

Université Pierre et Marie Curie

Paris 6

MEMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE

DE BIOLOGIE MEDICALE »

**MISE EN PLACE D'UN PLAN D'AMELIORATION DE LA QUALITE
D'UNE METHODE QUANTITATIVE D'EVALUATION DE LA REPONSE
AU TRAITEMENT DANS LES LAL DE L'ADULTE**

MARTINEZ Gérald

Année 2010-2011

NOTE AU LECTEUR

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité du laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné. ».

AUTEUR

Gérald MARTINEZ

Technicien de laboratoire

Laboratoire central d'hématologie – secteur hématologie moléculaire.

Hôpital Saint-Louis – A.P.-H.P.

REMERCIEMENT

Je tiens à remercier dans un premier temps, toute l'équipe pédagogique de l'Université Pierre et Marie Curie – Paris6 et les intervenants professionnels responsables de la formation « DU assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » pour la partie théorique.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Jean-Michel CAYUELA pour l'aide et les précieux conseils qu'il m'a apporté, son expérience dans le domaine de la qualité, son soutien, sa grande disponibilité et son écoute. MERCI !!

Le Docteur Kheïra BELDJORD, pour son expérience aiguisée dans le domaine immunogénétique, pour le temps qu'elle m'a consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations et ses corrections pertinentes. MERCI !!

Nelly DEANGELIS, surveillante générale du laboratoire, pour m'avoir inscrit au D.U. ASSURANCE QUALITE, et me permettre de mener à bien ce projet.

Ainsi que toute ma reconnaissance à tout le personnel du laboratoire central d'hématologie pour leur soutien et leur disponibilité.

SOMMAIRE

	PAGE
ABREVIATION	6
<u>1- INTRODUCTION</u>	7
<u>2- MISE EN EVIDENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS</u>	12
<u>2-1- Description du processus analytique</u>	12
<u>2-2- Schématisation du processus</u>	16
2-2-1- Première étape : le prélèvement diagnostique	18
2-2-2- Deuxième étape : le prélèvement de suivi de la maladie résiduelle.	18
<u>2-3- Analyse des différents dysfonctionnements observés</u>	20
<u>3- CHOIX DES INDICATEURS QUALITE</u>	22
<u>3-1- Point critique numéro (1) : l'infiltration blastique post ficoll</u>	22
3-1-1- Présentation du point critique	22
3-1-2- Choix de l'indicateur qualité	23
3-1-3- Plan d'action	23
3-1-4- Conclusion	23
<u>3-2- Point critique numéro (2) : quantification erronée des ADN</u>	24
3-2-1- Présentation du point critique	25
3-2-2- Choix de l'indicateur qualité	25
3-2-3- Plan d'action	25
3-2-4- Conclusion	26
<u>3-3- Point critique numéro (3) : nombre de cibles insuffisantes.</u>	26
3-3-1- Présentation du point critique	26
3-3-2- Choix de l'indicateur qualité	27
3-3-3- Plan d'action	27
3-3-4- Conclusion	28
<u>4- DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	29
BIBLIOGRAPHIE	31
ANNEXE	32

ABREVIATION

A.D.N. : Acide DésoxyriboNucléique.

AS-RQ-PCR : PCR Quantitative en temps Réel Allèle Spécifique

L.A. : Leucémie Aiguë

MRD : Minimum Residual Disease - Maladie résiduelle minimale

PCR : Polymerase Chain Réaction

AJO : Amorce Spécifique des Jonctions

1- INTRODUCTION

Les Leucémies, cancer du système hématopoïétique, sont des proliférations malignes aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de précurseurs des cellules sanguines bloqués à un stade précoce de leur maturation. Ce sont des affections rares (2 à 3% de tous les cancers), avec une incidence de l'ordre de 5 à 10 pour 100.000 individus par an en France. Parmi ces Leucémies, 40% sont dites leucémies aiguës (LA) car formes agressives. Elles font partie des cancers les mieux étudiés, ayant bénéficiées des grandes avancées immunologiques et technologiques, et aussi en raison de l'accessibilité aisée aux cellules hématopoïétiques (sang, moelle osseuse). Si la majorité des LA (85%) surviennent *de novo*, sans étiologie identifiée, certaines d'entre elles peuvent être secondaires à divers causes: exposition professionnelle au benzène ou à ses dérivés, chimiothérapie antérieure (agents Alkylants, Etoposide, Anthacyclines...) ou radiothérapie, hémopathie chronique préexistante (syndrome myéloprolifératif ou myélodysplasique), susceptibilité génétique (trisomie 21, déficit immunitaire congénital).

Les classifications des LA sont basées sur la cytomorphologie et l'immunophénotypie (FAB, EGIL). On distingue ainsi 2 grandes catégories de LA: la LA myéloïde (LAM) et la LA lymphoblastique (LAL) au sein de laquelle on distingue les LAL-B et les LAL-T. Les LAM sont plus fréquentes que les LAL : 2500 nouveaux cas de LAM et 1000 nouveaux cas de LAL par an en France. Les LAM prédominent chez l'adulte (avec une médiane autour de 60 ans, et une incidence qui augmente pour atteindre de 10 pour 100 000 sujets de 80 ans et plus). Les LAL représentent 80% des LA de l'enfant et 20% des LA de l'adulte ; elles ont 2 pics de fréquence : chez l'enfant de 2 à 10 ans (75% des cas sont diagnostiqués avant 6 ans) et chez l'adulte vers 70 ans.

Avec l'avènement de la génétique moléculaire et le développement de la cytogénétique les classifications ont évolué vers des entités biologiques plus homogènes et des groupes cliniques pertinents. En effet, la présence de certaines anomalies chromosomiques ou géniques particulières, revêt une importance de premier ordre dans le pronostic et la stratégie thérapeutique.

BIOLOGIE DES LEUCEMIES AIGUES LYMPHOBLASTIQUES :

Les LAL sont des proliférations clonales développées à partir d'une cellule lymphoïde précurseur bloquée à un stade précoce de sa différenciation. Cette prolifération siège initialement dans la moelle osseuse puis envahit le sang et certains organes comme les ganglions ou la rate, entraînant un syndrome tumoral (hépatosplénomégalie, adénopathie...). Bien qu'étant une maladie rare (environ 1 cas pour 100 000), les LAL est le cancer le plus fréquent chez l'enfant, représentant environ 30 % de toutes les tumeurs pédiatriques.

Le rôle de la biologie dans la prise en charge des LAL est essentiel pour 3 raisons principales :

- Pour l'alarme diagnostique, car si les signes cliniques peuvent être évocateurs, c'est avant tout la mise en évidence d'anomalies importantes de l'hémogramme qui conduira à l'orientation urgente vers un centre hématologique spécialisé. Il est important de rappeler que cet examen de base, est effectué dans tous les laboratoires de Biologie Médicale et se réalise en quelques heures
- Pour le diagnostic de LA qui est exclusivement morphologique, pour la classification immunologique par immunophénotypie, et pour la caractérisation génétique qui fait appel à la biologie moléculaire et à la cytogénétique. Parmi ces facteurs biologiques spécifiques, certains conditionnent le pronostic, et sont donc indispensables à la stratification thérapeutique moderne.
- Pour le suivi de la cinétique de la réponse précoce au traitement ou suivi de la Maladie Résiduelle Minimale (MRD). La MRD, sujet de notre travail, nécessite d'être présentée indépendamment. De plus, la MRD dans les LAL ayant bénéficié d'une standardisation poussée, nous n'aborderons par la suite que cette catégorie.

LA MALADIE RESIDUELLE MINIMALE (MRD) : DEFINITION ET PRESENTATION DU PROJET

C'est la persistance chez un patient en rémission complète, de cellules tumorales résistantes au traitement et présentes à un niveau inférieur au seuil de détection par l'analyse cytomorphologique. La MRD prend en compte les anomalies génétiques de

la leucémie, la pharmacogénétique. Sa mesure est importante pour l'évaluation de la réponse au traitement, ainsi que la stratification. Elle intervient également dans le pronostic, et permet notamment d'être prédictive du risque de rechute.

Ce concept de la MRD est associé de manière inhérente aux progrès thérapeutique dans les LAL. Plus de 80% des enfants et plus de 40% des adultes peuvent être traités avec succès avec les protocoles modernes supplémentés par l'allogreffe de cellules souches pour les patients à hauts risques. L'objectif final du suivi de la MRD, par utilisation de techniques sensibles, quantification moléculaire spécifique de la cellule leucémique, est l'estimation fiable de la cinétique de réponse aux traitements afin de distinguer les patients à risque élevé de rechute et qui nécessitent une thérapie supplémentaire, de ceux à faible risque et pour lesquels des traitements moins agressifs peuvent être envisagés (fig 2).

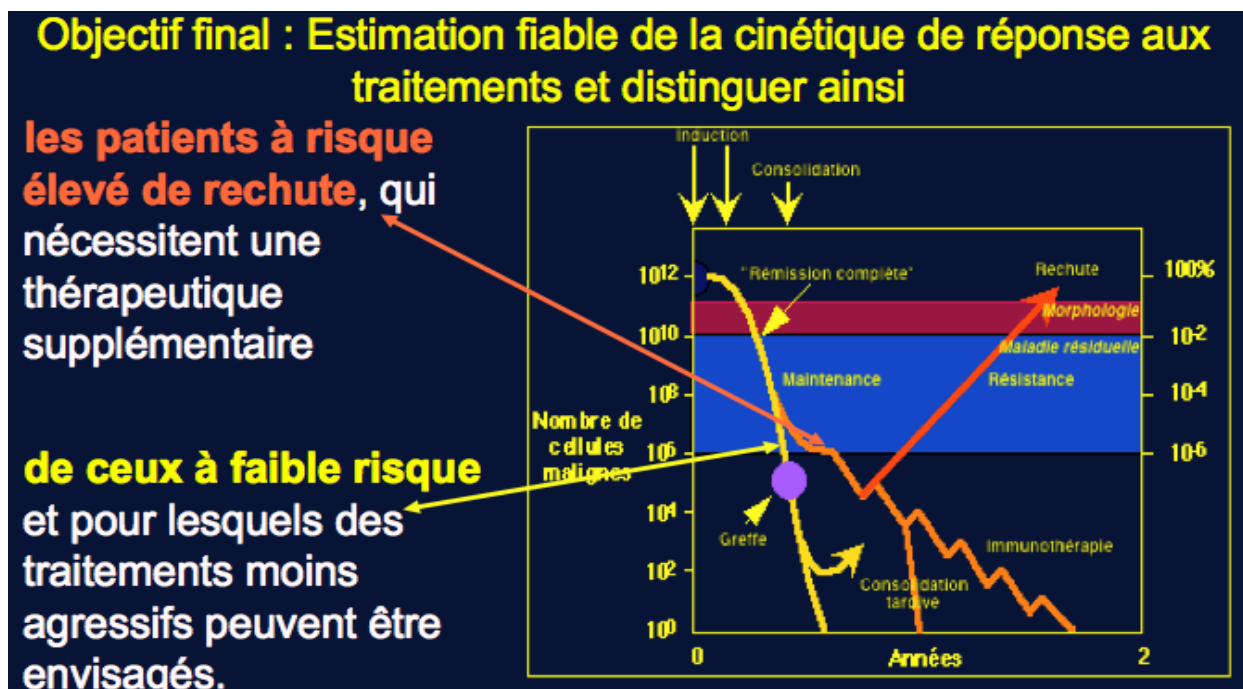


Figure 2. Ce graphe représente l'intérêt de la détection de la MRD dans les LAL afin d'estimer de façon le plus stable la réponse aux traitements. On peut observer une courbe en jaune correspondant au patient à faible risque et pour lesquels des traitements moins agressifs peuvent être envisagés, et en orange les patients à risque élevé de rechute qui nécessite une thérapie supplémentaire.

La méthode d'analyse développée au laboratoire permet la quantification des cellules leucémiques encore présentes à l'issue des deux premiers blocs de traitement, le traitement d'induction (MRD1) et le traitement de consolidation (MRD2), alors que le patient est en rémission complète c'est à dire la disparition du syndrome tumoral et

l'absence de blastes leucémiques en analyse cytomorphologique de la moelle osseuse (fig 3) (ANNEXE I-présentation du laboratoire). Elle se déroule en deux temps :

- 1- L'identification des marqueurs leucémiques Ig/TCR -traité dans le chapitre 2-1-description du processus- qui s'effectue à partir du prélèvement diagnostique, avec la construction d'un outil de suivi propre à chaque patient. Cet outil spécifique permettra de détecter par PCR quantitative en temps réel allèles spécifique (AS-RQ-PCR) au moins 1 cellule leucémique sur 10 000 cellules normales. Dans l'idéal, le nombre de marqueurs utilisables pour chaque patient doit être au minimum de deux.
- 2- La quantification des cellules leucémiques résiduelles sur les prélèvements de suivi MRD1 et MRD2, en utilisant l'outil construit, spécifique et sensible.

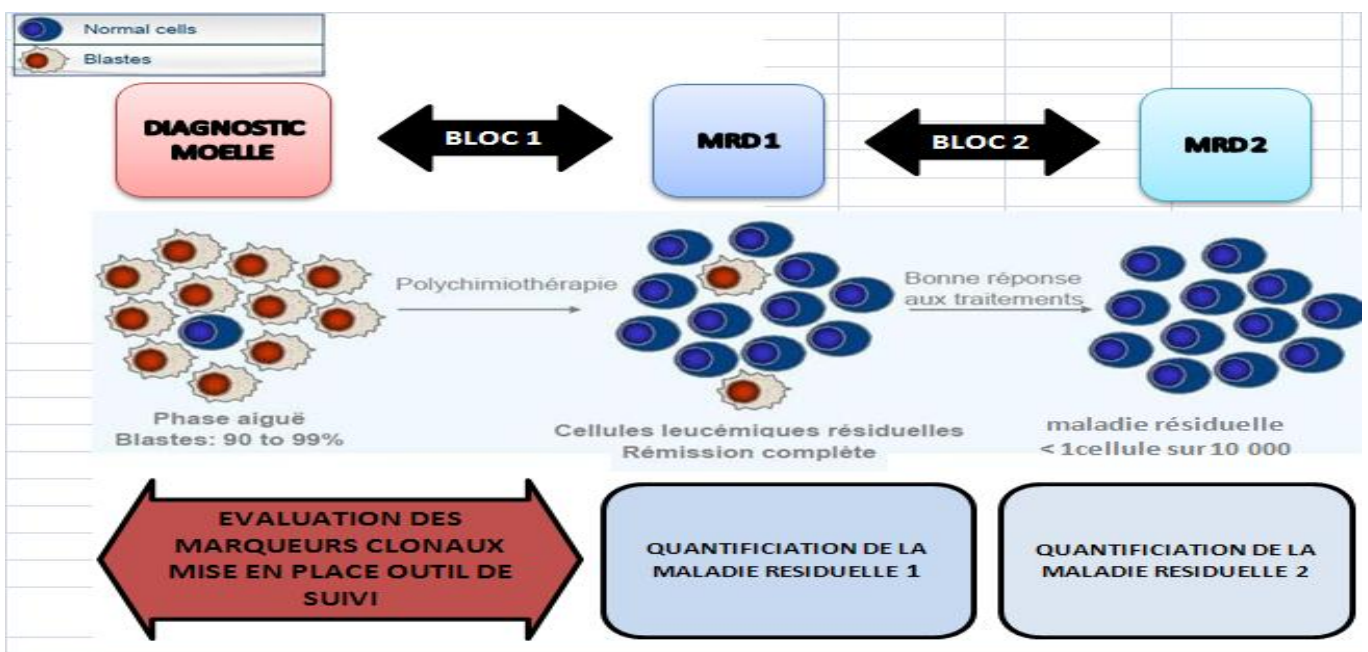


Figure 3. Représentation schématique de la méthode quantitative d'évaluation de la réponse au traitement. Au diagnostic de la leucémie, les blastes sont utilisés pour l'évaluation des marqueurs de clonalité. Ces marqueurs sont mis à profit pour la construction d'un outil spécifique de quantification des cellules leucémiques résiduelles. Au cours du traitement, lorsque le patient est en rémission cytologique complète, cet outil est utilisé pour évaluer la réponse au traitement. L'objectif thérapeutique à l'issue du bloc n°2 est de réduire la maladie résiduelle en dessous de 1 cellule leucémique sur 10 000cellules normales.

La qualité de l'analyse de la quantification de la MRD doit être maîtrisée et satisfaire l'attente des patients et des médecins. Du fait de la complexité technologique de cette méthode quantitative et la nécessité de rendu de résultats décisionnels

reproductibles entre les centres investigateurs, la standardisation de cette méthode est nécessaire ainsi que l'interprétation de résultats avec des « Guidelines ». (ANNEXE II-Guidelines)

Depuis 2007, tous les laboratoires d'analyse de biologie médicale sont soumis à des exigences de compétences et de qualité fournis par la nouvelle Norme internationale NF EN ISO 15189. Dans le chapitre 4 de la norme « Exigences relatives au management », il est précisé que la direction doit élaborer sa politique qualité. Elle doit s'assurer qu'elle fournit un cadre pour établir et satisfaire à ces objectifs.

A ce sujet, la Norme NF EN ISO 15189 précise dans son sous chapitre 4.12 Amélioration continue, alinéa 4.12.4 : « *La direction du laboratoire doit mettre en place des indicateurs qualité permettant de surveiller et d'évaluer de manière systématique la contribution du laboratoire aux soins prodigués au patient. Lorsque ce programme identifie des opportunités d'amélioration, la direction du laboratoire doit les saisir, quel que soit le domaine concerné. Elle doit s'assurer que le laboratoire d'analyses de biologie médicale participe à des activités d'amélioration de la qualité concernant des domaines pertinents et les résultats des soins prodigués aux patients.* »

Nous présentons dans ce mémoire les principes et les résultats de notre démarche d'amélioration continue de la qualité des analyses de quantification des cellules leucémiques résiduelles par AS-RQ-PCR : (1) analyse des dysfonctionnements impactant sur la qualité de ce processus analytique ; (2) choix des indicateurs qualité pertinents ; (3) évaluation de l'efficacité des actions correctives entreprises.

Pour pouvoir évaluer et améliorer la qualité du processus de quantification des cellules leucémiques résiduelles par AS-RQ-PCR au laboratoire, nous avons mis en œuvre la méthodologie suivante :

- Description du processus analytique : du prélèvement jusqu'à la transmissions des comptes rendu d'analyse ;
- Analyse des dysfonctionnements impactant sur la qualité de ce processus analytique ;
- Choix des indicateurs qualité pertinents ;
- Évaluation de l'efficacité des actions correctives entreprises.

2- MISE EN EVIDENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS

2-1- Description du processus analytique

L'analyse quantitative de la MRD est un processus complexe qui s'effectue à partir de prélèvements médullaires après enrichissement en cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, blastes) sur gradient de Ficoll. Elle débute par l'identification de marqueurs génétiques lymphoïdes spécifiques de la leucémie sur le prélèvement diagnostique puis leur séquençage. Ces marqueurs correspondent à des réarrangements des gènes Ig et TCR. Les informations de séquences sont utilisées pour construire des systèmes de RQ-PCR spécifiques des allèles (AS-RQ-PCR) réarrangés de ces gènes, et donc des cellules leucémiques. Ces systèmes d'AS-RQ-PCR sont ensuite utilisés, sur les prélèvements de suivis réalisés en cours de traitement, pour quantifier la maladie résiduelle. Du fait d'une certaine instabilité de ces marqueurs au cours de l'évolution de la maladie sous traitement, il est recommandé de suivre la maladie résiduelle avec un minimum de 2 cibles, choisies en privilégiant les marqueurs les plus stables.

Au cours de la différenciation lymphoïde normale, chaque lymphocyte réarrange son génome au niveau des locus Ig (différenciation lymphoïde B) et TCR (différenciation lymphoïde T) par un mécanisme de recombinaison somatique appelé la recombinaison VDJ. La région hypervariable ou CDR3 est unique pour chaque lymphocyte. La région CDR3 constitue un site de diversification et est donc un marqueur moléculaire de clonalité dans toute expansion lymphoïde (fig 4).

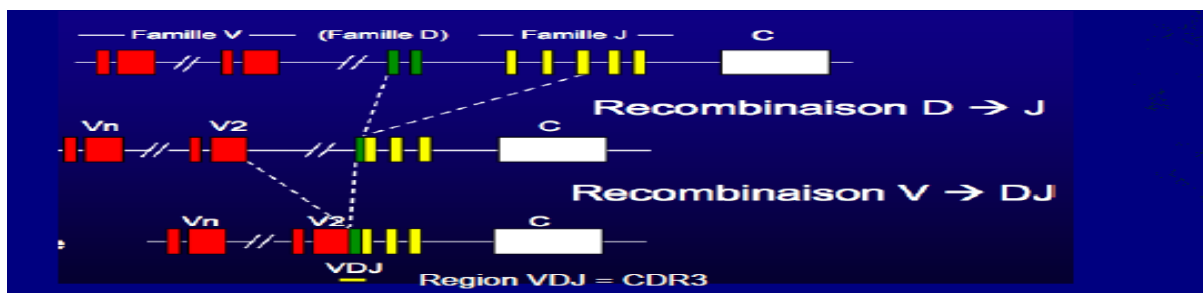


Figure 4. Représentation schématique d'un réarrangement VDJ ou CDR3 site de diversification. Ce réarrangement recombine un segment V2 avec un segment de la famille D et un segment de la famille

J. C'est une région hypervariable qui est unique pour chaque lymphocyte, correspondant au marqueur de clonalité qui est spécifique des cellules leucémiques

Ce mécanisme de recombinaison, associé à la variabilité génétique des segments géniques constituant les locus Ig et TCR, permet la genèse d'une séquence nucléotidique jonctionnelle spécifique de chaque réarrangement et identifiant donc le lymphocyte qui la porte. Une prolifération lymphoïde clonale pourra donc être caractérisée par la mise en évidence des réarrangements des locus Ig/TCR qui lui sont propres. Au laboratoire, ces réarrangements sont identifiés par des stratégies d'amplification mettant en œuvre des PCR multiplexes fluorescentes, suivies par une analyse électrophorétique sur un séquenceur d'ADN ou analyse Genescan (fig 5). Les produits de PCR correspondant au clone leucémique sont ensuite séquencés.

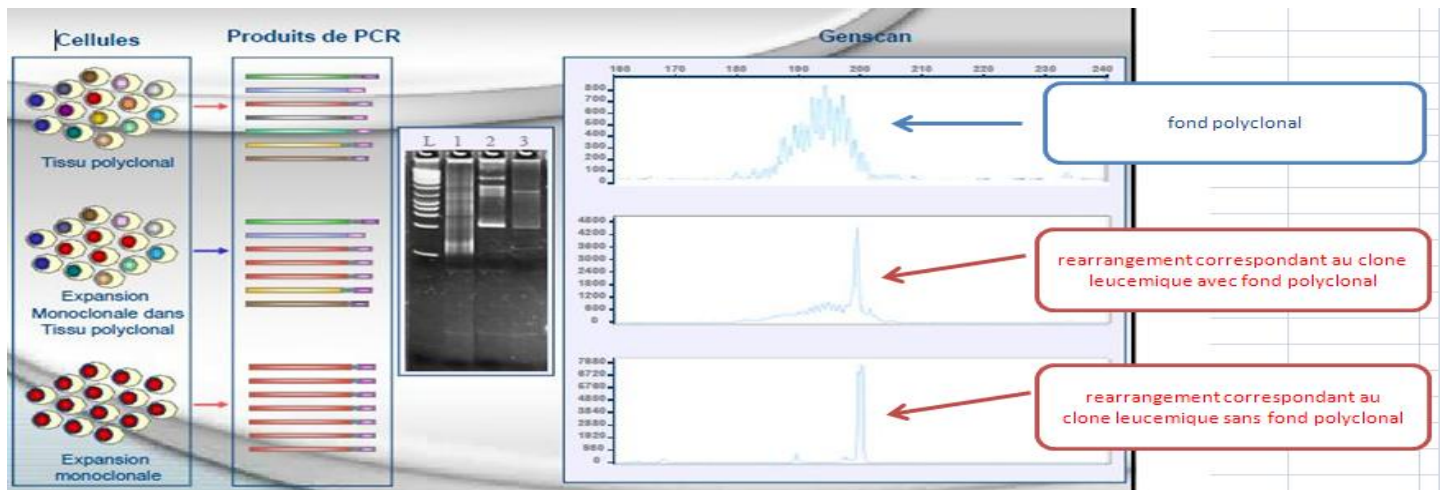


Figure 5. «Analyse Genescan des produits d'amplification par PCR des jonctions VDJ». Du haut vers le bas : profil Genescan correspondant à une prolifération lymphoïde polyclonale ; à une population clonale dans un fond histologique polyclonal ; à une expansion lymphoïde monoclonale. Le diagnostic de clonalité revient donc à l'identification d'un pic.

Le séquençage des réarrangements VDJ, le CDR3, permet de déterminer la diversité de chaque jonction (nombre de délétions et d'insertions). L'identification précise des jonctions est un critère indispensable aux caractères clonospécifiques et hautement sensible. Cette caractéristique permet de dessiner des amorces (AJO) spécifiques de chacune des jonctions identifiées qui seront utilisées pour la quantification des cellules leucémiques par AS-RQ-PCR (fig 6).

OF	tmpseq_0	ACACAGCCACGTATTACTGTGCACGGCCTCCTCGGTTGGGGAGTTATFATCTTGACTACTGGGCCAGG
100 (89/89)	<u>IGHV2-70*11</u>
100 (10/10)	<u>IGHD3-16*02</u>	-----
100 (42/42)	<u>IGHJ4*02</u>	-----

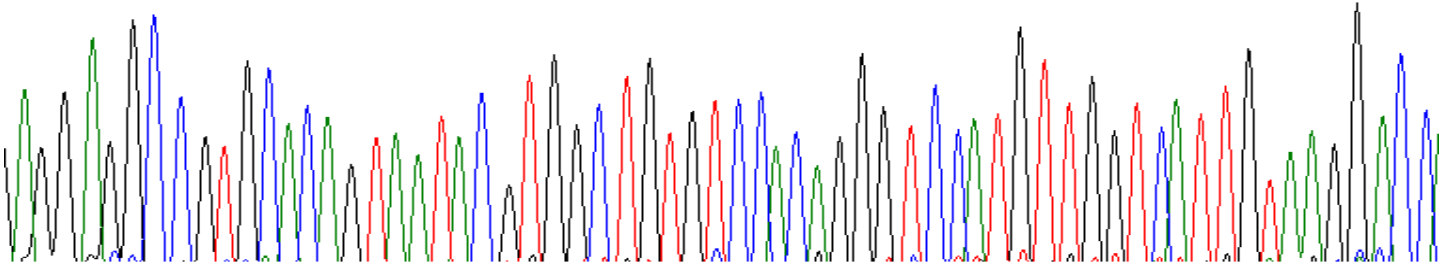


Figure 6. « L'analyse de séquences ». Nous pouvons observé un chromatogramme correspondant au locus Ig. Il est caractérisé par la présence de pics de couleurs différentes, correspondant à un nucléotide particulier. Cette suscession de nucléotide décrit une séquence. Cette séquence est ensuite analysée par comparaison à une séquence de référence. On peut ainsi identifier ici en marron des nucléotides du gène V, un ajout de nucléotides (en rouge), en vert des nucléotides du gène D (avec perte de nucléotides de chaque extrémité) et en bleu des nucléotides du gène J. On pourra configurer une AJO sur le CDR3 en privilégiant la région DJ.

Les systèmes de AS-RQ-PCR utilisés sont pour partie déjà configurées (amorce anti-sens et sonde consensus), il reste à configurer l'amorce sens en fonction du système choisi (fig 7).

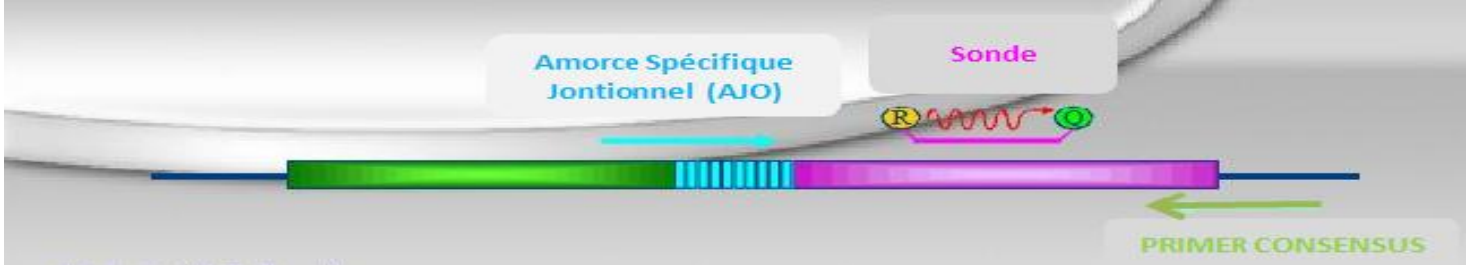


Figure 7. « système AS-RQ-PCR ». Le système d'amplification allèle spécifique est constitué d'une amorce sens spécifique, complémentaire de la région jonctionnelle, d'une amorce anti-sens et d'une sonde Taqman non spécifiques.

Chaque système d'amplification ainsi configuré est testé sur deux types d'ADN : l'ADN extrait des cellules leucémiques et l'ADN extrait de cellules mononuclées sanguines de sujets sains. Ces tests vérifient que les amorces (AJO) dessinées permettent d'amplifier les réarrangements cibles de façon efficace, spécifique et sensible. Si les tests sont concluants, les systèmes d'amplification sont retenus et utilisés ultérieurement pour analyser les points de suivi (fig 8).

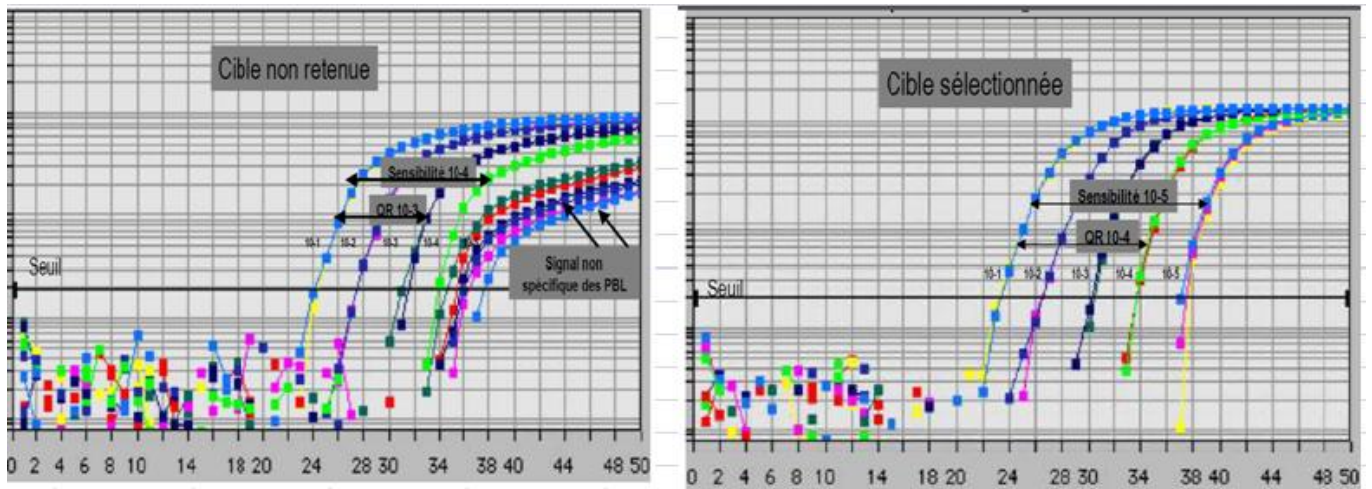


Figure 8. AS-RQ-PCR de deux cibles, dont l'une à gauche, non retenue avec la présence de signal non spécifique des PBL (pools de sujets sains) et une sensibilité de 10^{-4} (1 cellule sur 10 000) et un seuil quantitatif (QR) de 10^{-3} . A droite, on note un cible retenue bien spécifique sans présence de signal non spécifique des PBL avec sensibilité à 10^{-5} et un QR à 10^{-4} .

La MRD est déterminé par comparaison du niveau d'amplification obtenu (cycle seuil ou Ct) avec une gamme de calibration réalisée par dilution en série de l'ADN du diagnostic dans un mélange d'ADN issus de donneurs sains (fig 9). La qualité des ADN amplifiés doit toujours être vérifiée par amplification par RQ-PCR d'un gène de référence : l'albumine.

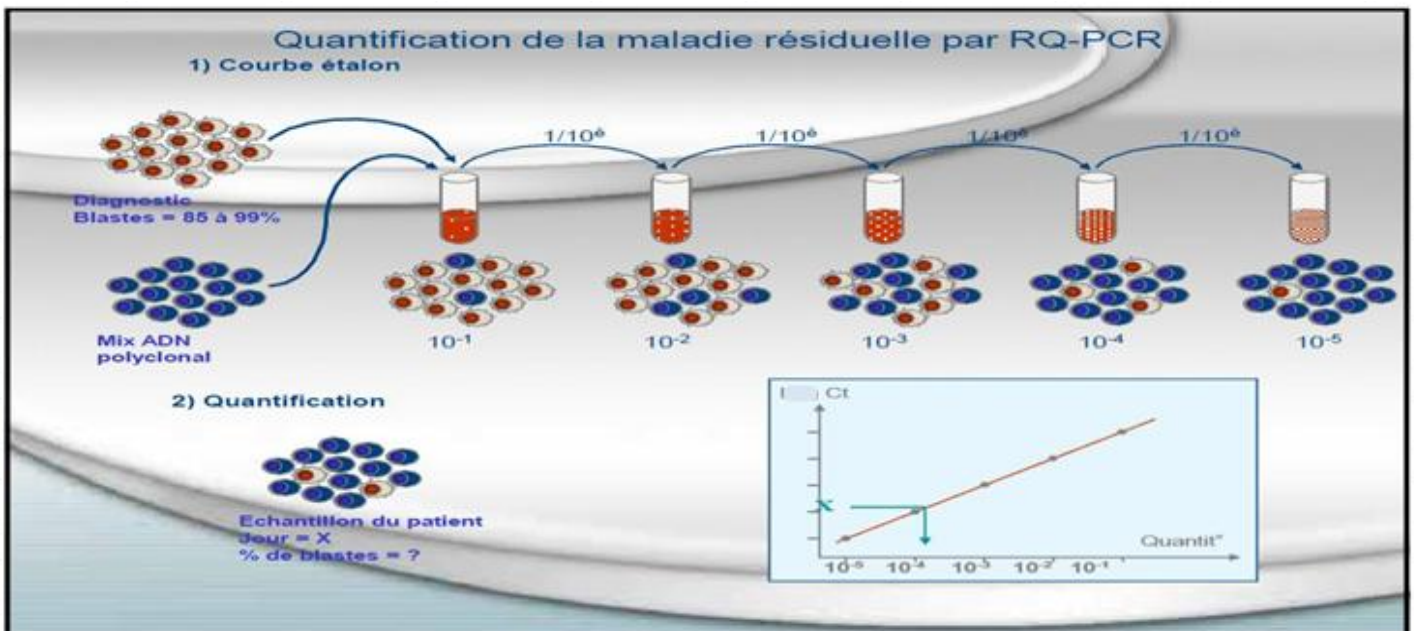


Figure 9. « Quantification de la maladie résiduelle par AS-RQ-PCR ». Une courbe de calibration (cartouche en bas à droite) est établie par dilution en série (de 10^{-1} à 10^{-5}) de l'ADN leucémique dans l'ADN de cellules lymphoïdes polyclonales. Cette courbe d'étalonnage permet ensuite de faire correspondre un Ct à un nombre de cellules leucémiques.

Les résultats de quantification par AS-RQ-PCR sont interprétés selon des « GuideLines » européennes, règles standardisées. Elles sont basées sur la notion de sensibilité reproductible (QR) niveau maxima auquel les résultats sont précisément quantifiés et de sensibilité maximale, niveau maximal mais non reproductible de détection. Le taux de MRD peut-être alors quantifié.

L'ensemble de la procédure dans 1 cas individuel donné nécessite au minimum 6 semaines, et en pratique 7 à 8 semaines. Une mise à disposition simultanée des résultats de post-induction et de post consolidation allège sensiblement la lourdeur de l'organisation.

2-2- Schématisation du processus

Le processus complexe de l'analyse de la MRD comporte 4 étapes que l'on a répertoriées et décrites dans un tableau (tableau 1). Ce tableau nous a permis de lister les différents points critiques et de les comptabiliser en tenant compte de critères prioritaires pour la réalisation de l'analyse notamment : l'importance de la richesse blastique dans l'étape1, l'importance des cibles représentatives dans l'étape2, l'importance de la sensibilité, spécificité et stabilité des cibles dans l'étape3, et l'importance des « Guidelines » dans l'étape4

Dans un souci de clarté et de simplification, nous avons subdivisé le processus en deux étapes qui correspondent respectivement à la prise en charge du prélèvement diagnostique et la quantification de la maladie résiduelle. Cette subdivision intègre les trois phases principales des méthodes d'analyses biologiques : pré-analytique (logistique et traitement du prélèvement), analytique (réalisation de la quantification de la MRD), et post-analytique (interprétation des résultats, validation rendu du résultat et archivage).

ETAPES PRINCIPALES D'ETUDES DE LA MRD PAR AS-RQ-PCR

	BON	A REVOIR	A FAIRE
Etape 1: Préanalytique: objectif: ADN homogène de concentration précise :			
conformité réception			
Utiliser un prélèvement infiltré			
Séparation des cellules mononucléées par centrifugation en gradient de densité			
Evaluation du % de blastes par CMF			
Extraction de l'ADN à partir de 10x10 ⁶ cellules			
Homogénéisation totale			
Dosage colorimétrique précis (type "nanodrop") de la solution mère			
Dilution homogène de l'ADN de travail			
Qualification de l'ADN de travail: dosage colorimétrique précis (nanodrop) + dosage génique par RQ-PCR			
Etape 2: Analytique :Identification des cibles Ig/TCR selon protocoles standardisés			
Analyse par PCR des différents loci Ig/TCR: IgH, IgKappa, TCR Delta, TCR gamma, TCR beta. La hiérarchie de choix des cibles est différentes selon le profil immunophénotypique et leur stabilité durant l'évolution clinique			
Analyse des PCR par migration (acrylamide et/ou séquenceur). Cohérence intensité signal avec le % de blastes. Reconnaissance de sous-clones éventuels			
Choix des cibles monoclonales à séquencer après étude globale du dossier patient			
Séquençage dans les 2 sens des réarrangements sélectionnés			
Interprétation des séquences par référence aux bases de données			
Sélection des cibles pour la PCR MRD			
Etape 3: test de sensibilité et de spécificité pour chaque cible sélectionnée			
Configuration des "amorces" allèles (CDR3) spécifiques dit AJO (Anti Junctional Oligonucleotide)			
Commande des AJO			
Analyse de dilutions de l'ADN diagnostic par RQ-PCR à l'aide de chacun des AJO			
Interprétation de la sensibilité/spécificité pour chaque primer/cible; sélection d'AJO répondant aux critères			
Validation des cibles			
Etape 4: Analyse de la MRD sur les prélèvements de suivi			
Quantification-qualification de l'ADN de suivi par dosage génique (dosage génique par RQPCR)			
Analyse par RQ-PCR allèle spécifique de ces prélèvements de suivi			
Interprétation des résultats de PCR MRD selon des règles standardisées			
Calcul du taux de MRD			
Délai de rendu			
Envoi compte rendu			

Tableau 1. Enregistrement « Etapes principales d'études de la MRD ».

2-2-1- Première étape : le prélèvement diagnostique

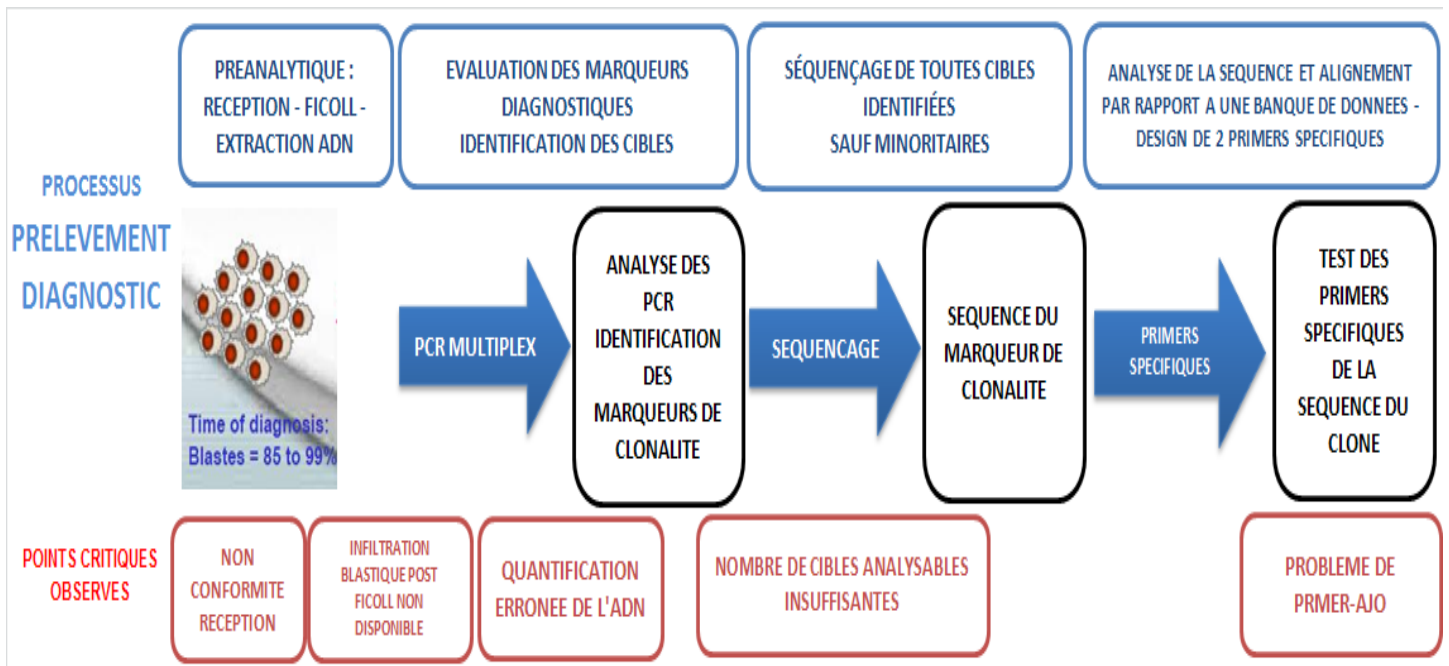
Dans le traitement pré-analytique, le prélèvement médullaire infiltré, accompagné de sa prescription arrive à la réception laboratoire. Après vérification de la conformité, le

prélèvement est enregistré dans le logiciel de gestion du laboratoire, GLIMS. Les cellules mononuclées sont récupérées par centrifugation sur gradient de Ficoll et l'infiltration blastique est vérifiée. Le culot cellulaire récupéré, l'ADN est extrait. Dans le traitement analytique, La qualité de l'ADN est alors vérifiée par RQ-PCR albumine. L'évaluation diagnostique est réalisée par la détection des cibles Ig/TCR en réalisant plusieurs PCR multiplex. L'analyse et le choix des marqueurs leucémiques pour le suivi est faite en fonction de leur stabilité durant l'évolution, et selon le profil immunophénotypique. Leur identification se poursuit par leur séquençage. La séquence est étudiée par alignement par rapport à une banque de données, et la région CDR3 est analysée. Une amorce spécifique des jonctions (AJO) du clone séquencé est configurée. Après commande et réception de l'AJO, le choix est validé par un test de spécificité sur les cellules leucémiques identifiées. (fig 10-A)

2-2-2- Deuxième étape : le prélèvement de suivi de la maladie résiduelle.

Dans le traitement pré-analytique, le prélèvement médullaire, accompagné de sa prescription arrive à la réception laboratoire. Après vérification de la conformité, le prélèvement est enregistré dans le logiciel de gestion du laboratoire, GLIMS. Le suivi de la MRD se fait après enrichissement en cellules mononuclées sur gradient de ficoll, afin d'augmenter la sensibilité de détection. Le culot cellulaire récupéré, l'ADN est extrait. Dans le traitement analytique, La qualité de l'ADN diagnostic est alors vérifiée par RQ-PCR albumine. L'analyse de quantification des marqueurs de la maladie résiduelle est réalisée par AS-RQ-PCR avec l'AJO sélectionnée et validée. Une sensibilité d'au moins une cellule sur 10 000 est attendue. L'interprétation des résultats se fait par rapport à des « guides lines », des règles européennes standardisées. Dans la phase post-analytique, l'analyse est validée dans le système informatique GLIMS. Le compte rendu est imprimé et envoyé au médecin prescripteur. Un dossier patient est constitué regroupant toutes les informations : analyse de la cytologie, de l'immuno-phénotypage, du caryotype, et le bilan oncogénétique avec les différents profils de PCR, de séquences, des tests et l'analyse de quantification de la maladie résiduelle AS-RQ-PCR. (fig 10-B)

9-A



9-B

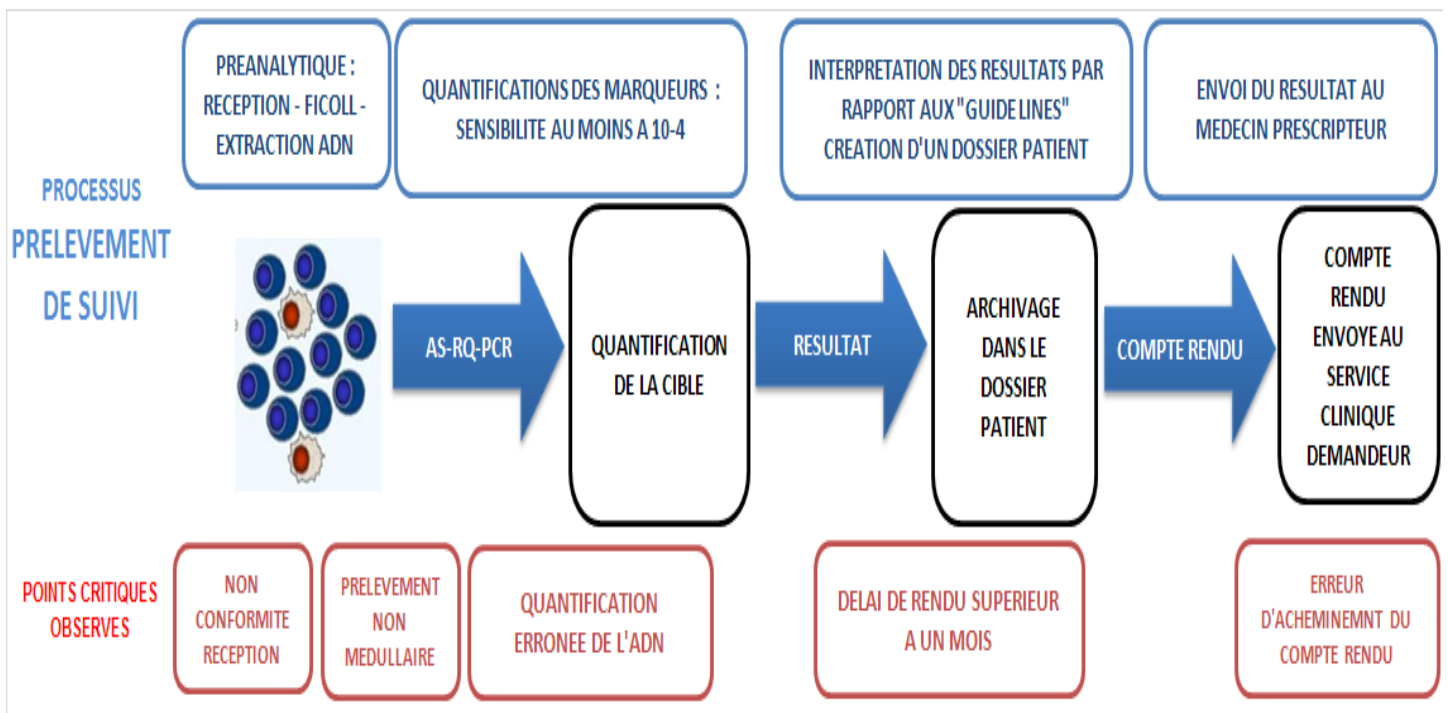


Figure 10. Schéma du processus d'analyse quantitative de la réponse au traitement et dysfonctionnements observés. **A. Prise en charge du prélèvement diagnostique. B. Quantification de la maladie résiduelle.** En haut, dans les cadres bleus sont représentées les grandes étapes fonctionnelles du processus ; au milieu, sont représentés les principaux actes techniques ; en bas, dans les cadres rouges, sont représentés les principaux dysfonctionnements observés.

2-3- Analyse des différents dysfonctionnements observés

Au moment de la mise en place de ces techniques au laboratoire, 8 points critiques ont été identifiés dont certains concernent les deux étapes : **non conformité réception, une quantification erronée de l'ADN** ; d'autres concernant seulement la première étape : **une infiltration blastique post ficoll non disponible ; un nombre de cibles analysables insuffisantes ; un problème de primer-AJO** ; et d'autres seulement pour la 2eme étape, la quantification de la MRD : **réception d'un prélèvement non médullaire ; un délai de rendu supérieur à 1mois ; erreur d'acheminement du compte rendu.**

Après identification de ces points critiques, nous décidons par la suite de les synthétiser dans un tableau pour une analyse plus approfondie et plus ciblée. En effet pour une action qualité au plus juste, nous allons nous concentrer sur les événements aux fréquences les plus importantes.

LE DIAGRAMME DE PARETO permet de hiérarchiser les problèmes en fonction du nombre d'occurrences et ainsi de définir des priorités dans le traitement des problèmes. Ce graphique représente l'importance des différentes causes sur un phénomène.



Cet outil est basé sur la loi des 80/20. Autrement dit la mise évidence les 20% de causes sur lesquelles il faut agir pour résoudre 80% du problème. Il sera utile pour déterminer sur quels leviers on doit agir en priorité pour améliorer de façon significative la situation. Cet outil, relativement simple, permet d'exposer de façon factuelle une problématique. Les phrases du type " On pense que le problème vient de ", "si on résout ce problème cela va sans doute améliorer" sont ainsi évitées. Le diagramme se présente sous la forme d'une série de colonnes triées par ordre

décroissant, accompagné d'une courbe des valeurs cumulées de toutes les colonnes. Ce diagramme est construit en plusieurs étapes : la collecte des données, le classement des données au sein de catégories, le calcul du pourcentage de chaque catégorie par rapport au total, et un tri des catégories par ordre d'importance. (table2/fig 11).

Table2. Analyse quantitative des dysfonctionnements observés.

Type de dysfonctionnement	Nombre d'occurrence	%	% cumulé
infiltration blastique non disponible ou erronée	250	47%	47%
quantification erronée des ADN	90	17%	63%
nombre de cibles insuffisantes	80	15%	78%
problème de primer - AJO	37	7%	85%
délai de rendu >1mois	30	6%	91%
erreur acheminement compte rendu	25	5%	95%
non conformité réception	15	3%	98%
prélèvement non médullaire	10	2%	100%
total	537	100%	

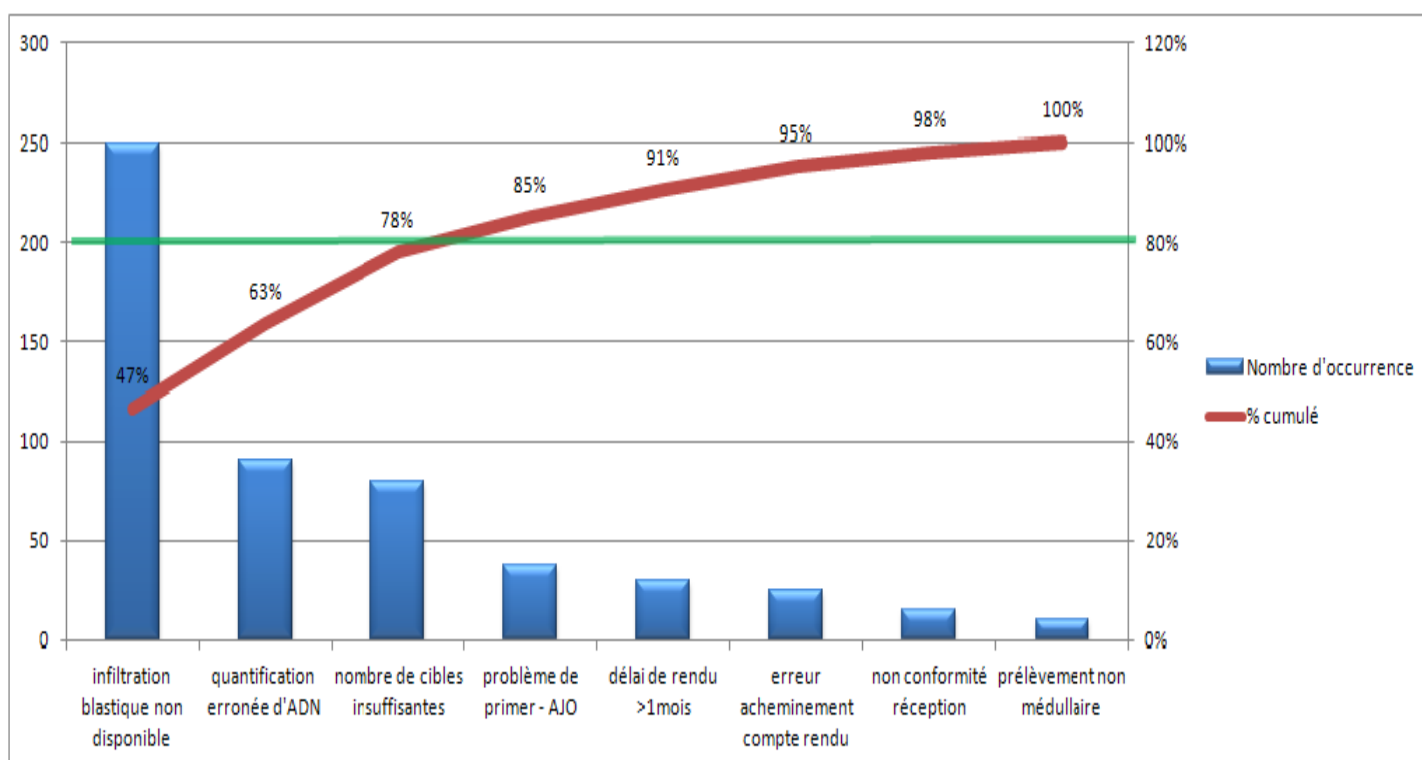


Figure 11. Exploitation des données par le diagramme de Pareto. Histogramme montrant les dysfonctionnements rangés par ordre décroissant d'occurrence (boîtes bleues). Courbe d'incidence cumulée des dysfonctionnements (trait rouge). La ligne verte permet d'identifier les dysfonctionnements responsables de 80% des occurrences.

Finalement, 3 points critiques majeures sont mis en évidence::

- (1) L'infiltration blastique post-ficoll non disponible ;**
- (2) La quantification erronée d'ADN ;**
- (3) Le nombre de cibles insuffisantes ;**

Grâce à cet outil qualité, nous avons pu mettre en évidence les causes les plus importantes. Nous avons pu mieux décider de notre plan d'action et cibler l'investissement directement sur les points critiques essentiels qui se répercutent directement sur l'objectif d'analyse quantitative de la réponse au traitement.

3-CHOIX DES INDICATEURS QUALITE

3-1- Point critique numéro (1) : l'infiltration blastique post ficoll

3-1-1- Présentation du point critique

Devant cette fréquence élevée, 47% des dysfonctionnements observés, nous avons donc décidé d'utiliser un indicateur qualité sur cette étape pré-analytique. L'infiltration blastique s'apprécie en quantifiant le pourcentage de cellules tumorales présentes dans l'échantillon cellulaire obtenu après Ficoll. C'est une donnée fondamentale pour analyser correctement les marqueurs au diagnostic et quantifier par la suite la maladie résiduelle, puisqu'elle est directement utilisée pour établir la droite de calibration permettant la quantification de la maladie résiduelle.

Pourtant cette information est soit souvent oubliée soit erronée à cause de la méthode mise en œuvre. L'évaluation de l'infiltration est analysée par coloration au May-Grunewald-Giemsa (M.G.G.) après un étalement par cytopspin. Cette technique manque de précision et d'exactitude pour qualifier au plus juste cette infiltration. En effet, différencier des cellules après cytosin n'est pas simple du fait de la déformation de la cellule suite à la centrifugation. Ce dysfonctionnement majeur a été remarqué grâce aux profils Genescan des PCR multiplex. La présence importante de fond polyclonal, trahissant ainsi le pourcentage erroné de blastes post-ficoll indiqué (fig 12).

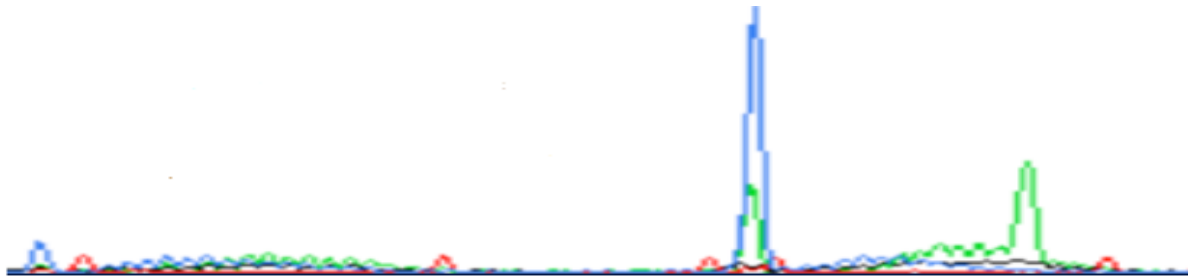


Figure 12. Profil genescan montrant un pic monoclonal en bleu avec un fond polyclonal traduisant une infiltration peut importante ou un prélèvement hémodilué.

3-1-2- Choix de l'indicateur qualité

L'indicateur que nous allons analyser est « la mesure de l'infiltration blastique ».

3-1-3- Plan d'action

Le problème de mesure de l'infiltration tumorale est dû à une erreur de calcul ou un oubli.

Pour ce qui concerne l'oubli de mesure de l'infiltration blastique, nous avons suivi le cheminement suivant : une relecture et une actualisation des procédures, une diffusion et une information sur l'ensemble de l'équipe de techniciens. Une traçabilité a été créée par un paramétrage dans GILMS.

D'autre part, en ce qui concerne l'infiltration erronée, nous travaillons actuellement sur une solution mettant en œuvre une combinaison d'anticorps qui permettra la quantification précise des blastes tumoraux et des cellules normales par cytométrie en flux multiparamétrique. Cette technique permet de définir au plus juste de ce pourcentage post Ficoll. Une organisation est en cours, avec le secteur immuno-hématologique, pour rajouter ce panel, à un moindre coût et sans impacter une surcharge de travail. En attendant la détermination du taux par coloration MGG est devenue systématique.

3-1-4- Conclusion

Pour résoudre ce point critique (1), l'indicateur "la mesure de l'infiltration blastique" a été étudié. Nous avons travaillé avec l'ensemble du personnel des différents secteurs, en mettant en place des réunions d'information par une relecture de procédure, de formation par une explication et un développement de compétences. Ce premier indicateur a permis une interaction entre les différents secteurs.

3-2- Point critique numéro (2) : quantification erronée des ADN

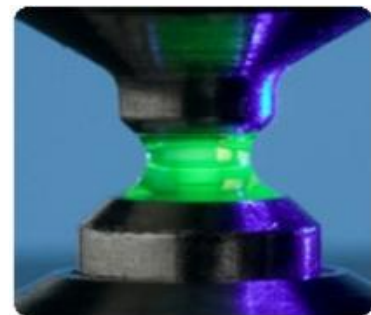
3-2-1- Présentation du point critique

17% des dysfonctionnements proviennent d'une discordance entre le dosage physique et le dosage génique des ADN. Nous avons donc décidé d'utiliser un indicateur qualité sur cette étape préanalytique de la préparation de l'ADN.

Le dosage génique correspond à la détermination du nombre de génome par quantification du nombre de copie du gène albumine (1copie=1génome). Le résultat s'exprime en CT.

Le dosage physique correspond à la mesure de la concentration en ADN par spectrophotométrie UV : Le nanodrop (fig 13). Le résultat est une DO qui permet de calculer une concentration en ng/ μ L.

Figure 13. Le nanodrop. Dès que le bras est abaissé, un système d'aimant est activé et le bras comprime la goutte d'ADN, formant une colonne de liquide. L'échantillon est maintenu entre les deux surfaces de lecture par tension de surface, permettant la mesure du spectre. La mesure est alors réalisée et la quantification est basée sur le trajet optique de 1mm



Nous avons posé l'hypothèse que ce dysfonctionnement provenait de la préparation de la matrice ADN. C'est une étape délicate. Tous les ADN sont d'abord dosés par spectrophotométrie et ajusté à 135ng/ μ L. La concentration de 135ng/ μ L est contrôlée par une 2ème mesure. Le choix de cette concentration n'est pas anodin car en introduisant 5 μ L d'ADN pour chaque réaction de RQ-PCR, il est évalué l'équivalent ADN (675ng) de 100 000 cellules. Les ADN à 135ng/ μ L sont dosés par RQ-PCR-albumine. Un standard permet de contrôler la technique. Le Ct attendu est alors de 20 +/-1Ct, compte tenu de la variabilité intrinsèque de la méthode, soit une concentration entre 50 et 200ng/ μ L. Or les écarts de Ct s'observe dans 2/3 des vas (figure12-A)

3-2-2- Choix de l'indicateur qualité

L'indicateur utilisé est « correspondance entre dosage génique et dosage physique ».

3-2-3- Plan d'action

Avant l'introduction de la technique d'extraction QIAGEN, 2/3 des ADN présentait une discordance entre les 2 méthodes de dosages. La technique d'extraction au phénol, présentait un inconvénient majeur: une trace résiduelle de phénol qui a un rôle d'inhibiteur dans les analyses de RQ-PCR.

Depuis la mise en place de la technique d'extraction sur colonne QIAGEN, Nous avons donc repris tous les ADN extrait et avons répertorié les équivalences entre le dosage génique et le dosage physique. Les résultats ont été répertoriés dans le tableau ci-dessous et représentés dans le diagramme circulaire ci-contre. On ne retrouve plus que 10.7% qui présente une discordance. Ces discordances s'expliquent par des prélèvements de mauvaise qualité, hémodilué, pauvre, hémorragique, ou une interférence avec le traitement, présentant des inhibiteurs (autre que l'hémoglobine, l'héparine...). (fig 14-15 / table3)

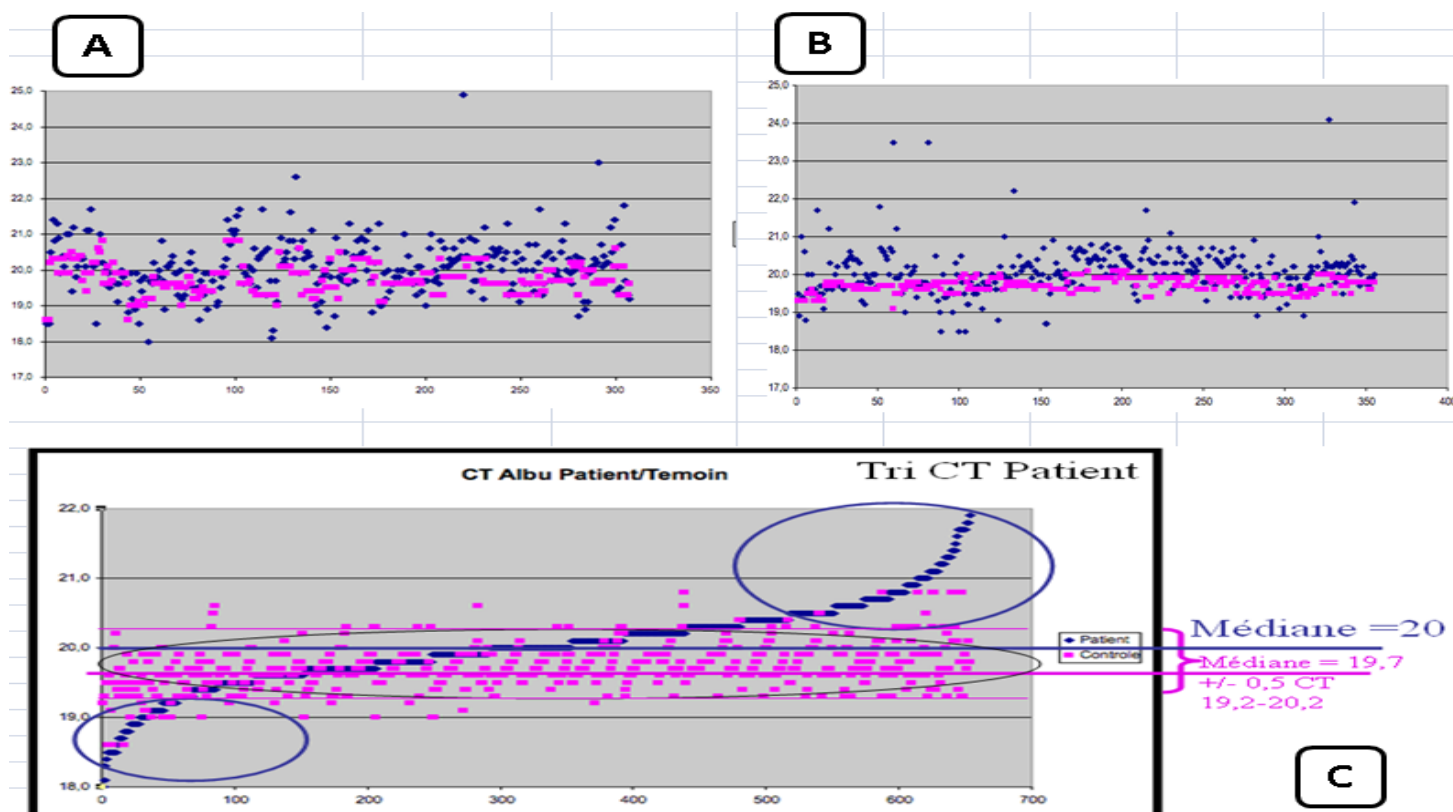


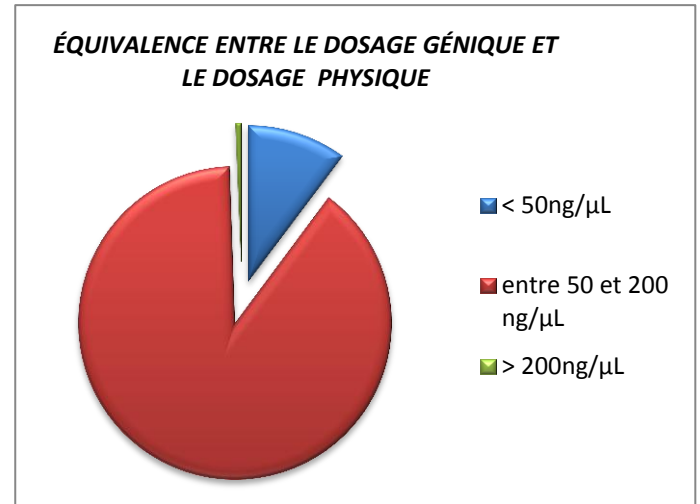
Figure 14. Variation des CT albumines (bleus) par rapport au standard (rose). L'étude se porte sur deux cas représentés en 3 schémas. On trouvera en abscisse le nombre d'échantillon et en ordonnée

le Ct albumine. : A- Etude porte sur une quantité d'ADN extrait en phénol-chloroforme et colonne silice QIAGEN B- extraction des ADN uniquement sur colonne silice QIAGEN. C- Sur ce graphe, les Ct étudiés ont été triés par ordre croissant.

Tableau2 : équivalence entre le dosage génique et le dosage physique.

dosage génique ADN extrait	nombre ADN	pourcentage
< 50ng/μL	57	10.2
entre 50 et 200 ng/μL	500	89.3
> 200ng/μL	3	0.5
	560	100

Figure 15. Diagramme circulaire



3-2-4- Conclusion

Pour résoudre ce point critique (2), nous avons étudié l'indicateur « correspondance entre dosage génique et dosage physique ». Cet indicateur est judicieux. Nous conserverons cet enregistrement : répertorier dans un tableau les CT albumines avec leur équivalent en concentration. Ceci nous permettra de vérifier régulièrement si une dérive est observée sur le traitement pré-analytique.

3-3- Point critique numéro (3) : nombre de cibles insuffisantes.

3-3-1- Présentation du point critique

15% des dysfonctionnements retrouvés pour le processus de la méthode d'analyse de la maladie résiduelle concernent le nombre de cibles insuffisantes. Nous avons donc décidé d'utiliser un indicateur qualité sur cette étape analytique de l'identification.

En 2010, au moins 1 marqueur de clonalité a été identifié en PCR multiplex dans 95% des patients, utilisable par la suite en AS-RQ-PCR à une sensibilité d'une cellule leucémique sur 10 000 cellules normales (10^{-4}). Seulement 20% des patients ont été suivi avec 2 marqueurs (fig 16). Dans les LAL, les gènes des immunoglobulines et du TCR constituent des marqueurs de choix pour la détection

des cellules leucémiques, qui ont le plus souvent commencé un réarrangement génomique.

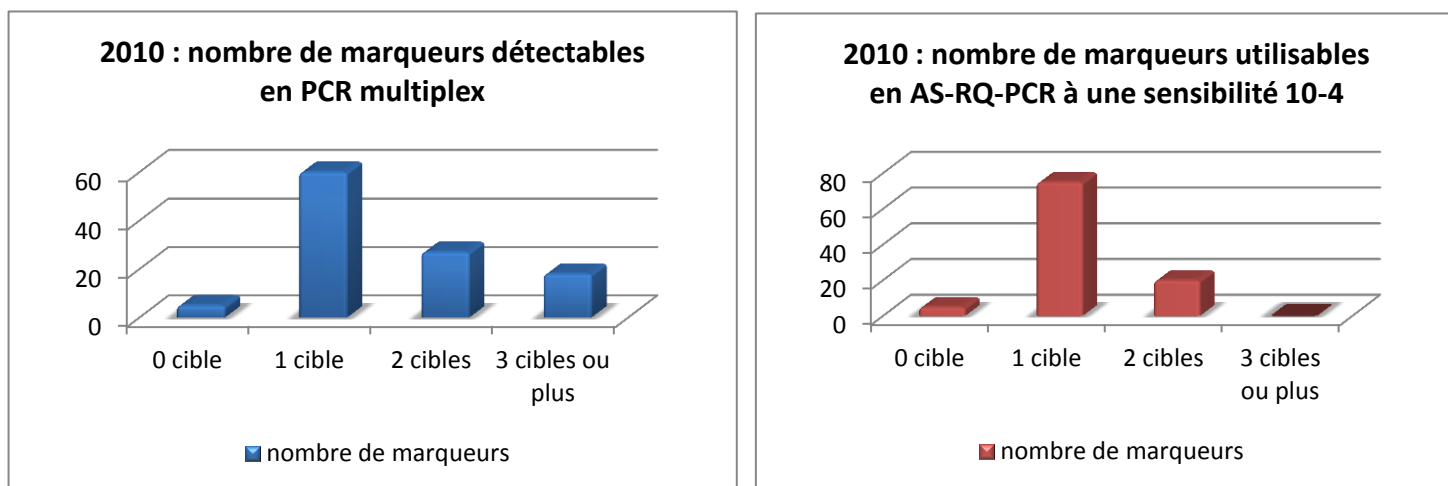


Figure 16. Histogrammes représentant à droite le nombre de marqueurs de clonalité identifiés par PCR multiplex en 2010 et à gauche le nombre de marqueurs utilisables par la suite en AS-RQ-PCR.

3-3-2- Choix de l'indicateur qualité

L'indicateur utilisé est « le nombre de patients pour lesquels on a identifié au moins deux marqueurs ».

3-3-3- Plan d'action

Le développement des techniques passe par l'analyse des différents locus Ig et TCR. Pour répondre aux attentes et aux exigences des cliniciens, nous avons décidé de labéliser le laboratoire « BIOMED-2 ». En standardisant notre méthode d'analyse, nous avons pu explorer les différents locus, aussi bien IgH que TCR gamma mais également ceux IgKappa, TCRdelta, TCRbéta en mettant au point des PCRmultiplex. Cela a abouti à une mise au point de près de 107 amorces en seulement 18 tubes de PCR multiplex. Le taux de détection de réarrangements clonaux en utilisant les ensembles d'amorces BIOMED-2 est sans précédent. Ceci est principalement fondé sur la complémentarité des différents tubes BIOMED-2. En particulier, application combinée des tubes IgH (VH-JH et DH-JH) et IgKappa peuvent détecter pratiquement tous les clones de cellules B proliférations, même dans Cellules B malignes avec des niveaux élevés de mutations somatiques. L'utilisation combinée des tubes et des TCRbéta TCRgamma détecte quasiment tous les clones populations de cellules T (table 4).

Cible PCR	Fréquence au diagnostic (%)	Stabilité à la rechute (%)
IGH	95	64
VH-JH	95	69
DH-JH	20	43
IGK-Kde	50	90
Vk-Kde	45	91
intron-Kde	25	97
TCRG (V γ -J γ)	55	75
TCRD	40	63
V δ 2-V δ 3	35	63
D δ 2-D δ 3	7	63

Tableau 4. Fréquence et stabilité des cibles Ig/TCR pour la détection de la maladie résiduelle dans les LAL.

Afin de limiter le nombre de tubes de PCR par locus, le multiplexage des amorces PCR est devenu essentiel. En conséquence, des directives spéciales ont été développées pour garantir des possibilités maximales pour concevoir des amorces utiles dans des tubes de PCR multiplex.

Ceci a consisté à actualiser et à développer de nouvelles méthodes d'identifications de cibles. La mise au point des techniques a été l'objectif essentiel du laboratoire. En effet l'optimisation de chaque programme et l'ajustement de la PCR d'autant plus complexe car multiplex, afin d'obtenir une sensibilité nécessaire. Actuellement tous les locus sont détectables au laboratoire.

3-3-4- Conclusion

Pour résoudre ce point critique (3), nous avons étudié l'indicateur « le nombre de patients pour lesquels on a identifié au moins deux marqueurs ».

L'inscription du laboratoire dans le cadre BIOMED-2, a permis de développer les techniques et de détecter un maximum de cibles. Un bilan sera fait lors de la présentation en octobre pour voir si cet indicateur est efficace. Nos données traduisent l'amélioration progressive de l'identification des cibles, de celle l'analyse de l'analyse des séquences ainsi que l'application des guide lines européens.

4-DISCUSSION ET CONCLUSION

Le travail réalisé pour ce mémoire a été très enrichissant. Il a permis d'évaluer, de contrôler, d'optimiser le processus afin de répondre aux exigences des cliniciens et du patient (ref du chap 4.12.4 de la norme EN NF 15189) à la veille du nouveau protocole d'étude qui entrera en vigueur début 2012. L'analyse complète de cette méthode d'analyse, inscrite depuis quelques années, qui semblait « roulée », n'a pas toujours été un modèle de simplicité. Ce travail a permis d'identifier de nombreux dysfonctionnements de les hiérarchiser et aussi d'identifier ceux qui étaient le plus urgent de régler. La mise en place d'indicateurs est délicate. La complexité de l'organisation, la réflexion sur les difficultés, le choix pertinent des indicateurs a mobilisé de nombreuses heures de réflexion.

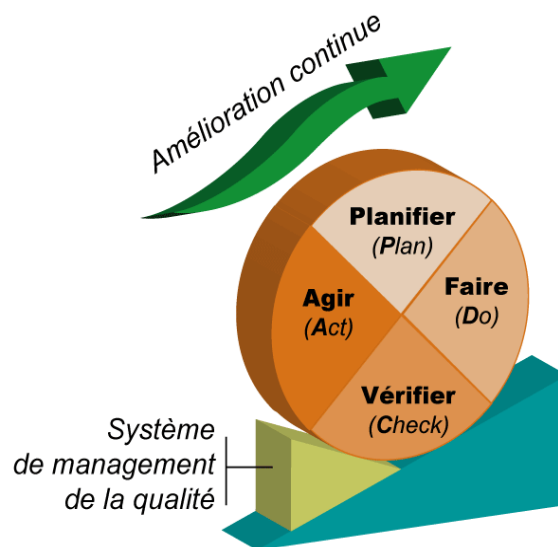
La mise en place de documents, des enregistrements des indicateurs qualité notamment, a simplifié la gestion et a permis de mesurer l'impact des mesures correctives prises. La mobilisation du personnel fut primordiale et le bilan est très positif : l'interaction entre les différents secteurs a été privilégiée. On a remarqué une motivation et une implication de tous les participants.

En conclusion, nous avons mieux compris l'intérêt des indicateurs à ajuster et à piloter l'action corrective. Leur choix doit être pertinent et performant. La mise en place d'indicateur qualité a permis de développer un bon outil de management. Cependant l'amélioration continue a pour but de toujours progresser. Garder la dynamique de la roue de Deming n'est pas chose facile : la méthode « PDCA » est une démarche cyclique d'amélioration qui consiste, à la fin de chaque cycle, à remettre en question toutes les actions précédemment menées afin de les améliorer. Nous devons réévaluer régulièrement tous ces indicateurs et les réajuster si nécessaire.

D'autre part en plus d'actions correctives présentées, et au vue de la complexité technologique de la quantification de la MRD moléculaire Ig/TCR ainsi que la nécessité à rendre des résultats décisionnels reproductibles entre les différents centres investigateurs, un réseau de laboratoires européens a été créé. 39

laboratoires dans 17 pays dont 5 français, qui participent à l' « *European Study Group for Minimal Residual Disease in ALL* » ou « *ESG-MRD-LAL* ». Nous participons deux fois par an à une évaluation externe de la qualité et à un programme de formation continue médicale et technique. Les objectifs de ce consortium sont : l'optimisation, la standardisation (uniformisation du mode de rendu et d'interprétation), la formation continue et plus récemment l'accréditation des laboratoires qui effectuent la quantification de la MRD moléculaire dans un cadre protocolaire de prise en charge des hémopathies malignes lymphoïdes matures et immatures

Figure 14 – la roue de Deming



BIBLIOGRAPHIE

- Ching-Hon Pui, Leslie L Robison, A Thomas Look. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2008; 371: 1030–43
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia.1995;9:1783-1786.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. TheWorld Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues.Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. Ann Oncol 1999; 10(12): 1419-32
- Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia?.Leukemia 2007; 21:622-626.
- Campana D.. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol. 2009; 46:100-106
- VHJ Van der Velden VHJ, Cazzaniga G., Schrauder A. *et al.*, on behalf of the European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL) : Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR generearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia 2007; 21:604-611.
- Brüggemann M, Schrauder A; Raff T. *et al.* Standardized mrd quantification in European all trials – Proceedings of the second international symposium on mrd assessment in Kiel, Germany, 18-20september 2008. Soumis à Leukemia.

DOCUMENTS REFERENCES:

- sh ref 02 révision 00recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale – septembre 2010 -
- Norme NF EN ISO 15189 (AFNOR): 2007-08

QUELQUES SITES :

- http://med2.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/index.shtml
- http://rb.ec-lille.fr/Cours_de_Qualite.htm
- http://www.univ-nancy2.fr/Amphis/images/films/Gest-Qual_ConstructionIndicateurs.pdf
- <http://www.logistiqueconseil.org/Articles/Methodes-optimisation/Pdca-roue-deming.htm>

ANNEXE

ANNEXE I : PRESENTATION DU LABORATOIRE

ANNEXE II : GUIDELINES

ANNEXE I

PRESENTATION DE L'HOPITAL SAINT-LOUIS



Le Centre Hospitalo Universitaire (C.H.U.) Saint-Louis est spécialisé dans la prise en charge de la pathologie cancéreuse, la dermatologie et l'hématologie. Les pathologies cancéreuses y compris l'hématologie représentent plus de 50% de son activité. C'est le premier centre européen d'allogreffe de cellules souches hématopoïétique et un des premiers pour la prise en charge des patients porteurs d'une hémopathie maligne.

L'hôpital Saint-Louis fait parti du Groupe Hospitalo-Universitaire (G.H.U.) Saint-Louis / Lariboisière / Fernand Vidal. Le projet médical du groupe hospitalier s'articule sur une dizaine de pôles multi-sites : L'hémato-oncologie-radiothérapie, neurosciences, peau/réparation cutanée et infectiologie, pathologie digestives, appareil locomoteur, biologie/anatomopathologie, médecine, produits de sante-bloc opératoire, imagerie, urgences.

Pour l'année 2010, plusieurs plans d'actions ont été réalisés dont le renforcement du potentiel d'hématologie du G.H.U avec la création de 2 unités d'hospitalisation : adolescents et jeunes adultes / Allogreffés, ainsi que la création d'un plateau imagerie et l'ouverture d'une plateforme des brûlés et chirurgie plastique.

La mise en place de ce groupe hospitalier attractif est accompagnée par le projet de constitution d'une seule unité biomédicale, sous la responsabilité du Pr Dominique CHARRON : un laboratoire qui devra répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 en 2016.

PRESENTATION DU LABORATOIRE CENTRAL D'HEMATOLOGIE

Le Laboratoire central d'hématologie est sous la responsabilité du Pr François SIGAUX. Il assure un service 7 jours sur 7 de 8H à 18H30. Il est constitué de 4 secteurs : cytologie spécialisée, cytogénétique, immuno-hématologie des leucémies, et hématologie moléculaire. Les activités non spécialisées, correspondant aux numérations formules sanguines et aux bilans d'hémostase, sont réalisés sur une chaîne de diagnostic biologique automatisé. Son activité s'élève à 22 millions de B BHN dont 8 millions pour la biologie moléculaire.

Le secteur Hématologie moléculaire comprend 7 techniciens et 2 biologistes :

- Dr Kheïra BELDJORD, MCU-PH biologiste responsable du secteur Immunogénétique
- Dr Jean-Michel CAYUELA, MCU-PH Biologiste responsable du secteur Oncogénétique - Responsable Assurance Qualité (R.A.Q.).

ANNEXE II

GUIDELINES mises en place lors du ESG-EuroMRD-ALL en 2006

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Experimental set-up

Standard curve:

- Serial dilutions of diagnostic DNA specimen in DNA obtained from MNC from pool of at least 5 healthy persons
- Should range from 10^{-1} to at least 10^{-5}
- Should be tested at least in duplicates; if triplicates are used all values should be taken into account, except in case of obvious technical reasons

Background:

- Defined as non-specific amplification of non-leukemic DNA
- Determined by analysing MNC DNA from a pool of at least 5 healthy persons
- Should be performed at least in 6-fold.

The threshold should be set:

- In the lower region of the log-linear part of the amplification curves.

ESG-MRD-ALL June 2006

1

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Criteria for Quantitative Range

The lowest dilution of the QR :

- Must give specific amplification (good amplification curves);
- Must give reproducible amplification: ΔCt of all replicates ≤ 1.5 ;
- Must have all Ct values ≥ 3.0 lower than the lowest Ct value of the background (= amplification observed in normal MNC DNA);
- Must have a mean Ct value within a defined range from the mean Ct value of the previous dilution point:
 - 2.6 – 4.0 Cts between 10-fold dilutions (e.g. 10^{-3} - 10^{-4});
 - 0.5 – 1.5 Cts between 2-fold dilutions (e.g. 10^{-3} – 5×10^{-4});

ESG-MRD-ALL June 2006

2

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Criteria for the standard curve

The standard curve should:

- Include the lowest dilution of the QR and all previous dilutions;
- Include at least three dilution points;
- Have a minimum of range of two log steps;
- Have a slope between -3.1 and -3.9;
- Have a correlation coefficient ≥ 0.98 .

If an RQ-PCR does not fulfil the criteria for the 'Quantitative range' and the resulting standard curve, further analysis should not be performed because of the poor performance of the RQ-PCR.

ESG-MRD-ALL June 2006

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Criteria for sensitivity

The sensitivity is the lowest dilution that:

- Must give specific amplification (good amplification curve(s));
- Must have at least one positive replicate; ΔCt of the replicates is not relevant;
- Must have the lowest Ct value ≥ 1.0 lower than the lowest Ct value of the background (= amplification observed in normal MNC DNA);
- Must have the lowest Ct value < 20 cycles away from the undiluted sample or, if this undiluted sample is not included in the standard curve, from the intercept of the standard curve (representing the 10^0 dilution).

ESG-MRD-ALL June 2006

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Criteria for positivity

In studies aimed at therapy intensification (prevention of false-positive results):

A sample is considered as being positive if:

- The Ct value of at least one of the three replicates is within 4.0 Ct from the highest Ct value of the sensitivity (fulfilling all sensitivity criteria);

AND

- The Ct value of at least one of the three replicates is ≥ 3.0 lower than the lowest Ct of background.

ESG-MRD-ALL June 2006

5

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Criteria for positivity

In studies aimed at therapy reduction (prevention of false-negative results):

A sample is considered as being positive if:

- The Ct value of at least one of the three replicates is within 4.0 Ct from the highest Ct value of the sensitivity (fulfilling all sensitivity criteria);

AND

- The Ct value of at least one of the three replicates is ≥ 1.0 lower than the lowest Ct of background.

ESG-MRD-ALL June 2006

6

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Data analysis - proposal

MRD positive samples can be quantified if:

- The mean Ct value of the replicates is \leq the highest Ct value of the quantitative range;

AND

- The ΔCt of the replicates is ≤ 1.5 .

Quantitation should be done by:

- Using the standard curve, excluding dilutions outside the QR;
- Using the mean quantity of the triplicates of the follow-up sample;
- Correcting the MRD level according to the DNA quality/ quantity as determined by RQ-PCR of a control gene.

RQ-PCR DATA INTERPRETATION

Data analysis - proposal

MRD positive samples that can not be quantified:

- Data should be presented as "positive, <(Quant. Range)" or "not clearly negative"; dependent on clinical protocol.
- The quality/quantity of the DNA, as checked by RQ-PCR analysis of a control gene, should be within a predefined acceptable range.

RÉSUMÉ

La méthode quantitative d'évaluation de la réponse au traitement dans les LAL de l'adulte est une analyse développée au laboratoire afin de quantifier les cellules leucémiques encore présentes chez un patient en rémission complète. Cette technique sensible, permet de détecter 1 cellule leucémique sur 10 000 cellules normales. L'objectif final du suivi de la Maladie Résiduelle Minimale (MRD), par utilisation de techniques sensibles, est l'estimation fiable de la cinétique de réponse aux traitements afin de distinguer les patients à risque élevé de rechute et qui nécessitent une thérapeutique supplémentaire, de ceux à faible risque et pour lesquels des traitements moins agressifs peuvent être envisagés

La qualité de l'analyse de la quantification de la MRD doit être maîtrisée et satisfaire l'attente des patients et des médecins. Du fait de la complexité technologique de cette méthode quantitative et la nécessité de rendu de résultats décisionnels reproductibles entre les centres investigateurs, la standardisation de cette méthode est nécessaire ainsi que l'interprétation de résultats avec des « Guidelines ».

Pour cela, après une présentation du contexte, de l'analyse, et de son processus, ce mémoire décrit les différents dysfonctionnements observés ainsi que la mise en évidence des points critiques prioritaires. Des indicateurs qualités sont alors étudiés. Ces choix sont-ils pertinents ? Performants ?

Ce sujet est dicté sur la dynamique de la roue de Deming : une démarche cyclique d'amélioration qui consiste, à la fin de chaque cycle, à remettre en question toutes les actions précédemment menées afin de les améliorer.

