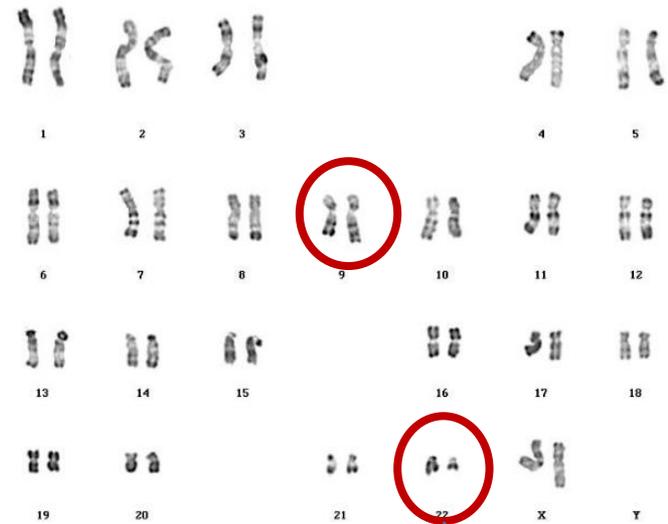
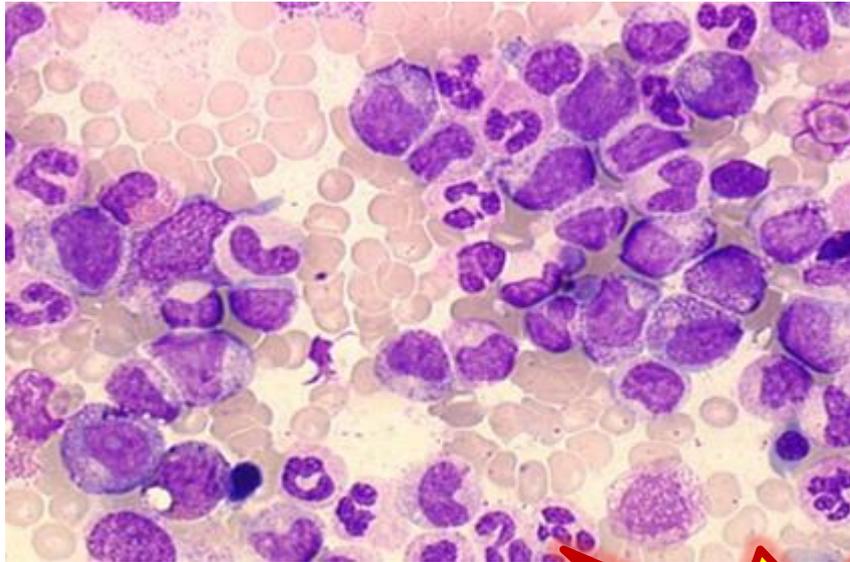


Evaluation d'une méthode
Automatisée de Quantification du
Transcrit BCR-ABL dans la LMC:
Cepheid Xpert Monitor AssayTM

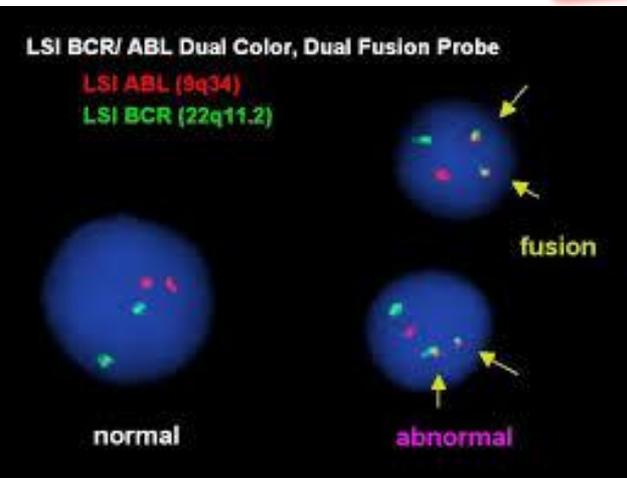
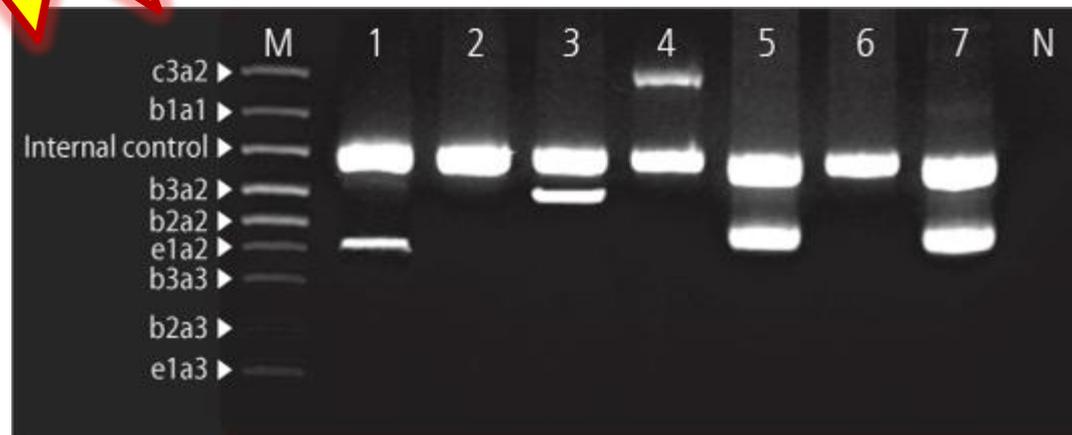
F. Harieche, N.Toukal, N.Abdennebi, F.Boukhemia,
W.Assouak, R.Belhimeur, F.Zerhouni, R.M.Hamladji,
R.Ahmed-Nacer

Leucémie Myéloïde Chronique: LMC



BCR-ABL

PH1



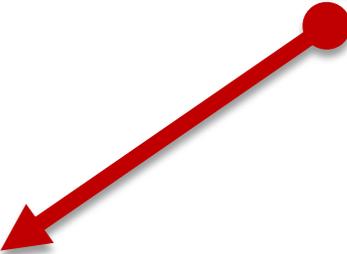
Signature moléculaire de la LMC



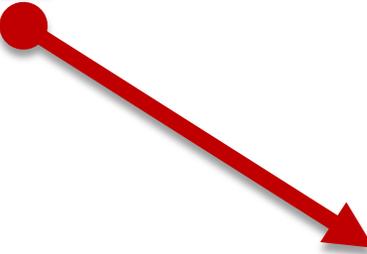
BCR-ABL



Outil Unique



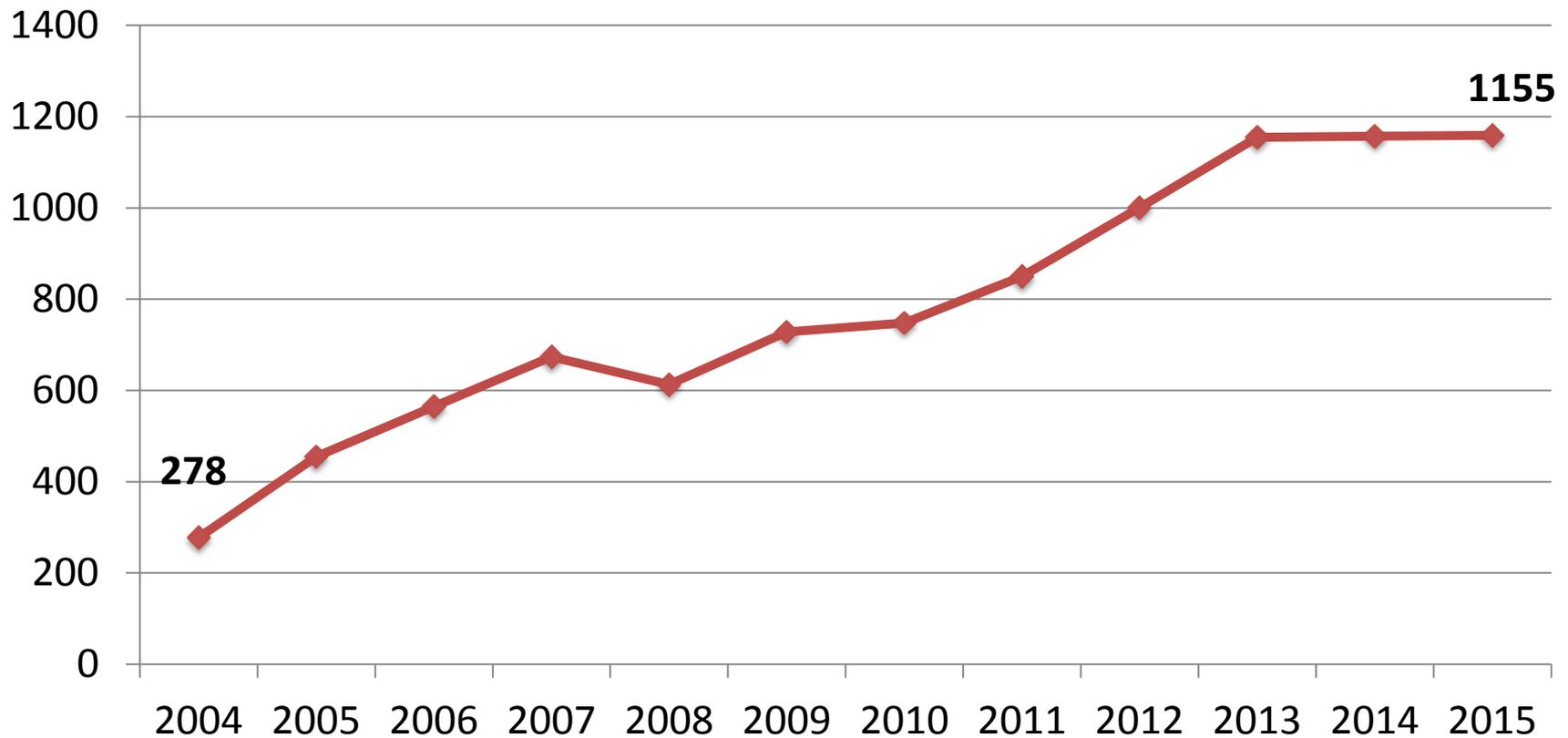
Diagnostic



**Charge Tumorale
(MRD)
Suivi Thérapeutique**

Demandes de Quantifications BCR-ABL CPMC

BCR-ABL



Monitoring moléculaire LMC (ITK)

- Réponses cliniques et **cytogénétiques (RCyC)**
- Détection BCR-ABL niveaux <<< CytoG/ FISH...



Techniques **sensibles...!**

- Laboratoires **spécialisés**
- Méthodes **sophistiquées**: PCR Quantitative en temps réel, **(Gold Standard)**
- Techniciens **expérimentés**
- Longues
- **Standardisation** et **contrôle de qualité.**

Xpert BCR-ABL Monitor™ (Cepheid)



Cartouche (IS) OMS

- Simplification,
- Automatisation
- Standardisation

- ***GeneXpert Dx System IV.***

Objectifs

- Analyse des échantillons patients LMC avec Xpert BCR-ABL Monitor Assay (**Gx**)
- Comparer les résultats avec RT- qPCR (**EAC**) conventionnelle.

Répartition des niveaux de réponse

Concordance des niveaux de réponse.

Patients

- Etude prospective,
- Mars octobre 2015,
- N= **34 patients**,
- **LMC, BCR-ABL+ (b2a2 et/ou b3a2)**
- Traités (ITK),
- **suivi mol régulier (ELN)**
- Choix **aléatoire**:
ordre de réception au labo.

Paramètre	Résultat
<u>Sexe</u>	
Hommes	13
Femmes	21
R (h/f)	0.61
<u>Age (années)</u>	
[Intervalle]	[13 – 74]
Médiane	49
<u>Score de Sokal : n (%)</u>	
Faible risque	5 (14,7%)
Risque intermédiaire	10 (29,4%)
Haut risque	19 (55,88%)
<u>Type de transcrit au Diagnostic</u>	
b2a2	12 (35,3%)
b3a3	22 (64,7%)
<u>Phase de la maladie : n (%)</u>	
Chronique	27 (79,4%)
Accélérée	07 (20,6%)

Echantillons biologiques

- **Sang Total** : la veine du pli du coude
méthode RT-qPCR: **7 à 10 ml**
méthode GenXpert: **5 ml**



EDTA



Citrate 3Na

Héparine : Ct décalés de 2 – 2.5



RT-qPCR (EAC),



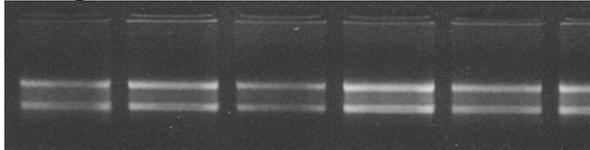
le système GenXpert: BCR-ABL (Gx)

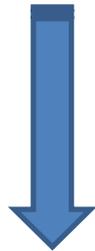
❖ **Analyse des réception, dans les 6 heures.**

❖ **Stables 24h à +4°C**

❖ **> 24h: non recommandé (Décroissance de Linéarité de la courbe).**

RT-PCR Quantitative en temps réel (qRT-PCR)

- **Séparation** des cellules nucléées par lyse totale.
- **Extraction** des ARN totaux au Trizol 
- Control qualitatif et quantitatif des ARN

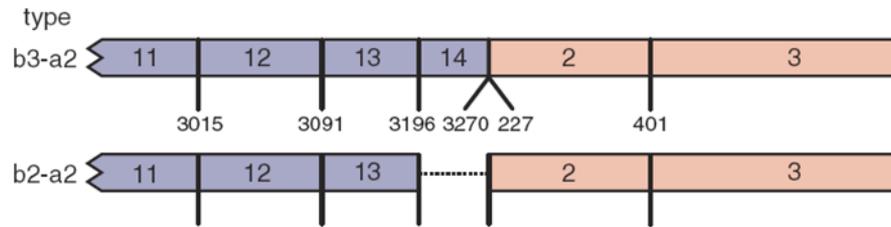


- Phase RT: cDNA
- PCR Quantitative en temps réel (Principe TaqMan)

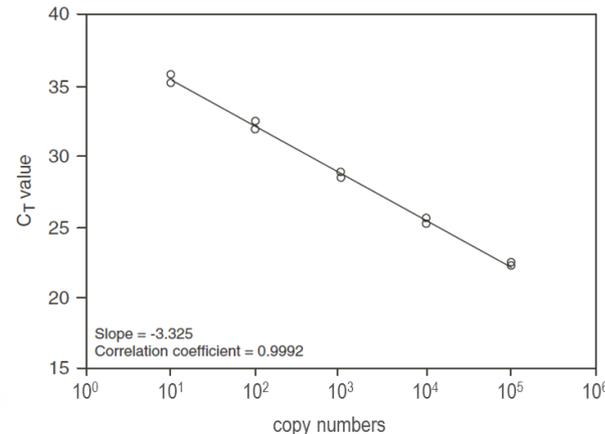
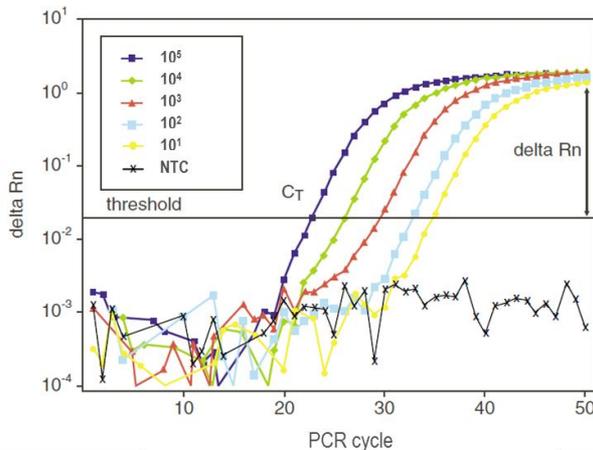
Gene ABL: Control d'amplification in vitro

Principe des méthodes de quantification des transcrits *BCR-ABL1* par RQ-PCR

M-bcr. *BCR-ABL* p210



ABL (9q34)

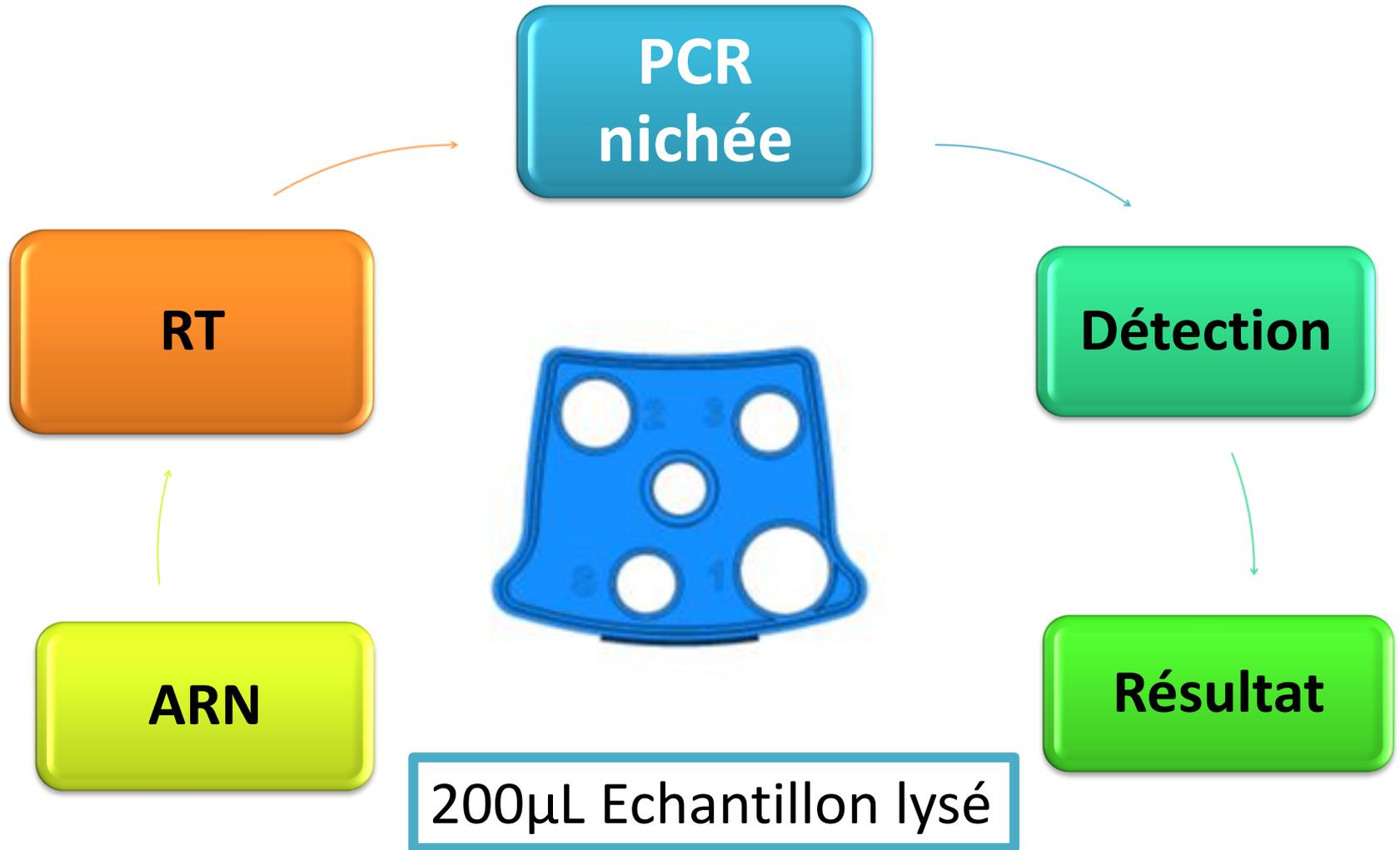


$$\frac{\text{BCR-ABL copy number}}{\text{Control Gene copy number}} \%$$

Gabert J et al., *Leukemia* 17, 2318-57, 2003

Beillard et al., *Leukemia* 17, 2474-86, 2003

Méthode Gx

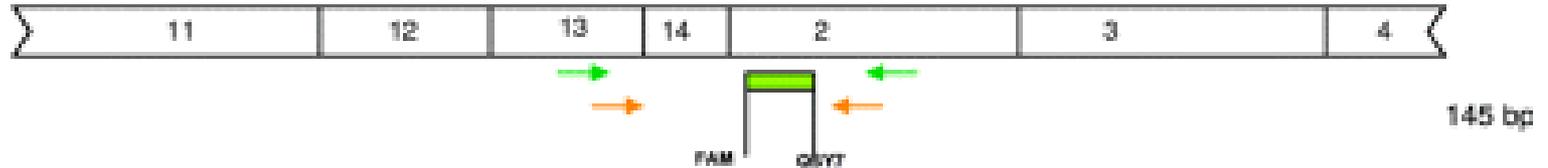


2h: ABL Contrôle Endogène et Normalisation des résultats.

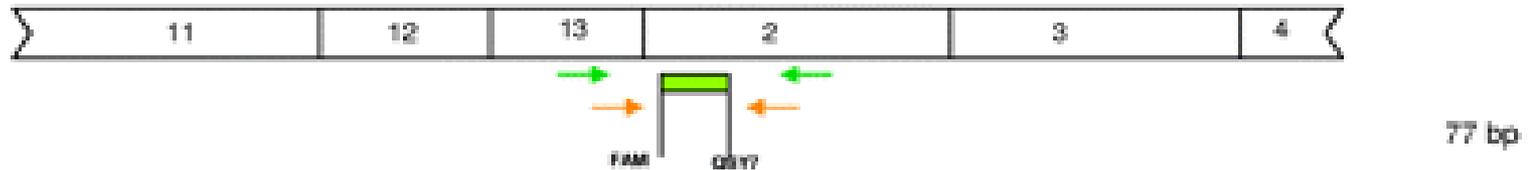
Design (amorces et sondes)

BCR-ABL

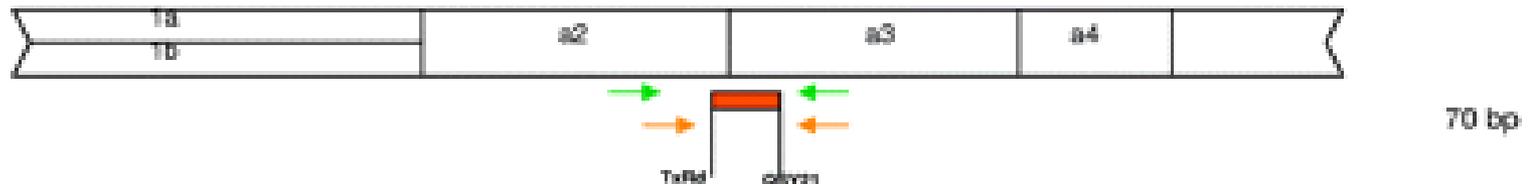
b3a2



b2a2



ABL

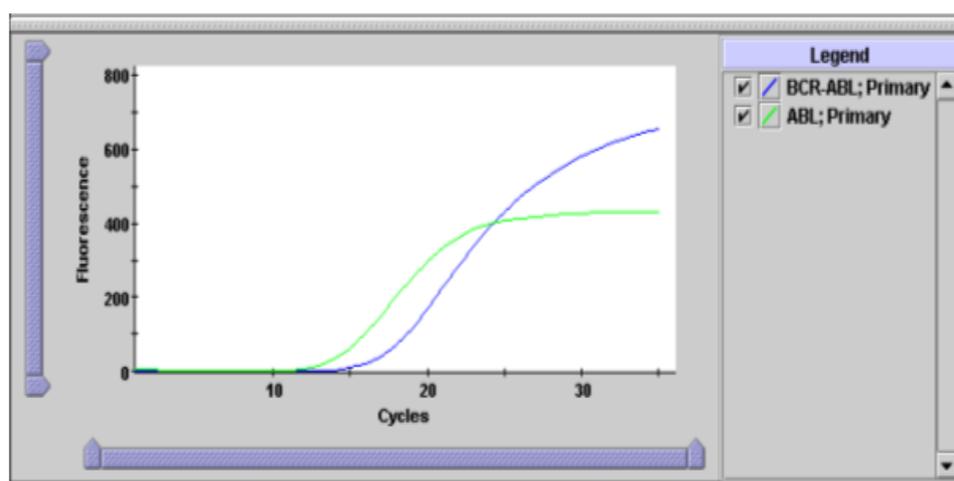


Amorces externes: synthèse cDNA + 15 cycles de PCR.

Amorces internes: PCR nichée de 35 cycles (PCR en temps réel).

Sondes marquées: FAM et Texas Red: ABL et BCR-ABL (multiplex)

$$\%BCR-ABL/ABL (IS) = E^{\Delta Ct} (Ct ABL - Ct BCR-ABL) \times 100 .$$



$$E^{\Delta Ct} = 1.95$$

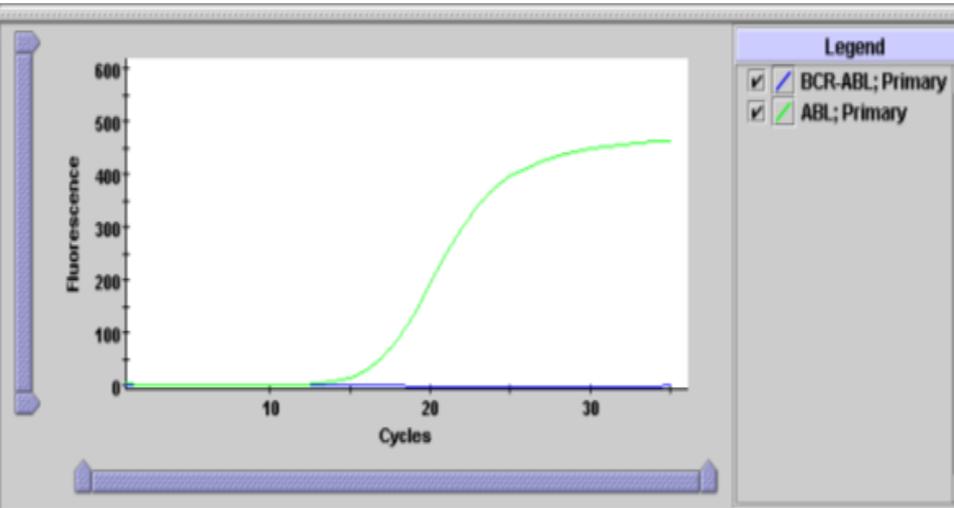
$$Ct ABL = 15$$

$$Ct BCR-ABL = 23$$

$$\Delta Ct = -8$$

$$\% BCR-ABL/ABL = 1.95^{(-8)} \times 100 = 0.48\% IS$$

BCR-ABL détecté à un taux de 0.48% IS.



$$E^{\Delta Ct} = 2.0$$

$$Ct ABL = 12$$

$$\Delta Ct = 12 - 32 = -20$$

$$\% BCR-ABL/ABL IS = 2.0^{(-20)} \times 100 = 0.00016\% .$$

Résultat: BCR-ABL non détecté à une limite de détection de 0.00016%(IS).

Ct ABL: [12 – 18] Ct >18 ou <12: Résultat est invalidé
Ct BCR-ABL > 32: Résultat Négatif.

Résultats

- Invalidé EAC: 1 pt: Copies ABL < 10 000,
- Invalidé Gx: 2 pts

1pt: **Ct ABL > 18**: mauvaise qualité (**Conservation..!**)

1 pt **Ct ABL < 12**: GB élevé (50µL).[25 – 200µL]



Comparables pour 32 pts

BCR-ABL (%IS)	EAC	Gx
Min%	0	0
Max%	51,08	22
Médiane%	0,08	0,017

Résultats positifs/ Négatifs

Méthode	Négatifs	Positifs	Total
EAC	1 (3,1%)	31(96.8%)	32
Gx	6 (18,7%)	26 (81.3%)	32
Fisher	p= 0,01		

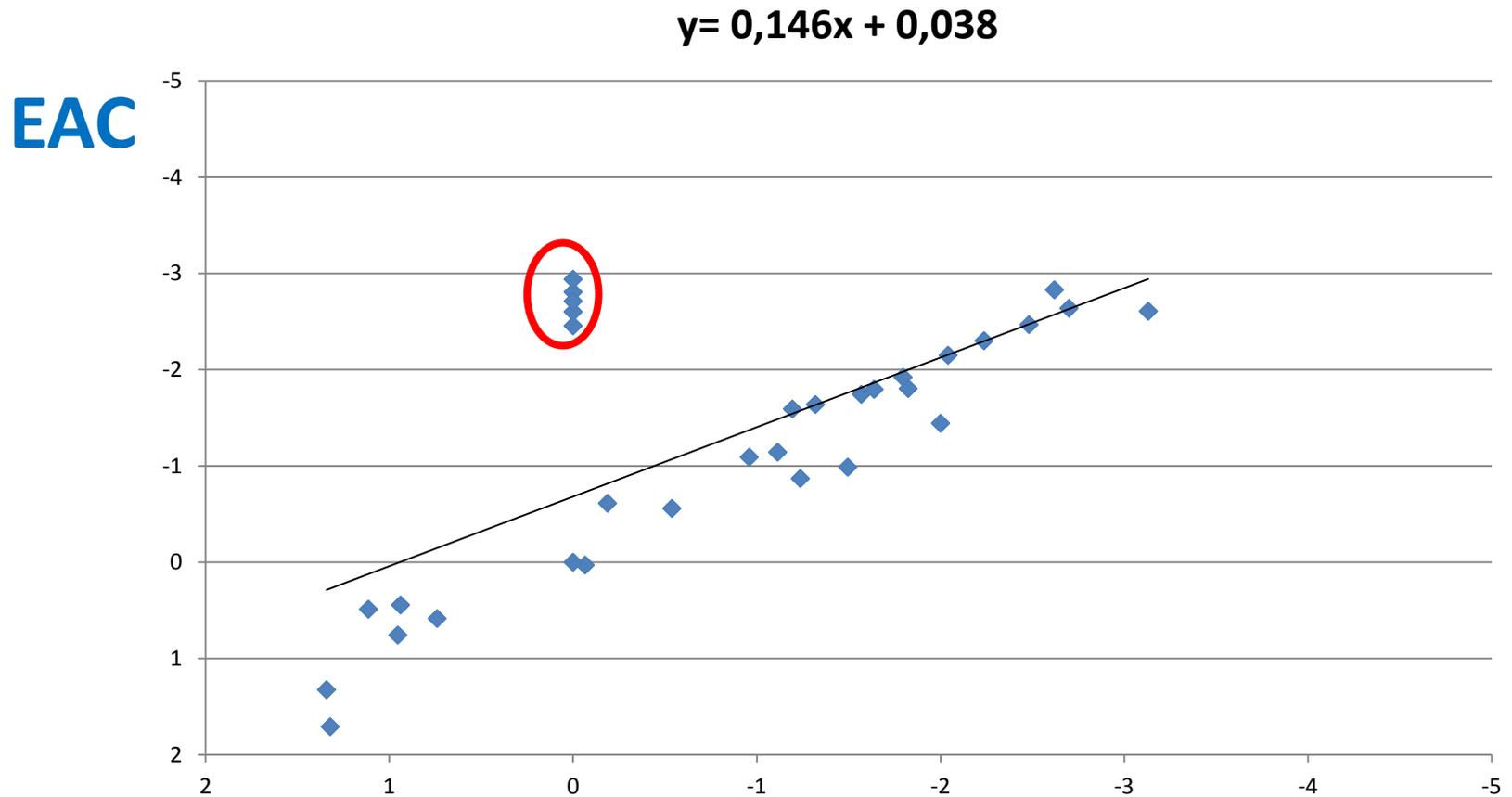
Evaluation de la Concordance

$$\text{Concordance} = \frac{\text{nombre de prélèvements classés à un niveau de réponse par les 2 méthodes}}{\text{nombre de prélèvements classés à un niveau de réponse par l'une au l'autre des 2 méthodes}} \%$$

Type de réponse	Gx	EAC	Gx et EAC	Gx ou EAC	Concordance
RMM <0,1%	11	10	10	11	90%*
RM4 <0,001%	3	4	3	4	75%**
RM4.5 <0,0032%	2	7	2	7	28,57%* **
RM5 <0,0001%	7	1	1	7	14,2%** *

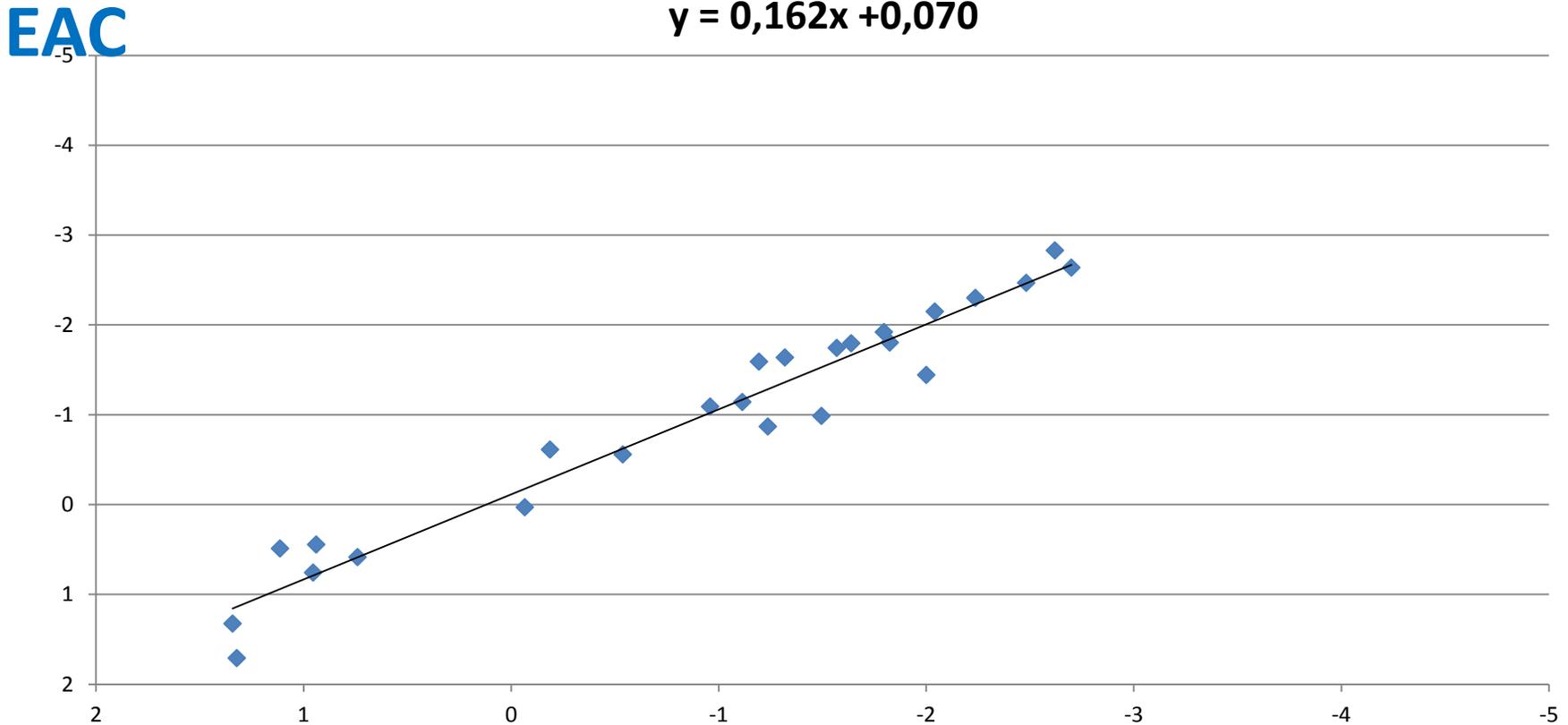
Corrélation EAC vs Gx

- Le coefficient de corrélation est de $R^2= 0,70$.



Corrélation EAC vs Gx

- *Droite de régression sans les résultats RM4,5 et RM5.*
- Le coefficient de corrélation est de **$R^2= 0,97$** .



Discussion

	N	INV (%)	R²	Concordance	Niveau réponse
Bochicchio & al (Italy 2014)	158	6 (3,8%)	0.92	83%	RM 4.5
J.M Cayuela (St Louis 2011)	75	2 (2%)	0.92-0.97	71 – 95%	RM4.5
CPMC (2015)	32	1(3%)	0.97	75 – 90 %	RM4

Sensibilité: Limite de Détection:LOD

➡ Quantité d'ARN:

- mL sang (EAC).....
- μ L sang (Gx).

➡ Calcul ratio BCR-ABL/ABL

	Meilleure Qualité	Mauvaise qualité
Ct ABL	12	18
Δ Ct	$12 - 32 = 20$	$18 - 32 = 14$
Ratio BCR-ABL/ABL	0.0001%	0.01%

Méthode Gx

- Domaine de mesure: **0.01% - 0.0001%**
- Suffisant pour définir la RMM.
- Bonne concordance avec EAC jusqu'à RM4.5
- Tendance a sous estimer les résultats:
1.5 log < EAC (JMC).... Faux négatifs.

Avantages

- Automatisation
- Rapide:
Temps de Manip: 15 min
Résultat 2H (2h20min).
- Ratios BCR-ABL/ABL (%)
- Alignés IS (lot spq).
- Pas de courbe Etalon
- pas de Contamination.
- Laboratoires non spécialisés
- Standardisation et reproductibilité interlaboratoire.

Limites

- b2a2/b3a2: seuls détectés
- Variants BCR-ABL1: 6/292 (2%)
- **Ne doit pas être utilisé au diagnostic....!**
- **Sensibilité réponses mol profondes.**
- Les patients neg devront être repris par EAC.
- **Coût cartouches (repasses!)**

Conclusion

- L'essai Xpert Monitor BCR-ABL1 peut être utilisé de façon **appropriée** pour fournir des résultats **quantitatifs reproductibles** chez les patients LMC traités par des ITK.