

Stratégie d'accréditation des anomalies moléculaires somatiques rares détectées ou quantifiées par *polymerase chain reaction* : recommandations du GBMHM

Accreditation strategy for rare somatic molecular abnormalities detected or quantified by polymerase chain reaction: GBMHM recommendations

Pierre Sujobert^{1,a}

Stéphanie Dulucq^{2,a}

Anne Sophie Alary³

Pascaline Etancelin⁴

Anne Bouvier⁵

Lisa Boureau²

Aurélie Chauveau⁶

Olivier Kosmider⁷

Pascale Flandrin⁸

Groupe des biologistes
moléculaires des hémopathies
malignes (GBMHM)

¹ Hospices civils de Lyon,
Hôpital Lyon Sud, Service
d'hématologie biologique, Pierre Bénite,
France

² Laboratoire d'hématologie,
Hôpital Haut-Lévêque,
Centre hospitalier universitaire
de Bordeaux, Pessac, France

³ Laboratoire d'oncogénétique
moléculaire, Institut Paoli Calmettes,
Marseille, France

⁴ Laboratoire de génétique oncologique,
Centre Henri Becquerel, Rouen, France

⁵ Laboratoire d'hématologie,
Centre hospitalier universitaire
d'Angers, Angers, France

⁶ Laboratoire d'hématologie,
Centre hospitalier régional universitaire
de Brest, Brest, France

⁷ Laboratoire d'hématologie,
Hôpital Cochin, Paris, France

^a contribution égale au travail

Résumé. L'accréditation des analyses de biologie médicale est une exigence qui concernera l'ensemble des actes en 2020. Le groupe des biologistes moléculaires en hématologie (GBMHM) accompagne cette démarche par des campagnes d'évaluation externe de la qualité, et la publication de recommandations structurantes, ayant permis l'accréditation des analyses les plus fréquentes par la plupart des laboratoires. Cependant, certaines anomalies moléculaires concernent un nombre extrêmement réduit de patients (et parfois un patient unique), et ne peuvent donc pas être évaluées de la même manière. Afin d'accompagner l'accréditation de ces analyses rares, et pour lesquelles la préciosité des matériels fait qu'il est difficile de réaliser des évaluations externes de la qualité ou même des contrôles inter-laboratoires, le GBMHM propose des recommandations structurantes, en reconnaissant que les analyses utilisant des méthodes déjà accréditées par un dossier de validation de méthode extensif, pourront être accréditées sans que l'intégralité des tests analytiques ne soit nécessaire. Plus particulièrement, les analyses reposant sur la PCR quantitative ou sur la PCR en point final pourront être accréditées après vérification de la spécificité des amorces, de la répétabilité et/ou de la fidélité intermédiaire, et des limites de détection et de linéarité. Ces recommandations, en précisant la démarche de validation de méthode pour les analyses d'anomalies moléculaires rares, permettront d'étendre à toutes les analyses l'exigence de l'accréditation selon la norme ISO 15189.

Mots clés : PCR, accréditation, hémopathies

Abstract. In 2020, accreditation of molecular tests according to ISO 15189 is a requirement for all French medical laboratories. For many years, the GBMHM group (French Group of Molecular Biologists in Hematology) supports this approach through organization of external quality evaluation campaigns, and by publishing recommendations that have allowed the accreditation of the most frequent molecular tests for most laboratories. However, some molecular abnormalities concerns very few patients (and sometimes a single patient), and therefore cannot be evaluated in the same way, because of the lack of external quality controls or inter-laboratory comparisons. In order to allow the accreditation of these rare analyzes, the GBMHM proposes recommendations, based on the fact that analyzes using the same methodology than those already accredited by an extensive validation process, may be accredited without the need for full analytical validation. In particular, assays based on quantitative PCR or endpoint PCR may be accredited after verification of primer specificity, repeatability and/or reproducibility, and the determination of detection or linearity limits.

Correspondance : P. Sujobert
<pierre.sujobert@chu-lyon.fr>

⁸ Laboratoire d'hématologie, Hôpital Nord, Centre hospitalier universitaire de Saint-Étienne, Saint-Étienne, France

Article reçu le 09 juillet 2019,
accepté le 19 septembre 2019

These recommendations, by defining the validation approach for rare molecular abnormalities, make it possible to extend the requirement of accreditation for rare tests, to provide the best patient care.

Key words: PCR, accreditation, hematological malignancies

La démarche qualité appliquée à la biologie médicale a pour objectif l'amélioration continue des performances analytiques [1]. L'accréditation est obligatoire pour tous les laboratoires (art. L 6221-1 du Code de la Santé publique) et doit concerner l'intégralité des analyses de biologie médicale de la liste de la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) à l'horizon 2020. Sont également concernées par cette obligation d'accréditation les analyses figurant sur la liste complémentaire, définies par la direction générale de l'offre de soins (DGOS) (<https://solidarites-sante.gouv.fr/systeme-de-sante-et-medico-social/recherche-et-innovation/rihn>). L'accréditation d'une analyse est délivrée par le Comité français d'accréditation (Cofrac) après évaluation sur site du système de management de la qualité, qui s'assure de la conformité des processus à la norme ISO15189. Parmi ces processus, le dossier de validation de méthode doit démontrer que la technique mise en œuvre répond aux critères de performances biologiques et/ou cliniques préalablement définis, en analysant plusieurs paramètres quantitatifs et qualitatifs pertinents pour l'analyse concernée. Une refonte des différentes portées a récemment été rapportée limitant au nombre de 4 les principales portées concernées en hématologie moléculaire : BM GS03, BM GS04, BM GS07, et BM IC04 (SH INF 50, révision 6, février 2019). L'Institut national du cancer (INCa) a proposé un guide utile présentant les stratégies de validation de méthode en génétique somatique, disponible en ligne : <https://www.e-cancer.fr/content/download/86001/874800/file/Validation-de-methode-en-genetique-Somatique.pdf>.

Concernant l'analyse moléculaire des hémopathies, les laboratoires français regroupés au sein du groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes (GBMHM) ont promu depuis plusieurs années la démarche qualité, notamment en publiant des recommandations structurantes [2], et en mettant en œuvre des campagnes d'évaluation externe de la qualité pour les analyses les plus fréquentes (comme par exemple la quantification du transcrit de fusion BCR-ABL1, la détermination et la quantification de la mutation V617F du gène JAK2, ou l'analyse de la clonalité lymphoïde B et T). Ces analyses ont été accréditées ou sont en cours d'accréditation pour la plupart des laboratoires. Toutefois, de nombreux patients présentent des hémopathies rares, pour lesquelles des tests moléculaires sont importants voire indispensables au dia-

gnostic, à l'évaluation pronostique, ou au suivi de la réponse thérapeutique. À titre d'exemple, on peut citer les mutations du gène NPM1, dont la détection et le suivi sont indispensables pour la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. Ces mutations sont la plupart du temps canoniques (type A, B et D, qui concernent 90 % des patients), mais peuvent aussi être spécifiques de chaque patient (19 patients/346 ont une mutation privée de ce gène, dans la série rapportée par l'intergroupe anglais [3]). Étant donné la rareté de ces hémopathies et la quantité d'anomalies moléculaires différentes à analyser, il n'est pas possible de mettre en œuvre une validation de méthode exhaustive pour chacune de ces analyses pour plusieurs raisons :

- absence d'évaluation externe de la qualité (EEQ) en raison du faible nombre de laboratoires réalisant ces analyses (y compris à l'échelle européenne) ;
- rareté des prélèvements de patients rendant impossible l'échange de matériel pour des contrôles externes de la qualité ou des contrôles interlaboratoires ;
- quantité potentiellement illimitée d'anomalies moléculaires d'intérêt.

D'un point de vue clinique, la justesse de la quantification absolue de ces cibles moléculaires n'est pas nécessairement primordiale, mais c'est surtout la cinétique d'évolution qui est décisionnelle [3, 4], les patients étant en général suivis dans le même laboratoire.

Afin de promouvoir la démarche qualité vers l'accréditation, tout en prenant en compte les contraintes exprimées ci-dessus pour les anomalies les plus rares, le GBMHM propose dans cet article des recommandations pour la rédaction d'un dossier de validation concernant la détection ou la quantification des anomalies rares par la *polymerase chain reaction* (PCR) en point final, la PCR quantitative ou la PCR digitale.

Stratégie d'accréditation

Notre argumentation repose sur le fait qu'au sein d'un laboratoire, quel que soit le gène analysé, les techniques de PCR (en point final, quantitative ou digitale) utilisent de nombreuses étapes communes telles que la phase pré-analytique, l'extraction des acides nucléiques, la reverse transcription ou encore les réactifs de PCR. La principale

différence entre deux PCR différentes est donc le couple d'amorces et éventuellement les sondes qui sont spécifiques de la région génomique d'intérêt. Ainsi, si au moins une analyse du laboratoire accréditée repose sur une technique de PCR dont la validation de méthode a été accréditée, nous pouvons raisonnablement estimer que la maîtrise des risques mise en œuvre et la validation de méthode correspondant à cette analyse pourront être étendues à d'autres analyses similaires, à condition de vérifier certains critères détaillés plus loin dans ce document.

En se basant sur la nature des anomalies génétiques à analyser et sur les spécificités techniques de la PCR, nous proposons trois catégories d'analyses par PCR auxquelles nous associons une validation de méthode de référence effectuée sur le gène ou transcrit le plus représentatif :

- catégorie 1 : les PCR quantitatives visant à détecter des transcrits de fusion oncogéniques ou des transcrits surexprimés, pour lesquelles il existe une analyse accréditable grâce à l'existence d'un programme d'EEQ (BCR-ABL1 quantitatif) ;
- catégorie 2 : les PCR quantitatives visant à détecter des mutations géniques, pour lesquelles il existe deux analyses accréditables grâce à l'existence d'un programme d'EEQ (JAK2 V617F quantitatif et NPM1 de type A quantitatif) ;
- catégorie 3 : les PCR en point final, à partir d'une matrice d'ADN ou d'ADN complémentaire, qui sont suivies d'un autre sous-processus pour analyser le produit d'amplification (dépôt sur gel, analyse de fragment sur séquenceur capillaire, séquençage Sanger, analyse de séquence par *high resolution melting* (HRM), etc.). Pour cette catégorie, il existe des EEQ pour le typage des transcrits BCR-ABL1, ou pour la recherche des mutations du gène CALR.

Les laboratoires ayant accrédité une analyse dans une catégorie pourront suivre la démarche proposée ici pour valider le processus de PCR en vue de l'accréditation d'autres analyses de la même catégorie (liste non exhaustive) :

- catégorie 1 : détection et quantification de PML-RARA (bcr 1, 2 et 3), RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO), CBFB-MYH11, TCF3-PBX (E2A-PBX), MLL-AF4, transcrits rares de BCR-ABL1, FIP1L1-PDGFR, ETV6-PDGFRB, des réarrangements des locus IgH/TCR spécifiques de chaque patient pour le suivi des leucémies aiguës, et de la surexpression des transcrits WT1, EVI1, PDGFR/B etc. ;
- catégorie 2 : détection et quantification des mutations de NPM1 non-A, FLT3 (TKD), MYD88 L265P, MPL, CALR, etc. ;
- catégorie 3 : amplification du gène CEBPA pour séquençage Sanger, recherche des mutations de FLT3 (duplications en tandem et TKD), recherche des mutations des gènes IDH1 et IDH2, recherche des mutations de l'exon 12 de JAK2, des gènes MPL ou CALR, recherche des muta-

tions du domaine tyrosine kinase d'ABL1, étude du statut mutationnel du gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines, etc.

Performances à valider pour les analyses rares par PCR

En se basant sur la validation de méthode de la PCR (en point final, quantitative ou digitale), nous proposons que l'accréditation de nouvelles analyses utilisant une même technique nécessite essentiellement de valider la spécificité des couples d'amorces et l'interprétation des résultats. En particulier, en l'absence d'évaluation externe de la qualité, le calcul de l'exactitude de la mesure des analyses rares ne pourra pas être effectué. Afin de garantir la bonne prise en charge des patients, et réduire le risque d'un résultat erroné le GBMHM propose, pour chaque analyse rare, de suivre les points suivants pour vérifier les performances de la méthode :

- décrire la méthode et les spécificités qui la rattachent à la méthode de référence ;
- rappeler les références bibliographiques ayant servi au design des amorces/sondes de PCR. On doit également réaliser un alignement de la séquence choisie (par blastn) pour s'assurer de sa spécificité à l'échelle du génome humain. En cas de choix d'amorces non publiées, on devra s'assurer de l'absence de polymorphismes fréquents au niveau des amorces et de l'absence de structures secondaires (phénomènes d'hairpin) ;
- mesurer la répétabilité de l'analyse, de préférence aux seuils pertinents pour la prise en charge clinique, avec un facteur de variation (*fold change*) acceptable de trois fois [2]. Si le matériel est extrêmement rare (anomalie moléculaire propre à un patient par exemple), on privilégiera son utilisation pour le calcul de la fidélité intermédiaire (cf. infra) ;
- mesurer la fidélité intermédiaire de la technique en utilisant les CIQ (contrôles internes de qualité), avec un *fold change* acceptable de cinq fois [2]. Pour les anomalies moléculaires tellement rares que les laboratoires sont contraints de ré-analyser un échantillon précédent du patient pour s'assurer de la fiabilité de la technique, il est acceptable d'utiliser ces contrôles en définissant aussi précisément que possible les règles d'acceptation/de rejet de chaque expérience. Par exemple, on pourra choisir un *fold change* acceptable inférieur à 3 pour les valeurs hautes (diagnostic) et inférieur à 5 pour les valeurs basses (maladie résiduelle), ou une variation du *cycle threshold* (Ct) inférieur à 1 pour les Ct inférieurs à 36 ;
- la mesure de l'exactitude doit être réalisée s'il existe un EEQ, ou un programme d'échanges interlaboratoires ou

de CIQ externalisés avec un nombre suffisant de laboratoires (la norme ISO 15189 propose un nombre supérieur à 12 laboratoires (paragraphe 5.4.2), ce qui est rarement possible pour les anomalies moléculaires rares en hématologie). Comme expliqué plus haut, il n'existe pas de telle procédure pour les analyses les plus rares, pour des raisons inhérentes à la rareté de certaines anomalies moléculaires, et dans ces cas-là, l'absence de mesure de l'exactitude ne doit pas être un obstacle à l'accréditation des analyses nécessaires à la prise en charge des patients.

Ces programmes seront établis par les laboratoires participants à des fréquences compatibles avec la rareté des échantillons disponibles, les laboratoires ne devant pas épuiser les ressources patients :

- pour la PCR quantitative, mesurer la limite de détection, qui peut être exprimée en nombre de copies, en Ct ou en ratio par rapport à un gène contrôle, par exemple comme correspondant à la valeur moyenne ± 3 écarts-types obtenue à partir de 20 ou 30 témoins ;
- pour la PCR quantitative, mesurer la limite de linéarité, par exemple en diluant un témoin positif (au $1/10^e$, $1/100^e$, $1/1000^e$, etc.) ;
- pour la PCR en point final, mesurer la spécificité, par exemple par l'analyse rétrospective des témoins négatifs ;
- définir les spécificités de la vérification technique et validation biologique.

Cas particuliers

PCR digitale : la PCR digitale est une PCR en point final qui est quantitative car elle est réalisée plusieurs milliers de fois pour un échantillon donné. Elle peut être utilisée comme méthode qualitative avec un résultat dichotomique (présence ou absence de mutation) et/ou comme méthode quantitative en permettant la quantification absolue d'une cible. Pour la validation de méthode d'une analyse de PCR digitale, même si la finalité du test est qualitative, il est recommandé d'évaluer les critères comme s'il s'agissait d'une méthode quantitative. Une attention particulière sera apportée à la détermination des limites de blanc (LOB) et de détection (LOD) pour chaque système d'amorces et de sondes, ainsi qu'à l'évaluation de la contamination compte tenu des très faibles quantités de cible recherchées [5].

Le suivi des performances pourra inclure le suivi d'indicateurs qualité :

- mesure annuelle de la fidélité intermédiaire par l'analyse des CIQ ;
- pour la PCR quantitative, suivi du Ct du gène contrôle (si adéquat) qui mesure également la performance de la phase pré-analytique, de l'extraction des acides nucléiques et de la reverse transcription (si concernée) ;
- pour la PCR qualitative : l'analyse annuelle des CIQ ;
- pour la PCR digitale : l'analyse annuelle des CIQ.

Conclusion

Les recommandations proposées par le GBMHM dans ce document ont pour objectif de promouvoir la démarche qualité pour toutes les analyses de biologie moléculaire, y compris celles concernant peu de patients et, de ce fait, ne pouvant être validées de manière exhaustive. Elles ont donc l'ambition d'aider les laboratoires à accréditer leurs analyses avec un niveau maximal d'exigence, en prenant en compte les contraintes inhérentes aux analyses rares voire spécifiques de chaque patient.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Vassault A. Interpretation and analysis of the requirements of the standard EN ISO 15189: 2012. *Ann Biol Clin* 2013 ; 71 : 19-28.
2. Flandrin-Gresta P, Cornillet P, Hayette S, Gachard N, Tondeur S, Mauté C, *et al.* Recommendations for accreditation of laboratories in molecular biology of hematologic malignancies. *Ann Biol Clin* 2015 ; 73 : 595-630.
3. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, *et al.* Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl J Med* 2016 ; 374 : 422-33.
4. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, *et al.* Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2013 ; 121 : 2213-23.
5. Denis JA, Nectoux J, Lamy PJ, Rouillac Le Sciellour C, Guermouche H, Alary AS, *et al.* Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. *Ann Biol Clin* 2018 ; 76 : 505-23.