

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'OUTILS POUR LA VALIDATION
DE METHODES D'ANALYSE QUALITATIVE EN PORTEE FLEXIBLE B
EN CYTOGENETIQUE

Applications pratiques pour les tests de détection des aneuploïdies des
chromosomes 21, 18 et 13 par FISH

CHEVALLIER Zuzana
2011/2012

Note au lecteur

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

Les opinions exprimées n'engagent que leurs auteurs.

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

CHEVALLIER Zuzana

Technicienne de laboratoire de biologie médicale

GH Necker-Enfants Malades

Pôle de Biologie et Produits de Santé

Site Histologie Embryologie Cytogénétique, du Pr. VEKEMANS

Unité Cytogénétique Moléculaire

Plate-forme FISH

SOMMAIRE

1- Validation des méthodes analytiques : une exigence réglementaire et normative	7
1.1 Extrait Norme NF EN ISO 15189	8
1.2 Validation des méthodes analytiques au sein du PBPS.....	8
1.3 Outils du COFRAC	9
1.4 Principe de la méthode	10
1.5 Système analytique utilisé notion de « portée A et B »	10
1-6 Outils de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF)	11
2- Constitution du dossier de validation pour la méthode FISH en porté B (SH FORM 44)	11
2.1 Description de la méthode.....	12
2.2 Mise en œuvre du processus de validation	12
2.3 Maîtrise des risques	13
2.4 Évaluation des critères de performance de la FISH.....	14
2.4.1 Spécificité et sensibilité des tests de FISH.....	15
2.4.2 Contamination inter-échantillon lors de test FISH.....	16
2.4.3 Stabilité des réactifs de FISH	16
2.4.4 Robustesse de la FISH.....	17
2.4.5 Comparaison de méthode.....	17
2.5 Avis d'aptitude de la méthode.....	18
3. Création des outils internes permettant la constitution du dossier de validation	18
3.1 Rédaction de la procédure de validation des tests diagnostiques FISH.....	18
3.2 Habilitation du personnel à la validation des tests diagnostiques FISH	23
4. Application au test de détection des aneuploïdies des chromosomes 21, 18 et 13 sur amniocytes non cultivés	23
4.1 Description de la méthode, choix des sondes.....	24
4.2 Maîtrise des risques du test de détection des aneuploïdes 21, 18 et 13.....	26
4.2.1 M comme main-d'œuvre.....	26
4.2.2 M comme matière	26
4.2.3 M comme milieu.....	27
4.2.4 M comme méthode.....	27
4.2.5 M comme moyen	27
4.2.6 Tableau récapitulatif	28
4.3 Evaluation des performances	29
4.3.1 Spécificité et sensibilité du test de détection des aneuploïdies 21,18 et 13 par FISH.....	29
4.3.2 Contamination lors du test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH	30
4.3.3 Comparaison de méthode : test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH versus analyse du caryotype.	30
4.3.4 Robustesse du test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH.....	31
4.3.5 Stabilité des sondes	31

5. Soumettre le dossier de validation au COFRAC	31
6. Conclusion.....	32

INTRODUCTION

Le Groupement Hospitalier (GH) Necker-Enfants Malades est un centre de référence pour de nombreuses maladies rares ce qui amène certaines équipes du Pôle de Biologie et Produit de Santé (PBPS) à adapter ou développer leurs propres méthodes de détection afin de répondre aux demandes singulières des cliniciens. Ces méthodes sont développées pour pallier l'absence d'une offre commerciale adaptée ou pour optimiser des arbitrages économiques tendus.

Dans l'unité de cytogénétiqueⁱ moléculaireⁱⁱ une grande partie de notre travail consiste à concevoir des tests diagnostiques d'Hybridation *In situ* en Fluorescence (FISH). La FISH est une analyse complémentaire à l'étude du caryotype, elle est basée sur les homologies de séquences d'ADN permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes.

Pour réaliser ces tests, nous disposons d'une banque de bactéries modifiées, nous permettant d'obtenir des fragments d'ADN répartis sur l'ensemble du génome humain. Ces fragments après incorporation de fluorochromes sont appelés des sondes. Visibles en microscopie à fluorescence, elles permettent la détection et la caractérisation d'anomalies innées et acquises à un niveau de résolution d'environ 200Kb.

Ces outils sont validés en interne en suivant les recommandations du Guide de Bonne Pratique en Cytogénétique. Ce guide précise le Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA) en ce qui concerne les spécificités de notre discipline.

En 2010, l'ordonnance n°2010-46 du 13 janvier donne une dimension légale à la démarche qualité. Tous les laboratoires de biologie médicale (LBM) français sont obligés de passer d'une obligation de moyen avec l'application du GBEA (principe d'assurance qualité) à une obligation de résultat en obtenant l'accréditation selon la

Norme NF EN ISO 15189 (système de management de la qualité) délivrée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC).

Comment cette réforme impacte nos pratiques quotidiennes ? Comment dans les secteurs à forte empreinte technologique et soumis aux innovations fréquentes la réponse aux exigences réglementaires et normatives peut être un levier d'amélioration et d'évolution pour la validation de nos systèmes analytiques ?

Les objectifs de ce mémoire sont d'explicitier la notion de « validation » au sens de la norme NF EN ISO 15189 puis de l'appliquer à l'exercice de la cytogénétique moléculaire.

Nous chercherons à

- ✓ Concevoir et mettre en place les outils nécessaires pour la constitution de dossiers de validation conforme aux exigences du COFRAC.
- ✓ Appliquer concrètement ces outils à la méthode de détection des aneuploïdiesⁱⁱⁱ des chromosomes 21, 18 et 13 afin de constituer un dossier de validation type qui servira de modèle pour valider l'ensemble des tests diagnostiques FISH réalisés sur notre site^{iv}.

1- Validation des méthodes analytiques : une exigence réglementaire et normative

La réforme de la biologie médicale prend place dans le cadre de la réforme plus générale du système de soins français : la loi Hôpital, Patients, Santé, Territoire dite HPST du 21 juillet 2009. En effet, c'est l'article 69 de cette loi qui a permis au gouvernement de réformer, par voie d'ordonnance, les conditions de création, d'organisation et de fonctionnement des laboratoires de biologie médicale.

L'ordonnance du 13 janvier 2010 valorise deux axes, celui de la médicalisation de la biologie médicale avec le renforcement du dialogue clinicobiologique et celui de l'accréditation obligatoire de tous les laboratoires avant la fin de l'année 2016.

Le législateur a défini comme référentiel d'accréditation^y opposable la norme NF EN ISO 15189. L'accréditation des laboratoires est prononcée par le seul organisme national reconnu pour la délivrer : le COFRAC. L'évaluation des LBM sera réalisé par un binôme d'auditeur, l'un dit technique (biologiste de la discipline évaluée), l'autre dit qualitatif qui observera préférentiellement le système de management de la qualité mis en place. Ces deux auditeurs sont missionnés par le COFRAC et sont engagés par des déclarations de confidentialité, l'absence conflits d'intérêts avec le LBM audité. Ils bénéficient également d'une formation initiale et leurs pratiques d'évaluation sont harmonisées

Une des exigences de la norme ISO/E N 15189 qui a suscité notre intérêt pour la rédaction de ce travail est la validation des méthodes analytiques.

1.1 Extrait Norme NF EN ISO 15189

Extrait du chapitre 5 traitant des exigences techniques, paragraphe 5.5.2 et 5.5.3

Le laboratoire doit utiliser uniquement des **procédures validées** pour s'assurer qu'elles conviennent à l'utilisation prévue. Les validations doivent être **aussi approfondies que nécessaire** pour répondre aux besoins [...]. Le laboratoire doit **enregistrer les résultats** obtenus et **la procédure utilisée pour la validation.**

les procédures **doivent être documentées** et être **disponibles au poste de travail** du personnel concerné.

1.2 Validation des méthodes analytiques au sein du PBPS

La déclinaison de cette exigence est relayé au niveau local dans le manuel qualité du PBPS.

Extrait du chapitre 7 du manuel qualité du PBPS

Toutes les méthodes mises au point au laboratoire font l'objet d'une validation préalable à leur mise en œuvre [...] les dossiers de validation sont annexés aux procédures analytiques.

En pratique une procédure commune a été rédigé comme support pour l'ensemble des secteurs du pôle de biologie et produits de santé (COMB-F-PRORG 01 – vérification/validation des méthodes quantitatives et qualitatives). Ainsi chaque secteur du laboratoire du pôle doit utiliser des procédures analytiques validées, de manière aussi approfondie que nécessaire et ce en utilisant une procédure de validation dont les résultats sont consignés, enregistrés, traités et revus périodiquement.

1.3 Outils du COFRAC

Les textes normatifs, résultant d'un consensus international restent assez généraux voire volontairement vague. Une des activités du COFRAC est de produire des documents plus précis et plus explicatifs qui permettront à tous les utilisateurs de décliner et d'adapter ces normes au contexte français. Dans le cadre de l'application de l'ordonnance de janvier 2010, le COFRAC s'est doté d'une section Santé Humaine (SH) apte à répondre aux particularités, aux exigences et aux besoins des laboratoires de biologie médicale. Dans ce cadre, la section SH rédige et produits de nombreux documents, disponibles en ligne sur le site www.cofrac.fr, qui viennent expliciter la norme NF EN ISO 15189.

Ces documents sont de différente nature :

Les SH REF sont les documents de référence opposable. Par exemple, parmi ceux là nous trouvons le SH REF 02 qui vient compléter la norme 15189 avec les toutes les dispositions réglementaires et législatives applicables en France.

Les SH GTA sont des guides techniques d'accréditation.

Les SH INF sont des documents d'information.

Les SH FORM sont des formulaires.

Concernant la validation de méthodes analytiques, le SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale » vient expliciter les exigences des paragraphes 5.3 et 5.5 de la norme 15189. Les recommandations contenues dans ce guide ne sont pas opposables, le LBM est libre de les appliquer ou non. Mais elles sont reconnues par le COFRAC comme étant les plus appropriées pour répondre aux prescriptions normatives.

Le COFRAC propose également aux LBM de s'appuyer sur les formulaires SH FORM 43 et 44 qui constituent la trame d'un dossier de validation.

Les paramètres à étudier en vue de la constitution de ce dossier sont fonction du principe de la méthode et du système analytique utilisé par le LBM.

1.4 Principe de la méthode

Le principe de la méthode est définie par le type de méthode (quantitatif ou qualitatif), son caractère automatique ou manuel et la technologie employée.

La méthode qui va être étudiée dans la suite de ce document, la FISH, est une méthode manuelle permettant de visualiser une absence ou une présence de signal fluorescent au microscope. C'est donc une méthode qualitative.

1.5 Système analytique utilisé notion de « portée A et B »

La notion de portée d'accréditation est défini dans le SH REF 08 c'est « un énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le LBM est accrédité ».

Cette portée peut être soit standard (notée portée A) ou étendue (notée portée B) selon qu'il s'agisse d'une méthode normalisée (Dispositif Médical de Diagnostic *In Vitro* marqué CE) ou d'une méthode développée par le LBM.

La portée devient « flexible » lorsque le LBM souhaite avoir la possibilité , entre deux visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développés reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées.

La validation analytique des tests diagnostiques de FISH conçus au sein de notre site relève de la **validation de méthode qualitative en portée flexible étendue (B)**.

Le SH FORM 44 « FICHE TYPE QUALITATIF » proposé par le COFRAC constituera la trame de notre dossier de validation.

1-6 Outils de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF)

L'ACLF est la société savante faisant référence dans notre discipline. Elle met en ligne sur le site <http://www.eaclf.org/docs/GBPcyto/Guidelines-2011.pdf> un guide de bonnes pratiques en cytogénétique. Ce guide vient nous donner des recommandations quand à la validation technique des tests de FISH.

2- Constitution du dossier de validation pour la méthode FISH en porté B (SH FORM 44)

Ce dossier se compose de cinq parties dont nous reprenons la forme, la colonne de droite concerne notre domaine d'analyse.

2.1 Description de la méthode

DESCRIPTION DE LA METHODE (extrait FH FORM 44)	
Analyte/Mesurande :	En cytogénétique moléculaire nous recherchons les locus cibles des sondes choisies. Renseigner ici : le locus d'intérêt et les sondes choisies
Principe de la Mesure :	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH)
Méthode de mesure :	FISH suivie d'une analyse visuelle des signaux et d'une acquisition sur système d'analyse d'images.
Marquage CE ^{vi} (Oui/Non)	NON
Codage C.N.Q ^{vii} . (s'il existe) :	Pas de CNQ dans notre discipline Mais EEQ organisé par l'ACLF (reposant sur une analyse rétrospective des dossiers)

2.2 Mise en œuvre du processus de validation

MISE EN ŒUVRE (extrait FH FORM 44)	
Opérateurs (Habilitation) :	Renseigner ici la référence de la grille d'habilitation du personnel réalisant les tests du dossier de validation; en règle générale il s'agit d'un binôme de référents (biologiste et technicien).
Procédure de validation :	Renseigner ici la référence de la procédure de validation.
Procédure de gestion de la portée flexible :	Renseigner ici la référence de la procédure de gestion de la portée flexible.
Période d'évaluation :	Renseigner ici date d'évaluation du test diagnostique.
Date de mise en service :	Renseigner ici date d'utilisation en diagnostique du test dans le site.
Autorisation par :	Renseigner ici le nom du biologiste responsable de ce test.

La **grille d'habilitation** est une formalisation des compétences des opérateurs.

La **procédure de validation** consiste à décrire le processus de validation. Elle s'appuie sur la procédure commune rédigée par le pôle et est complétée par les données pratiques de réalisation de la validation. Dans notre cas de figure, la

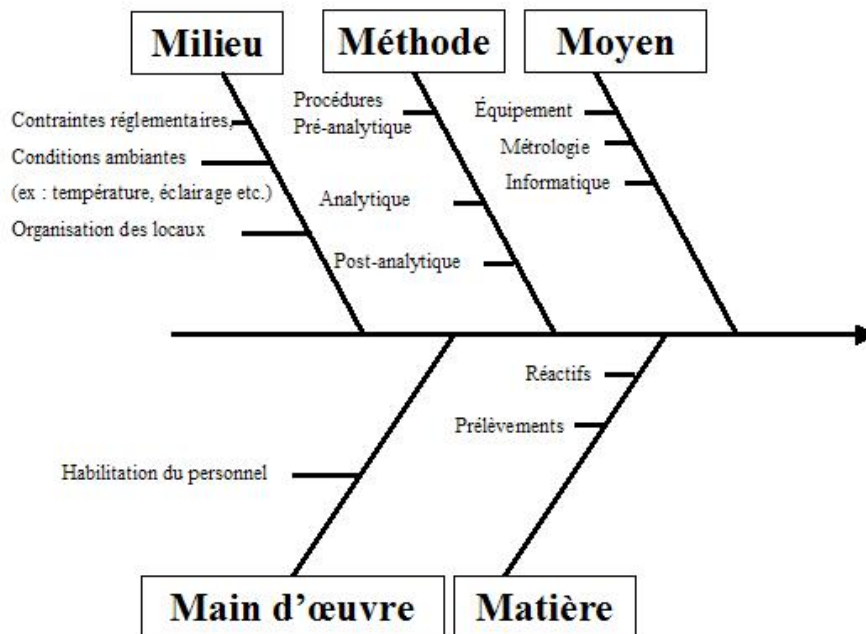
manière la plus simple de réaliser cette procédure est de concevoir un logigramme reprenant toutes les étapes du processus en y associant les personnels responsables de chaque étape et les documents associés (références des formulaires d'enregistrements, fiches techniques, etc.).

La **procédure de gestion de la portée flexible**, détermine les conditions de maîtrise du processus en cas de changement (de locus, de méthode, d'appareillage, de logiciel, etc). Là aussi un logigramme, sorte de *checklist* résumant toutes les actions à réaliser en cas de changement, paraît tout à fait approprié.

2.3 Maîtrise des risques

Pour cela nous devons auparavant faire une étude des risques associés à notre analyse et définir les **risques critiques**, c'est-à-dire ceux qui peuvent perturber le résultat rendu au patient ou la prise en charge ultérieure de celui-ci.

La méthodologie proposée dans le SH GTA 04 est **la méthode des 5M** (ou diagramme d'Ishikawa ou diagramme en arête de poisson).



Explication du diagramme des 5M :

Le trait horizontal représente le processus analytique. A gauche, se situe l'élément d'entrée dans le processus (la demande d'examen) et à droite la sortie du processus (le résultat rendu) de part et d'autre de cette droite se situent des flèches représentant les éléments de mise en œuvre du processus que nous pouvons répartir en 5 catégories (Matière, Moyen, Milieu, Main d'œuvre, Méthode).

Cette disposition permet d'avoir une vue très exhaustive des éléments impactant le processus analytique. Il est recommandé de réaliser ce diagramme en présence de tous les acteurs concernés, puis de définir les points critiques et de formaliser leur maîtrise dans le dossier de validation.

2.4 Évaluation des critères de performance de la FISH

Le SH GTA 04 nous propose d'évaluer les paramètres suivant la spécificité, la sensibilité, les contaminations inter-échantillons, la stabilité des réactifs, la robustesse et enfin de réaliser une comparaison de méthodes. Ces différents items doivent faire à la fois l'objet d'une étude bibliographique et d'une étude expérimentale réalisée sur le site.

2.4.1 Spécificité et sensibilité des tests de FISH

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B) (extrait FH FORM 44)	
Résultats de l'étude des courbes ROC^{viii} à partir d'une étude clinique :	BIBLIOGRAPHIE : renseigner ici les références des articles princeps concernant le locus à étudier. ESSAIS SUR SITE : étude spécificité/sensibilité à réaliser pour chaque test.

Les courbes de ROC ne sont pas applicable dans notre discipline.

La **spécificité** d'un test diagnostique est la capacité du test à donner un résultat négatif lorsque l'anomalie n'est pas présente. En cytogénétique moléculaire un test est spécifique quand il donne un nombre de signaux attendus chez des patients sains ayant un caryotype normal.

L'ACLF considère qu'un test FISH donnant un signal correct dans 100% des métaphases et 95% des noyaux peut être utilisé en diagnostic. La FISH est donc une technique spécifique à 95% en interphase et 100% sur métaphase. La limite de détection de cette technique est de 5%. Elle n'est donc pas adaptée à la détection des mosaïques faibles.

La **sensibilité** d'un test diagnostique est la capacité du test à donner un résultat positif lorsque la maladie (ou la condition) est présente. En cytogénétique moléculaire un test est sensible quand il détecte l'altération du locus ou des loci étudiés. La sensibilité est fonction de la pathologie recherchée.

Une revue de la littérature est nécessaire avant la construction d'un test diagnostique afin de choisir la sonde au niveau du locus à étudier.

2.4.2 Contamination inter-échantillon lors de test FISH

En phase pré-analytique :

La contamination inter-échantillon est un risque intrinsèque de la méthode lié au type de prélèvement lui-même. Ainsi en cytogénétique prénatal le prélèvement fœtal peut être « contaminé » par des cellules maternelles et en cytogénétique oncologique le prélèvement tumoral peut contenir du tissu sain.

Les résultats sont rendus sous réserve d'observation correcte du type cellulaire recherché.

En phase analytique :

En cytogénétique moléculaire il n'y a pas de contamination pendant la phase analytique.

2.4.3 Stabilité des réactifs de FISH

Nos réactifs sont des molécules d'ADN qui sont particulièrement stables, les marquages font appel à des liaisons covalentes elles aussi très stables dans le temps. La fluorescence des sondes est une propriété altérable dans le temps, dans notre expérience on peut utiliser une sonde pendant plus de 2 ans.

De plus, habituellement un remaniement est recherché sur un seul des deux chromosomes, ainsi le chromosome non remanié sert de contrôle interne attestant de la stabilité de la sonde. Toutefois lorsqu'on étudie des remaniements des chromosomes sexuels d'un garçon nous devons faire en parallèle une hybridation d'un témoin sain afin de s'assurer de la stabilité de la sonde.

De plus, nous testons la stabilité à chaque nouveau lot et sous-lot de sonde en réalisant une étude de spécificité.

2.4.4 Robustesse de la FISH

La **robustesse** est la capacité à ne pas être affectée par de faibles variations des paramètres de la méthode.

En FISH les paramètres critiques sont la température et la durée de dénaturation et d'hybridation ; la durée, la température et la stringence des lavages ; la qualité de l'échantillon primaire (quantité et qualité d'ADN) ; la nature et la concentration de la sonde.

La FISH permet une grande flexibilité de tous ces paramètres, elle peut être réalisée sur tout type d'échantillon contenant de l'ADN non dégradé. C'est une technique très robuste. Dans notre cas, nous n'avons pas jugé utile de revérifier cet item.

2.4.5 Comparaison de méthode

La Société Française de Biologie Clinique (SFBC) préconise de réaliser une comparaison de méthode sur 40 échantillons ceci n'est pas toujours possible dans notre discipline étant donnée la rareté de certaines pathologies diagnostiquées sur notre site.

La FISH a été validée par la détection d'anomalies vues au caryotype dans le laboratoire sur plus de 400 échantillons. Elle s'est avérée plus sensible et plus spécifique que le caryotype.

Pour les tests de FISH visant à diagnostiquer une aneuploïdie la corrélation est directement possible avec la méthode de référence à savoir le caryotype réalisé sur notre site après une culture cellulaire.

Pour les anomalies cryptiques, non visible au caryotype, la méthode FISH est comparée sur notre site à l'Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) ayant une résolution supérieure à la FISH (résolution théorique de 60 kb).

2.5 Avis d'aptitude de la méthode

Pour finir le biologiste donne son avis sur l'aptitude de la méthode à satisfaire les objectifs attendus (performance technique et besoins des cliniciens) et engage sa responsabilité dans la pertinence du processus utilisé et la fiabilité des résultats rendus.

3. Création des outils internes permettant la constitution du dossier de validation

3.1 Rédaction de la procédure de validation des tests diagnostiques FISH

(CYGE-F-PROG-0-VALFISH)

Cette procédure décrit les différentes étapes de la validation, définit les responsabilités et précise les documents opératoires, les données bibliographiques et les formulaires d'enregistrements nécessaire à sa réalisation.

Les documents opératoires nécessaires au processus de validation sont indexés suivant la procédure des procédures du PBPS.

Indexation des documents :

Domaine d'application - chapitre de la norme - type de document - chiffre d'incrémentation - intitulé abrégé évocateur.

Ex : CYGE-F-PROG-0-VALFISH

CYGE désigne le site d'Histologie Embryologie Cytogénétique.

F est la lettre code des processus analytiques.

PROG désigne les procédures(MOPE les modes opératoires, FORE les formulaires d'enregistrement).

O désigne un document en cours de conception.

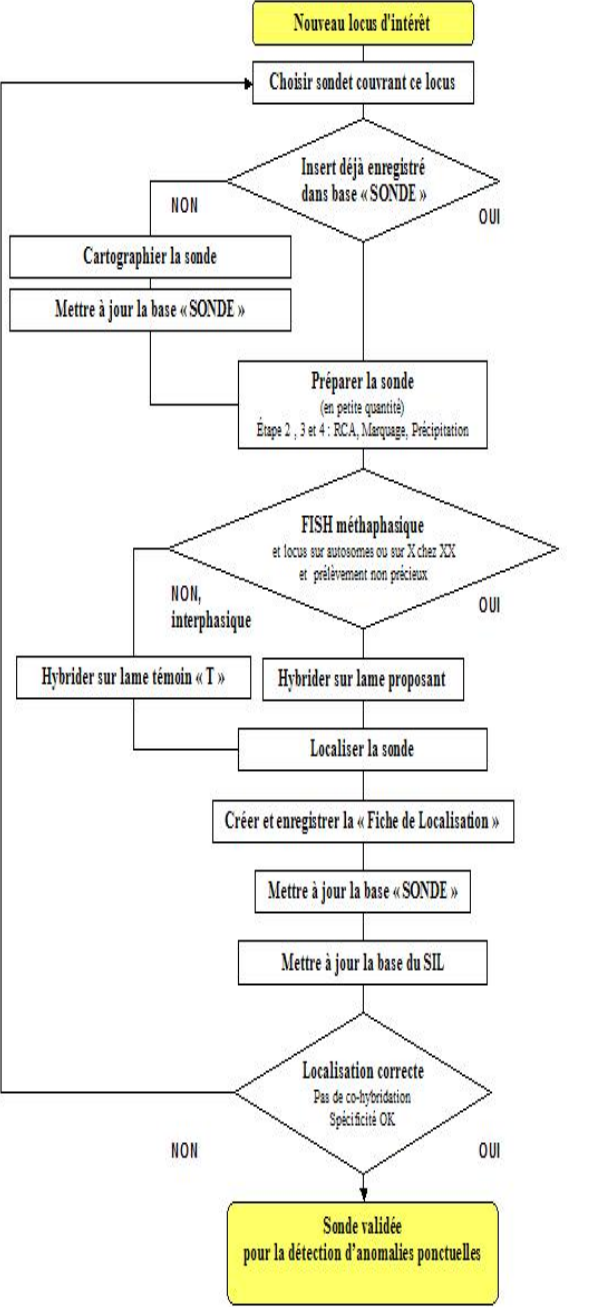
VALFISH désigne la procédure ici il s'agit de la procédure de validation des tests FISH à visées diagnostiques.

Ces documents apparaissent soulignés dans les logigrammes ci-dessous.

Le processus de validation d'un test de FISH peut ainsi être résumé en trois étapes :

- choix du locus en fonction de l'anomalie et sélection de la sonde
- qualification du test
- production en « grande quantité » pour la réalisation de séries

Dans un premier temps le locus d'intérêt pour l'anomalie à étudier est choisi, puis une sonde au niveau de ce locus est sélectionnée, par une recherche dans les bases de données, sa position est vérifiée sur site par hybridation. Cette toute première étude autorise son utilisation pour la détection d'une anomalie ponctuelle.

RESPONSABILITES	ACTIONS	DOCUMENTS ASSOCIES <u>Documents opératoires</u> Enregistrements
<p>Biologiste</p> <p>Biologiste , Technicien</p> <p>Technicien</p> <p>Responsable banque</p> <p>Responsable informatique</p>	 <pre> graph TD Start([Nouveau locus d'intérêt]) --> Choose[Choisir sonde couvrant ce locus] Choose --> CheckDB{Insert déjà enregistré dans base « SONDE »} CheckDB -- NON --> Map[Cartographier la sonde] Map --> UpdateDB[Mettre à jour la base « SONDE »] UpdateDB --> Prepare[Préparer la sonde (en petite quantité) Étape 2, 3 et 4 : RCA, Marquage, Précipitation] CheckDB -- OUI --> Prepare Prepare --> CheckFISH{FISH méthaphasique et locus sur autosomes ou sur X chez XX et prélèvement non précieux} CheckFISH -- NON, interphasique --> HybridT[Hybrider sur lame témoin « T »] CheckFISH -- OUI --> HybridP[Hybrider sur lame proposant] HybridT --> Localize[Localiser la sonde] HybridP --> Localize Localize --> CreateFiche[Créer et enregistrer la « Fiche de Localisation »] CreateFiche --> UpdateDB2[Mettre à jour la base « SONDE »] UpdateDB2 --> UpdateSIL[Mettre à jour la base du SIL] UpdateSIL --> CheckLoc{Localisation correcte Pas de co-hybridation Spécificité OK} CheckLoc -- NON --> Choose CheckLoc -- OUI --> Valid([Sonde validée pour la détection d'anomalies ponctuelles]) </pre>	<p>Demande d'examen dans SIL¹</p> <p>Base Access SONDE ou WEB UCSC genome browser²</p> <p>Base UCSC genome browser Base Access « SONDE » Fiche « Entrée de données »</p> <p><u>CYGE-F-PRANA-O-SONDE</u> Cahier de paillasse</p> <p><u>CYGE-F-PRANA-O-FISH</u></p> <p>Registre des lames témoins <u>CYGE-F-MOPE-0-LOC</u></p> <p>CYGE-F-FORE-0-LOC</p>

Dans un deuxième temps, le test doit être qualifié c'est à dire qu'il doit montrer qu'il détecte effectivement l'anomalie recherchée.

¹ SIL : Système Informatique de Laboratoire

² site de cartographie du génome

RESPONSABILITES	ACTIONS	DOCUMENTS ASSOCIES <u>Documents opératoires</u> Enregistrements
<p>Clinicien, Biologiste</p> <p>Biologiste, Technicien</p> <p>Technicien</p>	<pre> graph TD A[Nouveau locus d'intérêt pour la détection d'anomalies récurrentes] --> B[Choisir une sonde validée pour la détection d'anomalies ponctuelles couvrant ce locus] B --> C[Hybrider sur témoin positif (porteur de l'anomalie)] C --> D{Anomalie détectée} D -- NON --> B D -- OUI --> E[Créer et enregistrer « fiche de Sensibilité »] E --> F[Mettre à jour le fichier « LOTS DIAGNOSTIQUES MAISON »] F --> G[Sonde qualifiée pour la détection de l'anomalie récurrente] </pre>	<p>Bibliographie + cartographie</p> <p>Base Access SONDE et/ou WEB UCSC genome browser</p> <p><u>CYGE-F-PRANA-O-FISH</u> Requête patient porteur de l'anomalie dans le SIL ou registre d'anomalies.</p> <p><u>CYGE-F-MOPE-O-SENS</u> <u>CYGE-F-FORE-O-SENS</u></p> <p>LISTING Excel « TESTS DIAGNOSTIQUES MAISON »</p>

Enfin, si cette anomalie est récurrente le test est produit en grande quantité (fonction de la demande clinique) et fait alors l'objet de la constitution d'un dossier de validation type SH FORM 44.

RESPONSABILITES	ACTIONS	DOCUMENTS ASSOCIES <u>Documents opératoires</u> Enregistrements
<p>Biologiste</p> <p>Technicien</p> <p>Biologiste Technicien</p> <p>Biologiste</p>	<pre> graph TD Start[Sonde qualifiée pour la détection de l'anomalie récurrente] --> Prep[Préparer la sonde (en grande quantité) Étape 1, 2, 3 et 4 : Culture, RCA, Marquage, Précipitation] Prep --> FISH{FISH métaphasique} FISH -- NON --> Def[Définir les conditions opératoires Hybrider sur un échantillon identique à l'échantillon cible de l'analyse] Def --> Prep FISH -- OUI --> HybridT[Hybrider lame témoin « T »] HybridT --> VerifLoc[Vérifier localisation] VerifLoc --> Spec{Spécificité correcte} Spec -- NON --> Def Spec -- OUI --> HybridPos[Hybrider sur témoin positif (porteur de l'anomalie)] HybridPos --> VerifSen[Vérifier la sensibilité] VerifSen --> NewLot[Avant d'utiliser un nouveau sous-lot hybrider en parallèle avec le lot en cours d'utilisation] NewLot --> Stab{Stabilité correcte} Stab -- NON --> Def Stab -- OUI --> Comp[Comparaison de méthode (caryotype, CGH)] Comp --> Disc{Absence de discordances inexplicables} Disc -- NON --> Def Disc -- OUI --> End[Sonde validée pour le diagnostic d'anomalies récurrentes] </pre>	<p>Fichier Excel «TEST DIAGNOSTIQUES MAISON»</p> <p><u>CYGE-F-PRANA-O-SONDE</u></p> <p><u>CYGE-F-PRANA-O-FISH</u> Registre des lames témoins</p> <p><u>CYGE-F-MOPE-O-SPEC</u> Requête patient porteur de l'anomalie dans le SIL ou registre d'anomalie. <u>CYGE-F-FORE-O-SPEC</u></p> <p><u>CYGE-F-MOPE-O-SENS</u> <u>CYGE-F-FORE-O-SENS</u></p> <p><u>CYGE-F-MOPE-O-COMP</u> <u>CYGE-F-FORE-O-COMP</u></p> <p><u>CYGE-F-MOPE-O-NCANA</u> <u>CYGE-F-FORE-O-NCANA</u></p>

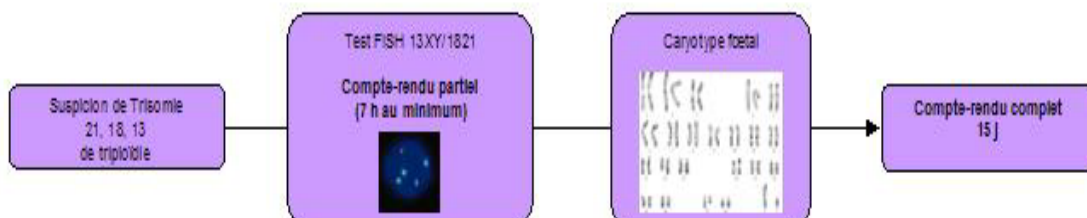
3.2 Habilitation du personnel à la validation des tests diagnostiques FISH

(COMB-B-FORE-02-Grille_HabilplateformFISH)

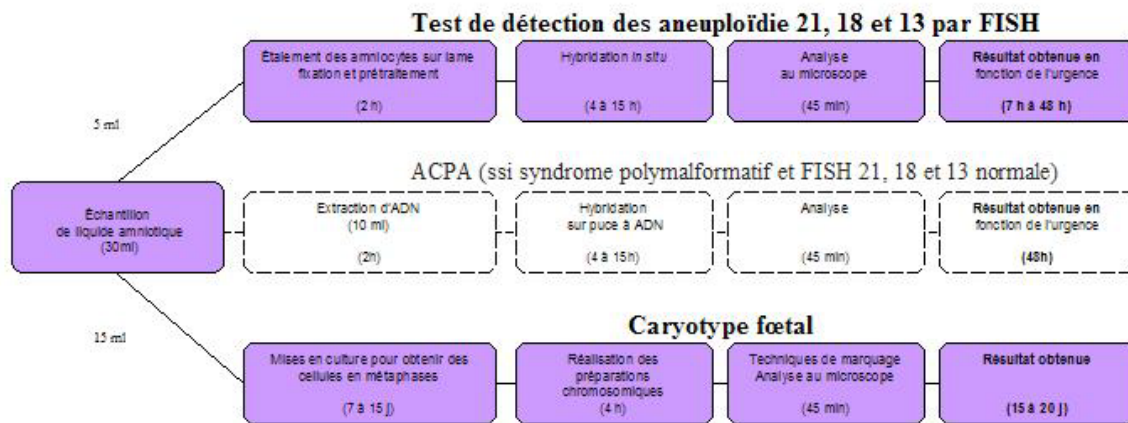
La validation constitue un item à part entière dans la grille de qualification et d'habilitation au poste de travail de la plate-forme FISH. Elle nécessite la connaissance des procédures de réalisation des examens FISH, de fabrication des sondes et de gestion des ressources bactériennes du site, des bases de cartographies et de la procédure de validation.

4. Application au test de détection des aneuploïdies des chromosomes 21, 18 et 13 sur amniocytes non cultivés

Ce test permet de détecter rapidement les anomalies de nombre chromosomiques les plus fréquentes : celles des chromosomes 21, 18 et 13 (respectivement 1/700, 1/3500, 1/6000 naissances). L'analyse effectuée directement sur les cellules du liquide amniotique permet de rendre un résultat 24h après l'amniocentèse. Le résultat complet du caryotype ne sera rendu qu'après 15 jours environ car il nécessite une culture cellulaire longue. Le caryotype permet d'étudier les autres chromosomes et en cas de trisomie 21, 18 et 13 il met en évidence les mécanismes chromosomiques impliqués (trisomie libre homogène, mosaïque, translocation, autres types de remaniement chromosomique). Cette connaissance est indispensable pour le conseil génétique à apporter au couple.



Protocole du test de détection des aneuploïdie 21, 18 et 13 en parallèle à l'étude du caryotype et de l'ACPA



4.1 Description de la méthode, choix des sondes

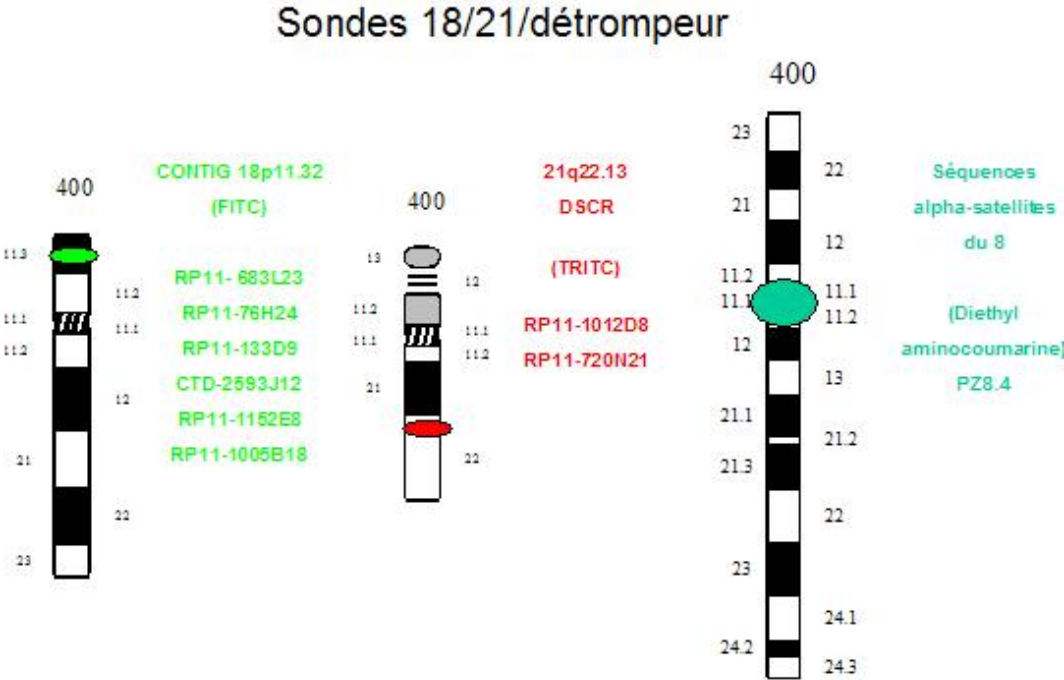
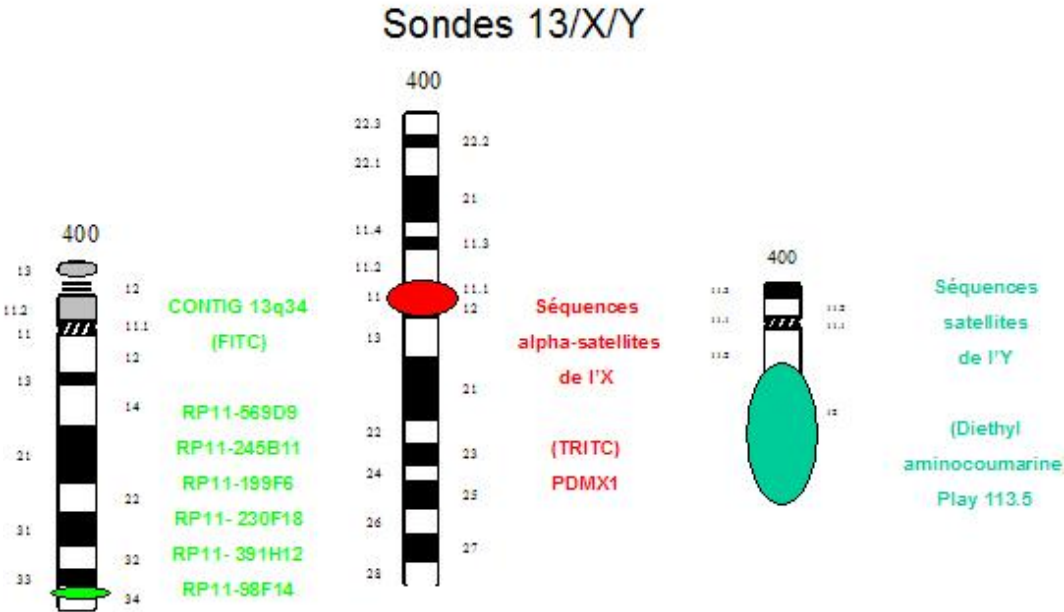
Parmi ces trois syndromes, seul le syndrome de Down, possède une région minimale critique connue, DSCR (Down Syndrome Chromosomal Region). Cette région chromosomique associée aux principaux traits phénotypiques du syndrome de Down a été découverte par Delabar et al. en 1989.

Les sondes choisies pour la détection de l'aneuploïdie du chromosome 21 sont localisées sur la région DSCR situé en 21q22.13. Ces sondes ont été testées sur site chez un patient de phénotype trisomique sans trisomie 21 mais porteur d'une trisomie partielle par insertion.

Les syndromes d'Edward (trisomie 18) et de Patau (trisomie 13) n'ont pas de région minimale critique connue à ce jour. Ainsi nous avons choisi pour leurs détections des contigs^{ix} télomériques des chromosomes 18 et 13. Ces contigs ont été construits sur le site et évalués par un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) pour s'assurer de leurs fortes spécificités afin d'être utilisés dans les diagnostics de FISH pré-implantatoire où le résultat de FISH est obtenu après hybridation d'une cellule embryonnaire unique.

En pratique, ce test est constitué de deux lots de sondes (13/X/Y et 21/18/8) hybridés sur deux plages différentes. La présence des sondes spécifiques des chromosomes X et Y permet de détecter une éventuelle contamination maternelle et la sonde du chromosomes 8 permet d'éviter toute confusion entre les deux lots de sondes.

Sondes du test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 :



4.2 Maîtrise des risques du test de détection des aneuploïdes 21, 18 et 13

La maîtrise des risques passe par une bonne gestion des 5 M, formalisé par une documentation importante au poste de travail.

4.2.1 M comme main-d'œuvre

La qualification et le savoir-faire du personnel est un point critique que nous tentons de maîtriser par la formalisation de l'accompagnement et la formation d'un nouvel opérateur. Cette formation et l'habilitation du personnel sont tracées dans la grille d'habilitation COMB-B-FORE-02-Grille_HabilplateformFISH. L'habilitation du personnel est prononcée par le biologiste responsable de secteur après une période où le nouvel opérateur est dirigé par un tuteur. La grille d'habilitation contient l'auto-évaluation du professionnel et l'évaluation par le tuteur qui supervise toutes les activités. Le maintien des compétences techniques est assuré par la formation « continue » lors de staffs techniques bi-mensuels.

4.2.2 M comme matière

Le prélèvement :

La réalisation du prélèvement est un geste important qui conditionne le résultat de l'examen. Les informations sur les conditions de prélèvement sont communiquées au préleveur via le manuel de prélèvement du PBPS. Ce manuel contient les indications pour l'identification du prélèvement, du préleveur et du prescripteur, le conditionnement de l'échantillon, les délais et température d'acheminement, les quantités et la qualité optimales et les fiches de renseignements nécessaires à la réalisation de l'analyse chromosomique.

La traçabilité des preuves de qualité du prélèvement est réalisée dans la fiche de travail liquide amniotique. Il n'y a pas à ce jour de système de gestion des non-conformités pré-analytiques mis en place car il est quasiment impossible de refaire le prélèvement en cas d'anomalie(s).

Les réactifs :

Les performances d'hybridation de chaque lot de sondes sont vérifiées par l'étude de la spécificité. Pour les autres réactifs des formulaires permettent de tracer leurs réalisations (ex : CYGE-F-FORE-0-Dnase, CYGE-F-FORE-0-TH).

4.2.3 M comme milieu

Il n'y a pas de conditions ambiantes spécifiques requises pour ce test.

Les conditions de sécurité requises pour le personnel sont décrites dans le plan expérimental.

Les conditions réglementaires requises sont l'autorisation d'exercice du site par l'Agences Régionales de l'Hospitalisation (ARS).

Deux documents sont obligatoires à la réalisation de cette analyse : l'attestation de consultation médicale de conseil génétique et le formulaire de consentement de la femme enceinte à la réalisation d'un prélèvement *in utéro* en vue d'un diagnostic prénatal.

Les comptes rendus d'analyses doivent être conservés 30 ans. C'est la raison pour laquelle l'archivage des dossiers de plus de dix ans est confié à une société spécialisée.

4.2.4 M comme méthode

La méthodologie est décrite dans la procédure analytique de l'examen FISH **CYGE-F-PRANA-O-FISH**.

4.2.5 M comme moyen

La maîtrise des risques concernant l'équipement passe par la gestion des appareils critiques utilisés pour cette analyse : bain marie 72°C(+/-2°C), étuve 37°C (+/-2°C), hybrite[®], microscope à fluorescence et son logiciel d'analyse d'images.

L'efficacité de ces appareils est gérée par les fiches de vie **COMB-D-FORE-01**, les maintenances préventives et vérifications métrologiques régulières.

4.2.6 Tableau récapitulatif

Ce tableau récapitule l'ensemble des documents qui doivent être disponibles au poste de travail afin de formaliser notre maîtrise des risques.

Type de Risques	Modalité de maîtrise
Main-d'œuvre	Fiche de poste Grille d'habilitation
Matière	Manuel de prélèvement Formulaire « Fiche de travail liquide amniotique » Formulaire de spécificité/sensibilité des lots de tests en cours Formulaire de traçabilité des réactifs utilisés pour l'examen
Milieu	Plan expérimental Fiches de donnée de sécurité
Méthode	Classeur avec procédure/mode opératoire/formulaire
Moyen	Fiche de vie équipement Certificat de maintenance et de vérification métrologique

De même, le COFRAC, nous demande de formaliser cette maîtrise des risques dans le tableau suivant :

MAITRISE DES RISQUES

(extrait SH FORM44)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire : Ponction de liquide amniotique	Qualité/Quantité de liquide	Manuel de prélèvement du PBPS
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Respect de la procédure	CYGE-F-PRANA-O-FISH
Main-d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Formation/habilitation des opérateurs	COMB-B-FORE-02-Grille_HabilplateformFISH Fiche de travail liquide amniotique Fiche de demande d'examen FISH
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Pièce noire pour la microscopie Précaution type L2	Autorisation d'exercice de l'ARS. Protections individuels et collectives (au mieux des moyens données)
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Traçabilité des lots de sondes	CYGE-F-PROG-0-VALFISH
Matériau de références (témoins) :	Collecte de préparation témoin	CYGE-F-PROG-0-VALFISH
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Bain marie 72°C (+/-2°C) Hybrite® Etuve 37°C (+/-2°C) Microscopes à fluorescence Logiciel d'acquisition d'images Sauvegarde des dossiers sur 30 ans	Fiche de vie équipement critique Certificat de métrologie Maintenance préventive Sous-traitance de l'archivage

4.3 Evaluation des performances

4.3.1 Spécificité et sensibilité du test de détection des aneuploïdies 21,18 et 13 par FISH

Etude sur site :

Pour chaque lot les études de spécificité et de sensibilité sont réalisées et les formulaires CYGE-F-FORE-O-SPEC (spécificité) et CYGE-F-FORE-O-SENS (sensibilité) sont renseignés.

Etude bibliographique :

La spécificité admise dans la littérature pour un test FISH est de 95% (Guide de Bonne Pratique en Cytogénétique Révision 3-juin 2011 p18). Comme nous l'avons vu précédemment la FISH n'est pas une méthode adaptée à la détection des faibles mosaïques.

Les trisomies par mosaïque et par translocation représentent 4 à 6 % des cas de trisomie 21 et approximativement 10% des cas de trisomie 18 et 13 (Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Génétique Médicale, MASSON, Paris, 2004 p107). Notre test est donc sensible à plus de 90%.

4.3.2 Contamination lors du test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH

Les échantillons de liquide amniotique peuvent être contaminés lors de la ponction par des cellules d'origine maternelle. Le test diagnostique comprend des sondes des chromosomes X et Y permettant de détecter cette contamination lorsque le fœtus est de sexe masculin. Dans le cas d'un fœtus de sexe féminin lorsque la ponction est hémorragique (présence de sang maternel) le résultat est rendu en portant une attention particulière à l'aspect des cellules (amniocytes fœtaux versus lymphocytes maternels) et en augmentant le nombre de cellules examinées.

4.3.3 Comparaison de méthode : test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH versus analyse du caryotype.

Le résultat FISH étant un résultat préliminaire nous avons à chaque examen accès au résultat obtenu avec la méthode de référence. Nous avons étudié 40 cas répartis aléatoirement sur 3 ans, pour éviter les biais liés aux préleveur, opérateur, terme de la grossesse, lots de sondes....

4.3.4 Robustesse du test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH

Idem que pour toutes analyses FISH.

Etant donnée la préciosité des échantillons de liquide amniotique nous ne pouvons réaliser des essais sur site.

4.3.5 Stabilité des sondes

La stabilité est évaluée lors de l'étude de la spécificité de chaque lot et sous-lot de sonde.

5. Soumettre le dossier de validation au COFRAC

Ce dossier SH FORM 44 situé ANNEXE I, devra être adossé à la procédure de réalisation des examens FISH, il pourra être transmis au COFRAC par le référent qualité du PBPS lors d'une demande d'accréditation partielle. Cette demande est formulée suivant la nomenclature du COFRAC : domaine d'accréditation biologie médicale, sous-domaine génétique, famille génétique constitutionnelle et suivant la portée-type préétablie par l'instance. Dans cette portée-type seuls les items mentionnés avec des astérisques et la nature de la porté (A ou B) sont au choix du LBM .

Portée d'accréditation du test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 par FISH
(extrait du SH INF 50)

Sous-domaine : Génétique – **Famille** : Génétique constitutionnelle (GENMOLBM)

Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
Tout échantillon biologique d'origine humaine (*) liquide amniotique	Etude morphologique de la chromatine par recherche et identification de loci "chromosome" spécifiques	Méthode de type qualitatif Hybridation moléculaire fluorescente <i>in situ</i> ("FISH rapide") interphasique mono- ou multi-sonde, et microscopie, sur préparation nucléaire	Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B)	Cytogénétique moléculaire

Conjointement, une liste détaillée des examens correspondants à la portée d'accréditation demandée doit être transmise au COFRAC. Ce listing est présenté ci-dessous.

Examen	Type d'échantillon	Principe de la méthode et équipement	Accréditation	Référence de la méthode
Détection des aneuploïdies 21, 18 et 13	Liquide amniotique non cultivé	FISH interphasique	Non	CYGE-F-PRANA-O-FISH

Le COFRAC étant en droit de demander tout ou partie des documents référencés dans le SH FORM 44.

Cette accréditation partielle du LBM du PBPS est obligatoire dès 2013.

L'extension de cette portée aux différents échantillons biologiques pris en charge sur le site (tous types d'échantillons humains) et aux différents loci recherchés (soit plus de 40 loci en cytogénétique constitutionnelle et 20 loci en cytogénétique somatique) sera la suite logique de ce travail.

La date butoir pour une accréditation totale étant 2016.

6. Conclusion

La spécialité de cytogénétique moléculaire née de la rencontre de la biologie moléculaire et de la cytogénétique conventionnelle repose sur des analyses d'hybridation *in situ* en fluorescence, le développement des outils de FISH s'est réalisé au travers de kits « maison » élaborés la plupart du temps du fait de l'absence de solution commerciales et de l'évolution permanente des besoins des cliniciens.

L'accréditation impose une mise à plat totale de ces processus « artisanaux ». De fait la principale difficulté est de dépasser le sentiment du « bien faire » pour rentrer dans celui d'une rigueur normée même s'il est certain que nous ne pourrions pour le moment pas emprunter les pratiques des disciplines plus conventionnelles.

Pour cela, il nous paraît donc important d'intensifier le travail sur le sujet notamment par le biais de société savante tel que l'ACLF ou sa branche technique l' Association des Techniciens de Cytogénétique, afin de faire jurisprudence sur l'évaluation des performances des méthodes cytogénétiques (robustesse, stabilité, paramètre nécessitant un suivi métrologique etc.), de définir des procédures consensuelles, de faire circuler des documents « pratico-pratiques », des retours d'expérience pour économiser notre temps et nos forces et pouvoir ainsi nous concentrer sur notre cœur de métier...qui nous tient à cœur.

BIBLIOGRAPHIE

NF EN ISO 15189, Laboratoires d'analyses de biologie médicale Exigences particulières concernant la qualité et la compétence, AFNOR, www.afnor.org, La Plaine Saint-Denis, août 2007

Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes en biologie médicale révision 00, SH GTA 04, COFRAC, www.cofrac.fr, avril 2011

Modalités de candidature à l'accréditation par la section santé humaine du COFRAC révision O1, SH INF 20, COFRAC, www.cofrac.fr, avril 2012

Portées-Types d'accréditation révision 00, SH INF 50, COFRAC, www.cofrac.fr, mai 2011

Groupe de travail SFBC, coordinateur M.Vaubourdolle, **Qualité et accréditation en biologie médicale**, Ann Biol Clin 2010 ; 68 (hors série n°1) : 247-294

ACLF, **Guide de bonnes pratiques en cytogénétique** révision 3, <http://www.eaclf.org/docs/GBPcyto/Guidelines-2011.pdf>, juin 2011

GLOSSAIRE

ⁱ **Cytogénétique** : discipline ayant pour objet l'étude de la structure et du fonctionnement normal et pathologique des chromosomes (condensation, recombinaison, réparation, ségrégation, transmission) et de la chromatine (organisation et rôle dans la régulation de l'expression des gènes) .

La cytogénétique médicale a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de biologie moléculaire afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques).

ii **Cytogénétique moléculaire** : c'est un domaine de la cytogénétique développant des techniques, basées sur les homologies de séquences ADN, permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes.

iii **Aneuploïdie** : anomalie de nombre des chromosomes.

iv **Site** (SH INF 20) : unité géographique et fonctionnelle du laboratoire de biologie médicale. Ainsi c'est le regroupement des différents sites (Anatomie Pathologique, Biochimie générale, Biochimie métabolique, Centre d'étude des déficits immunitaires, Exploration fonctionnelles, Génétique médicale, Immunologie biologique, Hématologie-Hémostase, Oncohématologie, Microbiologie, Toxicologie, Histologie-Embryologie-Cytogénétique) qui constitue le laboratoire multi-sites du PBPS du GH Necker-Enfants Malades.

v **Référentiel d'accréditation** (SH INF 20) : norme et documents d'exigences selon lesquels la demande d'accréditation est examinée.

vi **Marquage CE (Conformité Européenne)** : pour apposer le marquage CE, le fabricant doit réaliser des contrôles et essais assurant la conformité du produit aux exigences définies dans les directives concernées.

vii **CQN** : Contrôle National de Qualité.

viii **Courbes de ROC (Receiver Operating Characteristic)** : représentation graphique de la relation entre la sensibilité et la spécificité.

ix **Contigs** : séquence génomique continue et ordonnée générée par l'assemblage des clones d'une bibliothèque génomique (plasmides, cosmides, BAC ou YAC) qui se chevauchent.