies autoimmunes, les cancers, les effets adverses à certains médicaments et l'induction d'une réponse allo-immune dans un contexte de transfusion et de transplantation [Orange 2008; Gao *et al.*, 2005; Lie et Thorsby, 2005; Mallal *et al.*, 2002; Klein et Sato, 2000; Grakoui *et al.*, 1999].

Le système HLA permet au système immunitaire de distinguer entre les organes et tissus du corps et les substances ou organismes étrangers. Une compatibilité du système HLA est donc essentielle lors d'une HSCT allogénique pour éviter des complications cliniques, telles que le rejet du greffon par l'hôte ou la maladie du greffon versus l'hôte (GVHD) [Eapen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007]. La GVHD (aiguë ou chronique) est une cause majeure de morbidité et de mortalité chez 20 - 80 % des patients et est caractérisée par l'attaque des tissus de l'hôte, particulièrement la peau, le foie et le système gastro-intestinal, par le greffon [revue par Petersdorf, 2013; Horan *et al.*, 2012].

Le locus HLA est une région chromosomique d'environ 4 Mb située sur le chromosome 6p21.3. Les gènes HLA de classes I et II codent respectivement pour les HLA-A, B, C et HLA-DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 [MHC Sequencing Consortium, 1999]. La FACT et l'ASHI¹¹ recommandent le typage des gènes HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 dans un contexte de HSCT.

3.3 Nombre de patients visés

Entre 800 et 1000 analyses devraient être effectuées annuellement. Cette évaluation inclut les génotypages du patient (receveur) et des donneurs potentiels (apparentés).

¹¹ FACT : Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy; ASHI : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Diagnostic moléculaire et hématologie-greffe de cellules souches.

3.5 Modalités d'administration du test

Cette analyse est effectuée seulement chez les patients admissibles à une HSCT selon les guides de pratique établis. Elle ne sera donc prescrite que par les hématologues.

Les prélèvements de sang des receveurs et donneurs sont effectués au centre demandeur. L'analyse est effectuée dans le laboratoire de biologie moléculaire par le personnel spécialisé pour le typage HLA. Les résultats sont validés par la direction scientifique et technique et la direction médicale-HLA. Ils sont par la suite révisés et le choix du donneur est effectué par les cliniciens de l'équipe de greffe.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Cette analyse peut être complémentaire au séquençage par Sanger.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Le typage des allèles HLA utilise actuellement des approches basées sur l'ADN : le PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*), le PCR-SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotide Probes*) et le SBT (*Sequence Based Typing* ou en français, séquençage de type Sanger) [Erich, 2012; Dunn, 2011]. Le séquençage de type Sanger est actuellement considéré comme la méthode de référence (*gold standard*). Elle présente toutefois des lacunes ayant un effet potentiellement négatif sur le patient. En effet, des ambiguïtés d'allèles sont retrouvées dans une proportion importante des individus. Ces ambiguïtés proviennent de la restriction des régions investiguées et de l'incapacité à distinguer indépendamment la séquence de chaque allèle (ambiguïté de phase). Elles résultent en une incapacité à assigner un allèle précis, rendant la tâche d'identification d'un donneur compatible plus longue, complexe et coûteuse puisque le laboratoire doit alors avoir recours à l'utilisation de séquençages supplémentaires, de PCR-SSOP, et occasionnellement, à l'envoi de séquençage des locus HLA par NGS (hors Québec) de façon à résoudre les ambiguïtés cliniquement significatives.

Actuellement, seules les séquences les plus polymorphiques codant pour le site de reconnaissance des antigènes (ARS) des molécules HLA sont déterminées de façon routinière (les exons 2 et 3 des HLA de classe I et l'exon 2 des HLA de classe II). Le ciblage de ces régions a été établi en fonction de leur association avec le pronostic de la greffe, de même que des considérations de temps de réponse et budgétaires.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les méthodes de typage actuelles fournissent des résultats ambigus occasionnés par la couverture incomplète des gènes et l'incapacité à déterminer la phase des séquences. Le séquençage selon l'approche par NGS permet de couvrir la quasi-totalité des gènes HLA de classes I et II (introns et exons) par un seul séquençage. De plus, il permet d'obtenir la séquence de chaque allèle indépendamment. Ainsi, la majorité des ambiguïtés est éliminée. Les résultats plus précis et le temps de réponse amélioré engendrés par cette approche permettent une orientation plus rapide du patient vers la greffe.

Les autres avantages du séquençage par NGS proviennent de la réduction du risque d'erreurs de typage dues à une diminution des étapes de manipulation et au fait que tous

les gènes ciblés sont séquencés simultanément, de la réduction du temps technique et de la diminution significative du coût de l'analyse (valeur pondérée 619,4 versus 1175,0 selon l'approche de Sanger)¹².

4.4 Coût de la technologie et des options : Il n'a pas été évalué.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement par un autre test : Cette analyse ne remplace aucun test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Les disparités (*mismatches*) entre les typages HLA des donneurs et des receveurs sont associées à une mortalité et à un risque de GVHD accrus [Eapen *et al.*, 2011; Woolfrey *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007; Greinix *et al.*, 2005]. Une amélioration du taux de survie a pu être démontrée par suite de l'introduction de techniques de résolution des allèles à haute résolution [Spellman *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007].

La compatibilité du typage HLA augmente la probabilité de la prise du greffon, réduit les taux de GVHD aiguë et chronique et réduit la mortalité. Le typage à haute résolution par SBT est associé à un meilleur taux de survie et est déjà implanté chez le demandeur. Le changement de technologie demandé vise à réduire le nombre important d'ambiguïtés dans les séquences (chez 51 % des individus) et à réduire le temps de réponse tout en assurant un typage précis permettant un appariement donneur-receveur approprié.

L'analyse proposée n'est pas associée à une valeur diagnostique.

5.1.3 Valeur thérapeutique

La HSCT est indiquée pour plusieurs cancers hématopoïétiques et un certain nombre de maladies hématologiques bénignes. Cette option thérapeutique ne peut toutefois être considérée sans qu'un typage des gènes HLA de classes I et II ne soit effectué et que la compatibilité entre le receveur et le donneur potentiel n'ait été évaluée [FACT, 2015; ASHI, 2014; Bray *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Petersdorf *et al.*, 2007; Petersdorf, 2004].

5.2 Validité clinique

TERME	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	X		
Spécificité	X		
Valeur prédictive positive (VPP)			
Valeur prédictive négative (VPN)			
Rapport de vraisemblance (LR)			
Courbe ROC			
Exactitude			

La validité clinique associée à l'utilisation d'une approche de typage à haute résolution et, plus particulièrement au séquençage de type Sanger, a été démontrée précédemment, établissant

¹² Information transmise par le demandeur.

cette technologie comme méthode de référence au Québec et à l'échelle internationale. Les organismes de réglementation des standards de pratique dictent que, dans la mesure du possible, un typage en haute résolution pour les loci HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 devrait être effectué [FACT, 2015; ASHI, 2014; Spellman *et al.*, 2012].

Le séquençage selon l'approche de Sanger comporte toutefois des lacunes importantes pour le typage HLA en particulier. Une de celles-ci provient du fait que ce type de séquençage fournit des résultats ambigus chez une proportion importante des individus. Ces ambiguïtés rendent complexe l'assignation d'allèles précis et donc l'évaluation de la compatibilité entre le donneur potentiel et le receveur.

Récemment, Ehrenberg et ses collaborateurs [2014] rendaient compte des ambiguïtés dans 50 allèles sur 760 séquencés chez 95 patients (6,6 %). Or, comme 8 allèles avaient été séquencés par patient, l'ensemble de ces ambiguïtés réparties dans la cohorte résulte en un typage imprécis dans au moins un allèle chez 41 individus (43,2 %). Donc, près de la moitié des patients et de leurs donneurs potentiels ne peuvent se faire assigner un typage précis et leur compatibilité ne peut pas être déterminée. Des délais sont donc nécessaires pour résoudre ces ambiguïtés par des séquençages supplémentaires ou d'autres approches résultant en un report du moment de la greffe ou de l'initiation de la recherche d'un donneur approprié (si non apparenté).

Le demandeur rapporte des ambiguïtés de séquences qui rendent incertain le typage de 51 % des 50 échantillons analysés par Sanger contre 1 % de ceux séquencés sur une plateforme PGM de Ion Torrent avec la trousse NGSgo® (GenDx), et ce, malgré le fait que 75-90 % des typages par Sanger avaient subi des manipulations supplémentaires pour diminuer le nombre d'ambiguïtés, contrairement aux séquences NGS. Des taux similaires d'ambiguïtés affectant 41-51 % des patients ont été également signalés par d'autres [Lange *et al.*, 2014; Adams *et al.*, 2004].

En accord avec ces données, dans une étude comparative de séquençage de 37 975 échantillons par Sanger et par séquençage NGS sur une plateforme MiSeq, Lange et ses collaborateurs [2014] ont obtenu un taux d'assignation des allèles moyen de 95,0 % avec l'approche de Sanger contre 98,8 % grâce au NGS (voir la figure 1).

Figure 1 Taux d'assignation des allèles dans 37 975 échantillons

Locus	Sanger	NGS
A	90.4%	99.8%
B	95.0%	97.6%
C	92.3%	95.7%
DPB1	99.8%	99.9%
DQB1	95.7%	100.0%
DRB1	96.6%	100.0%
Average	95.0%	98.8%

Rate of high resolution typing results. Resolution of 37,975 samples typed by the proposed NGS approach in September 2013 was compared with 145,932 samples analyzed by Sanger sequencing in 2012. In accordance with the standards of the European Federation for Immunogenetics (EFI), we refer to allele typing results with no ambiguities in the antigen recognition site as "high resolution".

Source : Lange *et al.*, 2014.

Aucune étude officielle démontrant un avantage clinique de l'approche NGS n'a été repérée. L'application de cette technologie au séquençage des locus HLA est un développement récent. Toutefois, plusieurs grands centres ont implanté ou sont en voie d'implanter du séquençage par NGS comme en témoignent la littérature scientifique publiée et les données de validation présentées lors de rencontres scientifiques [Zhou *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012¹³]. Le NMDP (National Marrow Donor Program), l'American Red Cross, le registre du China Marrow Donor Program (CMDP) et le DKMS (German Bone Marrow Donor Center) figurent parmi les centres ayant implanté le NGS pour le typage HLA.

5.3 Validité analytique (ou technique)

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité			
Reproductibilité	X		
Sensibilité analytique	X		
Spécificité analytique	X		
Effet de matrice			
Concordance	X		
Corrélation entre test et comparateur	X		

Le système HLA est un des plus polymorphiques retrouvé chez l'humain; plus de 12 540 allèles ont été décrits jusqu'à présent¹⁴. Les polymorphismes sont constitués de polymorphisme d'un nucléotide (SNP), de substitutions, de délétions/d'insertions, de séquences courtes répétées en tandem (*short tandem repeats*, microsatellites) et de variations dans le nombre de copies (CNV) [revue par Petersdorf, 2013; Robinson *et al.*, 2013]. De plus, cette région contient des duplications segmentales et plusieurs pseudogènes. La détermination des allèles présents nécessite donc, lors d'une approche par séquençage, une taille minimale de fragment qui permet l'appariement des séquences et l'obtention d'une séquence consensus. Les études de faisabilité de l'implantation de séquençage NGS pour le génotypage HLA sont récentes et en ont démontré la faisabilité. Depuis, une évolution rapide des chimies, des plateformes et des outils de bioinformatique a permis d'améliorer la performance du séquençage des gènes HLA sur différentes plateformes dont le MiSeq d'Illumina et le PGM de Ion Torrent. La méthodologie a également été simplifiée et standardisée, et le coût est maintenant inférieur à celui de la SBT, facilitant l'implantation du NGS en clinique. Devant les progrès et développements rapides qui se poursuivent, les études retrouvées dans la littérature scientifique font état fréquemment des performances de technologies vétustes au moment de leur publication. Toutefois, elles peuvent fournir une indication sur la performance de l'approche. Le tableau 1 contient les critères évalués dans le cadre de différentes études récentes de validation présentées au dernier congrès de l'ASHI¹³.

¹³ American Society of Histocompatibility and Immunogenetics: 40th Annual Meeting Abstracts, October 20-24, 2014, Denver, Colorado. Human Immunology 2014;75(Suppl):1-148 (les résumés sont aussi disponibles à : <http://www.ashi-hla.org/abstracts/2014/>).

¹⁴ EMBL-EBI. IPD – IMGT/HLA: Statistics [site Web]. Disponible à : <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (consulté le 24 janvier 2015).

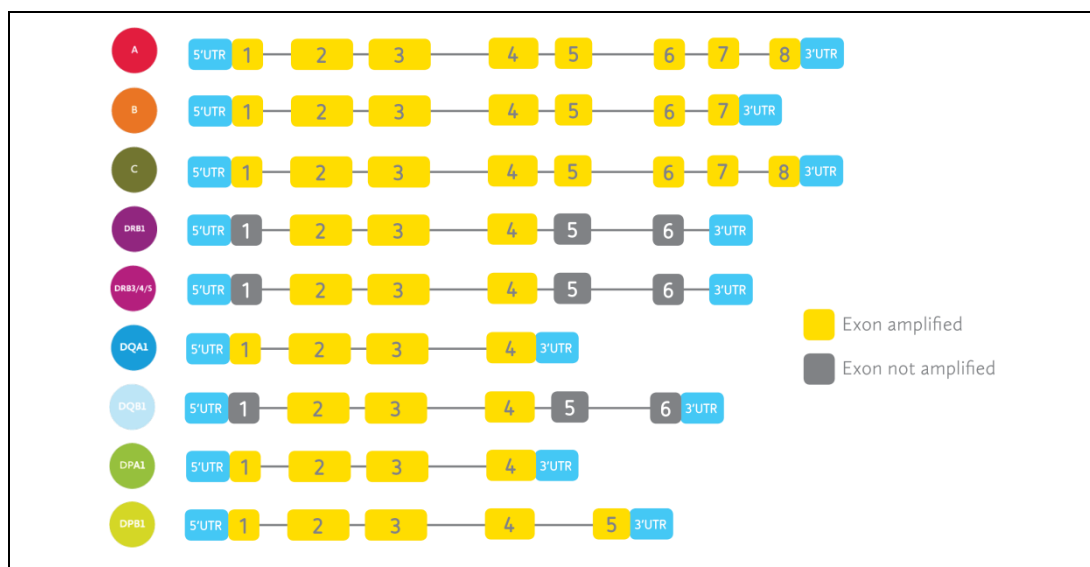
Tableau 1 Études de validation du typage HLA sur plateforme NGS (présentées au congrès de l'ASHI en 2014)

ÉTUDES	TROUSSE AMPLIFICATION	PLATEFORME	LOGICIEL	GÈNES SÉQUENCÉS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	CRITÈRE ÉVALUÉ
Ozaki <i>et al.</i> , OR02			GenDx (NGSengine v.1.2) Omixon (Target v.1.6.0) SeaBass	HLA-A, B, C DRB1, 3, 4, 5' DQA1 DQB1 DPA1 DPB1	300	Concordance : 100 % avec les techniques : SBT, PCR-SSOP, etc.
Lind <i>et al.</i> , OR04		MiSeq (Illumina)	Omixon (Target) GenDx (NGSengine)	HLA-A, B, C DRB1 DQB1	16 dans 6 laboratoires indépendants	Reproductibilité : 99,4 %
Davis <i>et al.</i> , OR03		PGM (Ion Torrent)	Omixon (Target) ThermoFisher (prototype)	HLA-A, B, C DRB1 DPB1 DQB1	122	Reproductibilité intra-essai : 98 % Reproductibilité inter-essai : 100 % Concordance avec SBT : Assignment avec logiciel seul : 85-95 % Assignment avec vérification manuelle : HLA-A et C : 100 % HLA-B : 98,6 % DPB1 : 99,5 % DQB1 : 96,6 %
Jabara <i>et al.</i> , P092	GenDx	MiSeq (Illumina)	GenDx (NGSengine v1.4.0) Omixon (Target v 1.8.0)	HLA-A, B, C DRB1 DQB1 DPB1	30	Concordance : 99,7 %
Yamamoto <i>et al.</i> , P113	maison	454 (Roche Diagnostic)		HLA-A, B, C (exons 2,3) DRB1 (exon 2) DRB3/4/5 DQB1	59	Concordance : 100 % avec SSP et SSOP
Yin <i>et al.</i> , P100		MiSeq (Illumina)	Omixon (Target)	HLA-A, B, C DRB1 DQB1 DPB1	72	Concordance : 99,1 % avec SBT

Abréviations : OR : présentation orale; P : présentation par affiche; PCR-SSP : sequence specific primers; PCR-SSOP : sequence specific oligonucleotide probes; SBT : sequence based typing ou séquençage de type Sanger.

Le demandeur prévoit utiliser la trousse NGSgo qui permet l'amplification des différents gènes HLA. Le séquençage est effectué sur la plateforme PGM d'ionTorrent et l'assignation des allèles est effectuée à l'aide de 2 logiciels suivants : NGSengine et Omixon Target. Selon les informations fournies par GenDx, la trousse permet l'amplification des gènes entiers de la classe I (introns et exons) et d'une région plus restreinte des HLA de classe II (Figure 2). Les régions amplifiées excèdent les recommandations minimales de l'European Federation of Immunogenetics Standards for histocompatibility and immunogenetics testing (version 6.0) [EFI, 2012] et de l'ASHI.

Figure 2 Régions amplifiées par la trousse NGSgo (GenDx)



Source : GenDx. Ion Torrent Workflow: Target generation (NGSgo®-AmpX) [site Web]. Disponible à : <http://www.gendx.com/it-target-generation>.

L'analyse a été mise au point et validée par le demandeur selon les normes de l'ASHI [Hahn *et al.*, 2000].

Reproductibilité

Déjà en 2011, Holcomb et ses collaborateurs [2011] ont évalué la reproductibilité du séquençage de 20 échantillons dans 8 centres possédant des niveaux variables d'expérience avec la plateforme GSFLX de 454 Life Sciences (Roche Diagnostics). Quatre-vingt-cinq pourcent des allèles ont pu être assignés et 3,7 % des loci ont dû subir une assignation manuelle. La concordance moyenne a été évaluée à 97,2 % (95,3-99,4 %).

Lors du congrès de l'ASHI à Denver en 2014), Lind et ses collaborateurs [2014, OR04] ont présenté une étude de concordance des résultats obtenus pour 16 échantillons analysés dans 6 laboratoires en double aveugle sur la plateforme MiSeq. Une concordance de 99,4 % a été obtenue. Une contamination croisée d'un exon était à l'origine de la seule discordance.

Le demandeur a effectué une évaluation de la reproductibilité de l'analyse en comparant les résultats obtenus pour 21 échantillons entre leur laboratoire et le laboratoire de référence (Héma-Québec). L'étude a été effectuée à l'aveugle. Ils ont obtenus une concordance de 100 %.

Sensibilité analytique

L'approche par NGS permet la détection de variations ponctuelles ainsi que de délétions et d'insertions mineures. Le demandeur a évalué la sensibilité de la technique grâce à un test de dilutions sériées. Le seuil de détection d'allèles variants est d'environ 3,5 %. Les proportions des allèles détectés lors d'un typage HLA se situent généralement à 50 % ou à 100 % (présence hétérozygote ou homozygote). La sensibilité est donc suffisante pour établir un génotype. Le demandeur mentionne que les allèles considérés lors de l'analyse sont ceux constituant entre 20 % et 100 % des allèles de façon à pallier à l'amplification préférentielle de certaines séquences.

Aucune recommandation sur la profondeur de lecture nécessaire pour un séquençage NGS n'a été formulée par les organismes réglementaires. Toutefois, Gabriel et ses collaborateurs [2014] et Wang et ses collaborateurs [2012] recommandent 20 lectures par séquence. Le demandeur a établi à 50 le nombre minimal acceptable de lectures.

Spécificité analytique

Le demandeur a effectué l'analyse de 50 échantillons. Parmi les 496 allèles analysés (5 locus, 248 typages après exclusion de 2 typages HLA-DRB1, 2 allèles par typage, 496 allèles au total), aucun allèle erroné ou faux variant n'a été identifié lors du processus d'assignation des allèles utilisant la base de données internationales IMGT/HLA. La spécificité a donc été évaluée à 100 %.

Concordance

Une étude de concordance effectuée par le demandeur a permis de déterminer que les séquences obtenues pour 50 échantillons (5 locus, 248 typages après exclusion de 2 typages HLA-DRB1, 2 allèles par typage, 496 allèles au total) par NGS concordaient avec les résultats obtenus précédemment par Sanger. Les échantillons présentaient des typages variés, incluant des allèles peu communs ou des homozygotes à plusieurs loci. La concordance était de 100 % (voir le tableau ci-dessous).

Le tableau 2 contient certaines études de concordance effectuées au cours des 2 dernières années.

Contrôles de qualité externe

Le laboratoire participe au programme de qualité externe offert par l'ASHI. Les épreuves de génotypage à haute résolution sont bisannuelles.

5.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation officielle ne promeut l'implantation du NGS comme technique de typage à haute résolution actuellement. Toutefois, l'ASHI a émis ses normes de validation de la technologie.

Tableau 2 Études de concordance de typage HLA publiées au cours des 2 dernières années

ÉTUDE	PLATEFORME	TROUSSE D'AMPLIFICATION	GÈNES ANALYSÉS	APPROCHE INITIALE	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	CONCORDANCE	COMMENTAIRES
Wang <i>et al.</i> , 2012	GA-Ilx (Illumina) HiSeq (Illumina) MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DRB1	IHWG*	40 (lignées cellulaires)	99 %	Lors de discordance, validation par Sanger des résultats NGS
Cao <i>et al.</i> , 2013	MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DQB1 DRB1	SBT	96	100 %	
Danzer <i>et al.</i> , 2013	454 – GSJunior (Roche Diagnostics)	Maison	HLA-A, B, C DPB1 DRB DQB1	SBT	173 (1273 loci)	100 %	Red Cross Transfusion Services for Upper Austria Une réduction des ambiguïtés de 93,5 % est précisée
Ehrenberg <i>et al.</i> , 2014	MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DRB1	SBT	96	100 %	
Lange <i>et al.</i> , 2014	MiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, B, C DRB1 DQB1 DPB1	SBT	1140	100 %	DKMS (German Bone Marrow Donor Center)
Smith <i>et al.</i> , 2014	MiSeq (Illumina)	Scisco Genetics	DRB1 DRB3/4/5, DQA1 DQB1 DPA1 DPB1	SSOP SSP SBT	2523	99,5 %	
Zhou <i>et al.</i> , 2015	HiSeq (Illumina)	Maison	HLA-A, -B, -C DRB1 DQB1	SBT	> 1500	99,7 %	Registre du China Marrow Donor Program (CMDP)
					470	100 %	

Abréviations : PCR-SSP : sequence specific primers; PCR-SSOP : sequence specific oligonucleotide probes; SBT : sequence based typing ou séquençage de type Sanger.

*International Histocompatibility Working Group (<http://www.ihwg.org/>).

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines : Il n'a pas été analysé.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

L'introduction de la technologie proposée par le demandeur pour effectuer le typage à haute résolution aurait le potentiel de réduire les coûts associés à cette analyse dont la valeur pondérée est presque la moitié de l'analyse faite par Sanger.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

Ils n'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La compatibilité HLA entre le donneur et le receveur est essentielle pour favoriser l'implantation de la greffe et limiter la GVHD ainsi que les autres morbidités et la mortalité associées à la greffe. Le demandeur propose un changement de technologie permettant d'obtenir le séquençage des gènes HLA, dans un contexte de HSCT, par NGS plutôt que selon l'approche de Sanger tel qu'il est effectué actuellement. Cette dernière génère des ambiguïtés qui rendent complexe le typage HLA précis chez environ la moitié des individus. Des analyses et donc des coûts et des délais supplémentaires sont nécessaires pour résoudre les ambiguïtés significatives d'un point de vue clinique. Il en résulte des délais pour l'orientation du patient vers la greffe.

7.2 Validité clinique

Le séquençage selon l'approche NGS permet de réduire à environ 1 % la proportion des individus chez lesquels des ambiguïtés sont détectées. La technologie proposée favorise donc un meilleur temps de réponse et une plus grande précision en ce qui concerne la compatibilité entre un receveur et un donneur potentiel.

7.3 Validité analytique

Une validation extensive effectuée par le demandeur a permis de déterminer une performance similaire ou supérieure de la nouvelle technologie sur les divers critères évalués.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune recommandation officielle ne promeut l'implantation du NGS comme technique de typage à haute résolution actuellement. Toutefois, l'ASHI a émis ses normes de validation de la technologie.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Génotypage HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 en haute résolution par séquençage de nouvelle génération

Le statut de la technologie diagnostique

- ☒ Établie
- ☐ Innovatrice
- ☐ Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- ☐ Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

La recommandation de l'INESSS

- ☒ Avis de recommandation d'introduction
- ☐ Avis de refus d'introduction
- ☐ Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle

- ☐ Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- ☐ Décision de production d'un guide d'usage optimal
- ☐ Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Adams SD, Barracchini KC, Chen D, Robbins F, Wang L, Larsen P, et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: When precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *J Transl Med* 2004;2(1):30.
- American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI). Standards for accredited laboratories: 2014 revised standards approved by the ASHI Board of Directors. Mt. Laurel, NJ : ASHI; 2014. Disponible à : <http://www.ashi-hla.org/images/uploads/2014ASHIStandardsandGuidance.pdf>.
- Bray RA, Hurley CK, Kamani NR, Woolfrey A, Muller C, Spellman S, et al. National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(9 Suppl):45-53.
- Cao H, Wang Y, Zhang W, Chai X, Zhang X, Chen S, et al. A short-read multiplex sequencing method for reliable, cost-effective and high-throughput genotyping in large-scale studies. *Hum Mutat* 2013;34(12):1715-20.
- Danzer M, Niklas N, Stabentheiner S, Hofer K, Proll J, Stuckler C, et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: A transition from research to diagnostics. *BMC Genomics* 2013;14:221.
- Davis K, Saito Y, Barone J, Johnson ES, Beutner K, Dong W, et al. HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):3 [abstract OR03].
- Dunn PP. Human leucocyte antigen typing: Techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet* 2011;38(6):463-73.
- Eapen M, Klein JP, Sanz GF, Spellman S, Ruggeri A, Anasetti C, et al. Effect of donor-recipient HLA matching at HLA A, B, C, and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: A retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011;12(13):1214-21.
- Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: A comparison study. *Lancet* 2007;369(9577):1947-54.
- Ehrenberg PK, Geretz A, Baldwin KM, Apps R, Polonis VR, Robb ML, et al. High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. *BMC Genomics* 2014;15:864.
- Erlich H. HLA DNA typing: Past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012;80(1):1-11.
- European Federation of Immunogenetics (EFI). Standards for histocompatibility and immunogenetics testing. Version 6.0. EFI; 2012. Disponible à : <http://www.efiweb.eu/index.php?id=102>.

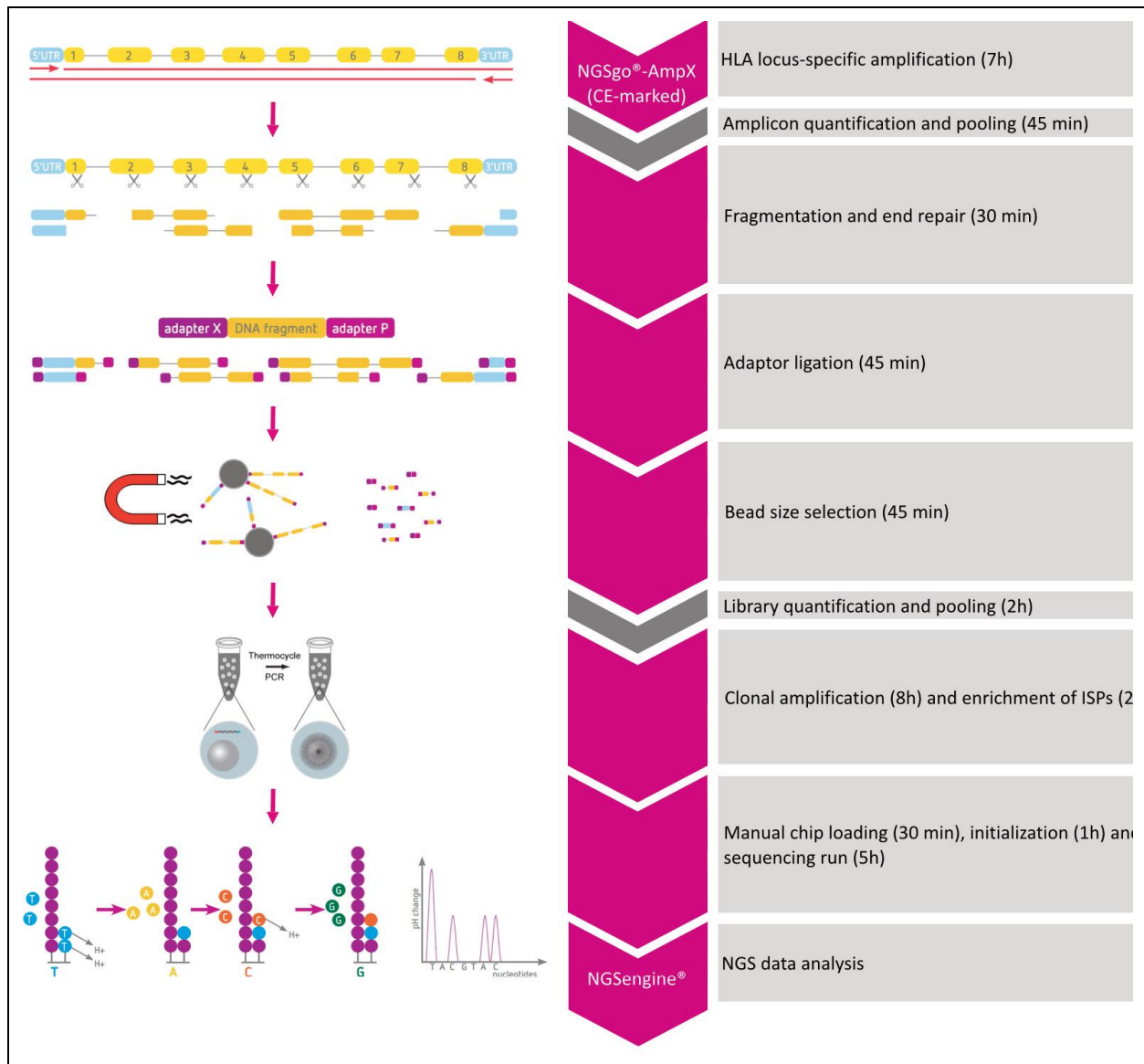
- Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT). FACT-JACIE international standards for hematopoietic cellular therapy product collection, processing, and administration. Sixth edition. Omaha, NE : FACT; 2015. Disponible à : <http://www.jacie.org/standards/6th-edition-2015>.
- Gabriel C, Furst D, Fae I, Wenda S, Zollkofer C, Mytilineos J, Fischer GF. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens* 2014;83(2):65-75.
- Gao X, Bashirova A, Iversen AK, Phair J, Goedert JJ, Buchbinder S, et al. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2005;11(12):1290-2.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285(5425):221-7.
- Greinix HT, Fae I, Schneider B, Rosenmayr A, Mitterschiffthaler A, Pelzmann B, et al. Impact of HLA class I high-resolution mismatches on chronic graft-versus-host disease and survival of patients given hematopoietic stem cell grafts from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(1):57-62.
- Hahn AB, Land GA, Strothman RM. ASHI laboratory manual. Fourth edition. Mt. Laurel, NJ : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI); 2000.
- Holcomb CL, Hoglund B, Anderson MW, Blake LA, Bohme I, Egholm M, et al. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens* 2011;77(3):206-17.
- Horan J, Wang T, Haagensohn M, Spellman SR, Dehn J, Eapen M, et al. Evaluation of HLA matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for nonmalignant disorders. *Blood* 2012;120(14):2918-24.
- Jabara C, Domanus M, Kim DH, Ho S, Adema J, Westerink N, Marlowe N. Performance evaluation of high resolution 11 loci HLA-typing prototype assay using NGS technology. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):116 [abstract P092].
- Klein J et Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(11):782-6.
- Lange V, Bohme I, Hofmann J, Lang K, Sauter J, Schone B, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* 2014;15:63.
- Lee SJ, Klein J, Haagensohn M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110(13):4576-83.
- Lie BA et Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2005;17(5):526-31.

- Lind C, Ferriola D, Huynh A, Duke J, Papazoglou A, Aska M, et al. A multi-center study using next-generation sequencing (NGS) for HLA genotyping. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):4 [abstract OR04].
- Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 2002;359(9308):727-32.
- MHC Sequencing Consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC Sequencing Consortium. *Nature* 1999;401(6756):921-3.
- Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):713-25.
- Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Ito S, Okudaira Y, Masuya A, et al. Development of advanced NGS based HLA DNA typing method: SS-SBT. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):2 [abstract OR02].
- Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: A model for understanding graft-versus-host disease. *Blood* 2013;122(11):1863-72.
- Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2004;11(6):386-91.
- Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med* 2007;4(1):e8.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004;104(9):2976-80.
- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D1222-7.
- Smith AG, Pyo CW, Nelson W, Gow E, Wang R, Shen S, et al. Next generation sequencing to determine HLA class II genotypes in a cohort of hematopoietic cell transplant patients and donors. *Hum Immunol* 2014;75(10):1040-6.
- Spellman S, Setterholm M, Maier M, Noreen H, Oudshoorn M, Fernandez-Vina M, et al. Advances in the selection of HLA-compatible donors: Refinements in HLA typing and matching over the first 20 years of the National Marrow Donor Program Registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(9 Suppl):37-44.
- Spellman SR, Eapen M, Logan BR, Mueller C, Rubinstein P, Setterholm MI, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood* 2012;120(2):259-65.
- Wang C, Krishnakumar S, Wilhelmy J, Babrzadeh F, Stepanyan L, Su LF, et al. High-throughput, high-fidelity HLA genotyping with deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(22):8676-81.

- Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(6):885-92.
- Yamamoto F, Holcomb CL, Goodridge D, Anderson MW, Erlich HA, Tyan DB, Fernandez-Vina MA. HLA high resolution genotyping using 454 NGS and GS GType HLA assay. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):129 [abstract P1-13].
- Yin Y, Lan JH, Reed EF, Zhang Q. Long range NGS HLA typing is accurate in the identification of common, rare, and novel alleles. *Hum Immunol* 2014;75(Suppl):120 [abstract P1-00].
- Zhou M, Gao D, Chai X, Liu J, Lan Z, Liu Q, et al. Application of high-throughput, high-resolution and cost-effective next generation sequencing-based large-scale HLA typing in donor registry. *Tissue Antigens* 2015;85(1):20-8.

ANNEXE A

Processus de séquençage des gènes HLA par NGS



Source : GenDx. Accurate HLA typing by NGS using the IonTorrent PGM with a platform specific developed and tested workflow [affiche présentée au congrès de l'ASHI à Denver en 2014]. Disponible à : <http://www.gendx.com/downloads/posters/GenDx%20ASHI%20posters%202014%20Ion%20Torrent.pdf>.