

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



N° d'ordre

THESE UNIQUE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO
(DOCTORAT UNIQUE)**

*Doctorat Unique en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes
Biologiques
spécialité Hématologie*

Par

Sawadogo Salifo

**Titre : Apport de la PCR quantitative sur la réponse moléculaire de la
leucémie myéloïde chronique en réponse moléculaire profonde**

Présentée et soutenue publiquement le 13 Février 2016 devant
le jury composé de :

Président : Pr Adrien Marie Gaston Belém, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Membres : Pr Jacques Simporé, Université Ouaga I professeur Joseph Ki-Zerbo

Pr Athanase Millogo, Université Ouaga I professeur Joseph Ki-Zerbo

Dr Appolinaire Sawadogo, Université Ouaga I professeur Joseph Ki-Zerbo

Directeur de Thèse : Pr Eric Delabesse, Université Paul Sabatier Toulouse III

Co-directeur de thèse : Pr Georges Anicet Ouédraogo, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso.

RESUME

La leucémie myéloïde chronique(LMC) est une des néoplasies myéloprolifératives chroniques caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie ou chromosome 22 raccourci. Le chromosome Philadelphie est classiquement la résultante d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 à l'origine d'un gène de fusion BCR-ABL1 sur le chromosome 22. BCR-ABL1 peut être aussi le résultat d'une translocation complexe entre 3, 4, 5, voire six chromosomes impliquant le 9 et le 22. Il peut être le résultat d'une insertion de BCR sur le chromosome 9 ou d'une insertion de ABL1 sur le chromosome 22. BCR-ABL1 est à l'origine de la cancérogenèse de la LMC. Le pronostic de cette maladie a été radicalement transformé depuis l'introduction des anti-tyrosines kinases. L'European LeukemiaNet a introduit une classification de la réponse moléculaire qui va de 100% à 0,1% sur l'échelle internationale qui permet la prise de décision thérapeutique. Certains patients traités avec l'Imatinib, qui est la première génération des l'anti-tyrosine kinases ; ont une réponse moléculaire qui est plus profonde que 0,1% .0,1% est la réponse moléculaire de type trois ou réponse moléculaire majeure. Avec l'arrivée des anti-tyrosines Kinases de deuxième et de troisième génération, les réponses moléculaires sont de plus en plus rapides et plus profondes. Le groupe « European Treatment and Outcome Study » a proposé une définition de Réponses moléculaires de 0,01%, 0,0032%, 0,001% sur l'échelle internationale ou réponse moléculaire de type 4, 4,5 et 5. Ce groupe propose pour les leucémies myéloïdes chroniques en réponse moléculaire profonde, de faire lors des contrôles, des PCR à cinquante cycles avec plusieurs réplicats afin de quantifier les ARNm de BCR-ABL1 et ABL1 qui serviront pour la définition des réponses moléculaires. Le groupe propose comme gènes de contrôle : les gènes ABL1, BCR et GUSB .Comme en amplifiant ABL1, on amplifie en même temps BCR-ABL1, ont été inclus dans un même plasmide appelé ERM-AD623 les gènes BCR-ABL1, BCR et GUSB. Ce plasmide pourra servir aussi comme calibrateur du gène cible BCR-ABL1. L'utilisation de ce plasmide permettra d'établir une correspondance des résultats avec les trois gènes de contrôle sus-cités. Ce plasmide éviterait aussi d'avoir recours au facteur de conversion. Nos résultats confirment que la PCR à cinquante cycles permet de quantifier les ARNm désirés, et, le résultat est plus précis si le nombre de réplicats est élevé. Nos résultats ne

confirment pas que l'utilisation du plasmide ERM-AD623 évite le recours au facteur de conversion.

Mots clés : Leucémie myéloïde chronique, inhibiteurs des tyrosine-kinases, Amplification quantitative en chaîne par polymérase, réponse moléculaire profonde.

SUMMARY

Chronic myeloid leukemia is a chronic myeloproliferative neoplasm characterized by the presence of the Philadelphia chromosome or chromosome number 22 shortcut. The Philadelphia chromosome is typically the result of a reciprocal translocation between chromosome 9 and 22 which causes a fusion gene BCR- ABL1 on chromosome 22. BCR - ABL1 can also be the result of a translocation between complex translocation between 3, 4, 5, or six chromosomes, involving chromosomes 9 and 22; or a result of an insertion of BCR on chromosome 9 or an insertion of ABL1 on chromosome 22. BCR- ABL1 is the origin of the carcinogenesis of CML. The prognosis of this disease has been radically transformed since the introduction of tyrosine's Kinase inhibitors. The European LeukemiaNet introduced a classification of molecular response ranged from 100% to 0.1% on an international scale which allows therapeutic decision.

Some patients treated with Imatinib which is the first generation of Tyrosine's Kinases inhibitors ,have a molecular response which is beyond 0.1% IS called molecular response type three or major molecular response. With the second and third generation's TKI, the molecular responses are faster and deeper. The European Treatment and Outcome Study Group proposed a molecular response definition: 0.01% IS, 0.0032% IS, 0.001% IS (international scale) or molecular response type 4, 4.5 and 5. This group suggest for chronic myeloid leukemia in deep molecular response, during their molecular response's controls, to perform fifty cycles per PCR with several replicates in order to quantify BCR - ABL1 and ABL1 mRNA which serve for the definition of molecular response. The group offers as control genes: BCR-ABL1, BCR and GUSB genes included in the same plasmid called ERM-AD623. The use of this plasmid will allow matching the results with the three above-mentioned control genes. This plasmid also would avoid having resort to the conversion factor. Our results confirmed that the fifty cycles per PCR quantifies the desired mRNA, and high is the number of replicates more accurate is the result. Our results do not confirm that using the ERM-AD623 plasmid avoids the use of the conversion factor.

Keys words: chronic myeloid leukemia, tyrosine-Kinases inhibitors, reverse transcriptase quantitation chain reaction, deep molecular response.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	I
SUMMARY.....	III
TABLE DES MATIERES	V
DEDICACES	VII
SIGLES ET ABREVIATIONS	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	3
I- PATHOGENIE DE LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE	3
II- EPIDEMIOLOGIE ET HISTORIQUE	6
III- LE DIAGNOSTIC DE LA LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE.	7
<i>III.1- Clinique</i>	<i>7</i>
<i>III.2- Biologique</i>	<i>7</i>
III.2.1- Hématologique	7
III.2.2- Cytogénétique	8
III.2.3- La biologie moléculaire	9
IV- LE TRAITEMENT	9
<i>IV-1 La surveillance du traitement</i>	<i>9</i>
V- QUESTION DE RECHERCHE	12
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	13
I- LES PRELEVEMENTS	13
<i>I.1- Première série de prélèvements.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2- Deuxième série de prélèvements</i>	<i>17</i>
<i>I.3- Troisième série de prélèvements.</i>	<i>17</i>
II- REACTIFS.....	17
III- MATERIELS	19
IV- METHODES.....	19
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	37
I- RESULTATS	37
<i>I.1- La première série de prélèvements.....</i>	<i>37</i>
I.1.1- Première plaque (premier et deuxième patient).....	37
I.1.2- Deuxième plaque (troisième et quatrième patient)	45
I.1.3- Troisième Plaque (cinquième et sixième patient)	53
I.1.4- Plaque (septième patient et reprise de deux prélèvements précédents)	61
I.1.5- Récapitulatif des quatre plaques	67

I.1.5.1- Duplicat.....	70
I.2- La deuxième série de prélèvements.....	74
I.4- Analyse des données portant sur le suivi de 82 échantillons dont 4 contrôles de qualité externe testés avec les plasmides Qiagen-Ipsogen et le plasmide ERM-AD623.....	82
II- DISCUSSION	93
LA DEFINITION DE LA REPONSE MOLECULAIRE PROFONDE DE LA LEUCEMIE MYELOÏDE EST CLAIRE (12) LA TECHNIQUE POUR AVOIR LES ELEMENTS DE DEFINITION EST LA REELLE REVERSE TRANSCRIPTASE- AMPLIFICATION QUANTITATIVE EN CHAINE PAR POLYMERASE OU REAL TIME RTQPCR OU MIEUX PAR LA RTQPCR NUMERIQUE (62, 64, 70,71).C'EST DANS UN CONTEXTE OU CHAQUE LABORATOIRE OU GROUPE DE LABORATOIRES A UNE ATTITUDE QUI LUI CONVIENT EN PRESENCE D'UNE LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE EN REPONSE MOLECULAIRE PROFONDE, QUE LE PANEL D'EXPERTS DU GROUPE EUTOS (60) A FAIT SA PROPOSITION QUE NOUS AVONS MIS EN ŒUVRE. NOUS N'AVONS PAS VU DANS LA LITTERATURE MEDICALE UNE PUBLICATION RAPPORTANT LA MISE EN APPLICATION DE CETTE PROPOSITION.	93
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	96
REFERENCES	97
THE EUTOS POPULATION-BASED REGISTRY: INCIDENCE AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF 2904 CML PATIENTS IN 20 EUROPEAN COUNTRIES.	97
LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE DES SUJETS JEUNES : EXPERIENCE DANS UNE UNITE D'HEMATOLOGIE CLINIQUE AU SENEGAL.....	98
INHIBITION OF RAS-MEDIATED SIGNALING PATHWAYS IN CML STEM CELLS.	98
FUNCTIONAL STUDIES OF MIR-130A ON THE INHIBITORY PATHWAYS OF APOPTOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA.	98
MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RECRUITMENT OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM BONE MARROW NICHE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA.....	99
INHIBITION OF ISOPRENILCYSTEINE CARBOXYLMETHYLTRANSFERASE AUGMENTS BCR-ABL1 TYROSINE KINASE INHIBITION-INDUCED APOPTOSIS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA.....	99
ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN MODULATING UNFOLDED PROTEIN RESPONSE ACTIVITY IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CELL LINE.	99
CONSTITUTIVE ACTIVATION OF STAT5 BY THE BCR-ABL ONCOGENE IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA.....	101
<i>Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies</i>	102
EVOLVING CONCEPTS IN THE MANAGEMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: RECOMMENDATIONS FROM AN EXPERT PANEL ON BEHALF OF THE EUROPEAN LEUKEMIA NET.....	106
PUBLICATIONS.....	108

DEDICACES

A mon frère Tasséré

Victime innocente de l'ignorance et de la méchanceté des Hommes. Repose en paix.

A mon frère Boukaré

Tu nous as quittés. Puisse-tu revenir un jour !

Docteur Nicole Dastugue

Ancienne présidente de la société Française de cytogénétique

C'est par vous que je suis arrivé au laboratoire, merci de m'avoir accueilli et aidé. Je vous souhaite une vie agréable pendant votre retraite.

REMERCIEMENTS

Professeur Adrien Marie Gaston Belém

C'est pour nous un grand honneur de vous avoir comme président de ce jury.
Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

Professeur Jacques Simporé

Nous vous remercions de nous avoir guidés dans la réalisation de ce travail par vos compétences, votre rigueur mais surtout vos précieux conseils.
Veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

Professeur Athanase Millogo

Vous nous faites l'honneur d'accepter de juger cette thèse.
Soyez assuré de notre profonde estime.

Docteur Apollinaire Sawadogo

Maître de conférences agrégé en Hépatologie, Gastro-entérologie
Nous sommes très honoré de vous compter parmi les membres de ce jury
Recevez l'expression de toute notre considération.

Professeur Éric Delabesse

Chef de service du laboratoire d'hématologie à l'Oncopole site de l'institut universitaire de cancérologie de Toulouse.
Vous m'avez accepté dans votre laboratoire et permis de travailler dans une bonne ambiance. Merci à vous et à votre femme avec qui je partageais le même bureau.

Professeur Anicet Georges Ouédraogo

Président de l'Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, les mots me manquent pour exprimer ce que je ressens. Je vous remercie de m'avoir fait confiance, de votre disponibilité, votre enthousiasme, le partage de vos connaissances et conseils avisés que ce soit pour ce travail comme pour d'autres choses de la vie.
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de ma profonde estime.

Docteur Véronique De Mas

Maître de conférences des universités et praticienne hospitalière. Malgré vos charges, vous avez toujours trouvé du temps pour répondre à mes préoccupations.
Merci de l'aide et de l'amitié.

Nais Prade et Stéphanie Laprade

Ingénieurs de recherche. Merci pour votre aide et de votre amitié

Aux techniciennes du laboratoire de biologie moléculaire

Merci de votre aide, surtout à Magali Dunoyer.

A ceux de Poitiers

Docteurs : Brigitte Vannier, Jean-Loup Huret, Jean-Claude Chomel, Sabrina Bouyer, Catherine Boinot. Merci.

A tous ceux que j'ai oubliés, qui m'ont aidé dans le silence et dans l'amitié, soyez en remercier et que Dieu vous récompense au centuple.

SIGLES ET ABREVIATIONS

ABL1	: Abelson1
ACP	: Amplification en chaine par polymérase
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	: Acide ribonucléique messager
BCR	: Breakpoint cluster region
BCR-ABL1	: Gène de fusion BCR et ABL1
CAL	: Calibrateur
cDNA	: ADNc
Cp	: Crossing point
Ct	: Cycle threshold
EAC	: Europe Against Cancer
EDTA	: Ethylène diamine tétra hydro acétique
ELN	: European LeukemiaNet
EUTOS	: European Treatment and Outcome Study
GUSB	: Bêta-glucuronidase
IRIS	: International randomized interferon alpha versus STI571
IS	: International scale
IUCT	Institut Universitaire du cancer de Toulouse
Kda	: KiloDalton
Kpb	: Kilopaire de bases
LMC	: Leucémie myéloïde chronique
Log	: Logarithme
MIX	: Mélange
PCR	: Polymerase chain reaction
RM	: Réponse moléculaire

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE ABL1	3
Figure 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE BCR	3
Figure 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TYPE DE TRANSCRIT BCR-ABL1	4
Figure 4 : FORMATION DE BCR-ABL1 PAR INSERTION	5
Figure 5 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DES VOIES D'ACTIVATION DE BCR-ABL1	6
Figure 6 : CORRELATION ENTRE LE NOMBRE DE CELLULES LEUCEMIQUES ET L'EXPRESSION DE <i>BCR-ABL1</i> (BACCARANI 2006).	11
Figure 7 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT I	13
Figure 8 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT II	14
Figure 9 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT III	14
Figure 10 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT IV	15
Figure 11 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT V	15
Figure 12 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT VI	16
Figure 13 : EVOLUTION DE LA REPONSE MOLECULAIRE DU PATIENT VII	17
Figure 14 : REPRESENTATION DES AMORCES ET SONDE ABL1.....	18
Figure 15 : REPRESENTATION DES AMORCES ET SONDE BCR-ABL1 (P210)	18
Figure 16 : COURBES D'AMPLIFICATION. GAMME P210 QIAGEN-IPSOGEN	24
Figure 17 : COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME ABL1 QIAGEN IPSOGEN	27
Figure 18 : COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME P210 ERM-AD623	29
Figure 19 : COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME ABL1 ERM-AD623	31
Figure 20 : COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME P210 QIAGEN-IPSOGEN	33
Figure 21 : COURBES D'AMPLIFICATION DE BCR-ABL1(P210) DE LA PREMIERE PLAQUE	37
Figure 22 : COURBES D'AMPLIFICATION D'ABL1 DE LA PREMIERE PLAQUE.....	41
Figure 23 : COURBES D'AMPLIFICATION P210 DE LA DEUXIEME PLAQUE.....	45
Figure 24 : COURBES AMPLIFICATION D'ABL1 DE LA DEUXIEME PLAQUE.	49
Figure 25 : COURBES D'AMPLIFICATION DEP210 DE LA TROISIEME PLAQUE.....	53
Figure 26 : COURBES D'AMPLIFICATION D'ABL1 DE LA TROISIEME PLAQUE	57
Figure 27 : COURBES D'AMPLIFICATION DE P210 DE LA QUATRIEME PLAQUE	61
Figure 28 : COURBES D'AMPLIFICATION D'ABL1 DE LA QUATRIEME PLAQUE	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : VOLUME D'ARN A PRELEVER POUR LA DILUTION, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'ARN A L'EXTRACTION.	20
Tableau II : CALCUL DU VOLUME DES MIX A PREPARER EN FONCTION DU NOMBRE D'ECHANTILLONS A TESTER.....	21
Tableau III : REPRESENTATIONS DES PLAQUES : EN DUPLICAT A ET TRIPLICAT B (FONCTION DU NOMBRE D'ECHANTILLONS)	22
Tableau IV : CALCUL CP ET CONCENTRATION P210 QIAGEN-IPSOGEN	25
Tableau V : CALCUL DES CP ET DE LA CONCENTRATION DES COPIES D'ABL1 DE LA GAMME QIAGEN-IPSOGEN	28
Tableau VI : CALCUL DES CP ET COPIES P210 DE LA GAMME ERM-AD623	30
Tableau VII : CALCUL CP ET COPIES ABL1 DE GAMME ERM-AD623.	32
Tableau VIII : CALCUL DES CP ET COPIES P210 DE LA GAMME QIAGEN-IPSOGEN	34
Tableau X : CALCUL DES CP P210 DE LA PREMIERE PLAQUE (CP DU CALIBRATEUR DE LA GAMME=25,96)	38
Tableau XI : COPIES P210 DE LA PREMIERE PLAQUE	39
Tableau XII : CALCUL CP D'ABL1 DE LA PREMIERE PLAQUE CP DU CALIBRATEUR DE LA GAMME=28,17.....	41
Tableau XIII : COPIES D'ABL1 DE LA PREMIERE PLAQUE.....	43
Tableau XIV : CALCUL DES CP DE P210 DE LA DEUXIEME PLAQUE.....	45
Tableau XV : LA CONCENTRATION DES COPIES DE P210 DE LA DEUXIEME PLAQUE	47
Tableau XVI : CALCUL DES CP D'ABL1 DE LA DEUXIEME PLAQUE.	49
Tableau XVII : CONCENTRATION DES COPIES D'ABL1 DE LA DEUXIEME PLAQUE	51
Tableau XVIII : CALCUL DES CP DE P210 DE LA TROISIEME PLAQUE	53
Tableau XIX : CONCENTRATION DES COPIES DE P210 DE LA TROISIEME PLAQUE	55
Tableau XX : CALCUL CP D'ABL1 DE LA TROISIEME PLAQUE.....	57
Tableau XXI : CONCENTRATION DES COPIES D'ABL1 DE LA TROISIEME PLAQUE	59
Tableau XXII : CALCUL DES CP DE P210 DE LA QUATRIEME PLAQUE	61
Tableau XXIII : CONCENTRATION DES COPIES DE P210 DE LA QUATRIEME PLAQUE	63
Tableau XXIV : CALCUL DES CP D'ABL1 DE LA QUATRIEME PLAQUE.....	64
Tableau XXV : CONCENTRATION DES COPIES D'ABL1 DE LA QUATRIEME PLAQUE.....	66
Tableau XXVII : COMPARAISON DES RESULTATS EN FONCTION DU NOMBRE DE REPLICATS A CINQUANTE CYCLES (INTERPRETATION TRADITIONNELLE DU LABORATOIRE)	68
Tableau XXVIII : COMMENTAIRE DES RESULTATS EN DUPLICAT.....	70
Tableau XXIX : COMMENTAIRE DES RESULTATS EN TRIPLICAT.....	72
Tableau XXX : RESULTATS DE LA DEUXIEME SERIE DE PRELEVEMENTS	74
Tableau XXXI : COMMENTAIRE DES RESULTATS DE LA DEUXIEME SERIE DE PRELEVEMENTS.....	75

Tableau XXXII : RESULTATS DE LA TROISIEME SERIE DE PRELEVEMENTS AVEC LE PLASMIDE ERM-AD623	77
Tableau XXXIV : RESULTATS DE LA TROISIEME SERIE DE PRELEVEMENTS AVEC LES PLASMIDES QIAGEN-IPSOGEN	79
Tableau XXXV : COMMENTAIRES DES RESULTATS DE LA TROISIEME SERIE DE PRELEVEMENTS AVEC LES PLASMIDES QIAGEN-IPSOGEN.	80
Tableau XXXVI : COMPARAISON DES COMMENTAIRES DES RESULTATS DE LA TROISIEME SERIE DE PRELEVEMENTS AVEC LES PLASMIDES QIAGEN-IPSOGEN ET ERM-AD623.....	81
Tableau XXXVII A : ANALYSE DE 82 ECHANTILLONS	82
Tableau XXXVII B : ANALYSE DE 82 ECHANTILLONS	85
DERNIER TIERS DU TABLEAU.....	88
Tableau XXXVII C : ANALYSE DE 82 ECHANTILLONS.....	88
Tableau XXXX : APPLICATION DU CALCUL NORMALISE AU TABLEAU XXXVI.....	92

INTRODUCTION

La leucémie myéloïde chronique est une néoplasie myéloproliférative chronique prédominant sur la lignée granuleuse ; liée à un processus monoclonal touchant la cellule souche hématopoïétique totipotente hématopoïétique. Cette cellule souche hématopoïétique porte une anomalie caractéristique qui est le chromosome Philadelphie en référence au lieu de sa découverte par Nowell et Hungerford en 1960. Le chromosome Philadelphie est le chromosome 22 raccourci. En 1973 Rowley grâce à une technique de fluorescence à la quinacrine et la mise en évidence de bandes G sur les chromosomes par la coloration au Giemsa prouve que le chromosome Philadelphie retrouvé dans les cellules leucémiques est le résultat d'une translocation réciproque entre le bras long du chromosome 9 dans la région 4 de sa bande 3 et le bras long du 22 dans la région 1 de sa bande 1 : t (9 ; 22) (q34 ; q11). En Europe, la maladie a été décrite pour première fois par Bennett et Virchow en 1845 (1, 2, 3, 4,5).

C'est une affection qui touche aussi bien les enfants que les adultes. Elle atteint plus les hommes que les femmes. Sa fréquence augmente avec l'âge et l'âge médian en Europe est de cinquante ans. Elle représente 15% de toutes les leucémies de l'adulte avec une incidence de 2 cas/100000 habitants/an en France (6,7,8,9) . Au Burkina Faso la fréquence globale est inconnue ; au Centre Hospitalier Universitaire Yalgado OUEDRAOGO, l'incidence est de 5,75 cas par année, l'âge médian de 33,45 années et le sex ratio hommes/femmes de 1,87 (10,11).

Pendant longtemps, la transplantation médullaire allogénique a été le seul traitement qui entraînait une rémission cytogénétique et moléculaire partielle. Puis vint l'interféron alpha et l'Aracytine. Depuis l'introduction de l'Imatinib en 1998 qui a révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique, la surveillance moléculaire s'est généralisée et l'European LeukemiaNet pour harmoniser les résultats inter-laboratoires a établi des critères de surveillance et une échelle internationale de mesure de la réponse moléculaire. Cette mesure est relative et va de 100% à 0,1% . Cette dernière réponse correspond à une réponse moléculaire majeure ou réponse moléculaire de niveau trois qui équivaut à une diminution de trois log du gène de fusion BCR-ABL1 à partir du 100% de départ. Certains patients sous Imatinib ont des réponses moléculaires au-delà de 0,1%. Les laboratoires

d'analyse de la réponse moléculaire n'ont que trois options de réponse après 0,1% : positif, négatif, positif non quantifiable. Ce type de réponse ne permet pas de prendre des décisions thérapeutiques judicieuses dans tous les cas. Un panel d'experts du groupe « European Treatment and Outcome Study » (EUTOS) a proposé, en situation de réponse moléculaire profonde d'une leucémie myéloïde chronique sous anti-tyrosine kinase, de quantifier les ARNm de BCR-ABL1, ABL1 et de donner des niveaux de réponse moléculaire 4 ; 4,5 et 5. Notre travail consiste à vérifier les propositions de ce groupe.

Notre objectif général, était de quantifier la réponse moléculaire profonde (12) pour permettre une prise de décision thérapeutique juste et judicieuse.

Nos objectifs spécifiques sont :

- Réaliser avec les plasmides utilisés dans le laboratoire d'hématologie de l'institut universitaire de cancérologie du cancer de Toulouse(IUCT), des PCR à cinquante cycles en duplicat et triplicat ;
- comparer les réponses en duplicat quarante cinq cycles de RTqPCR aux résultats en duplicat à cinquante cycles de RTqPCR avec les plasmides du laboratoire de l'IUCT
- Comparer les résultats en duplicat et triplicat à cinquante cycles de RTqPCR avec les plasmides du laboratoire d'hématologie de l'IUCT ;
- comparer les résultats des RTqPCR cinquante cycle avec les plasmides Qiagen-Ipsogen (utilisés par le laboratoire) à ceux avec le plasmide ERM-AD 623.

Ce travail a été approuvé pour le comité d'éthique de l'IUCT. Chaque patient a signé un consentement éclairé.

de signalisation intra cellulaire à l'origine de la transformation maligne des cellules (13, 14, 15, 16, 17,18)

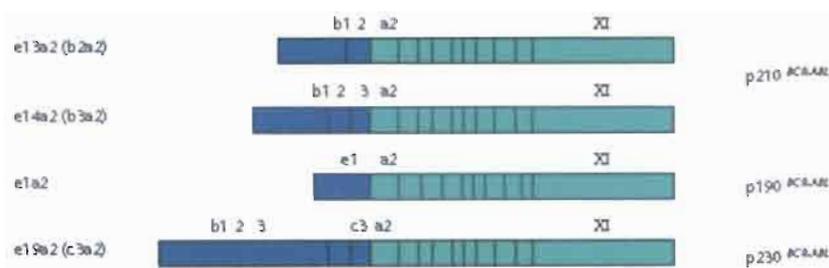


Figure 3 : représentation schématique du type de transcrit BCR-ABL1 (19,32)

PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

I- PATHOGENIE DE LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE

Le chromosome Philadelphie est le résultat d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22. La cassure au niveau du chromosome 9 a lieu au niveau du gène ABL1. Le gène ABL1 est constitué de 52420 paires de bases et code un ARNm de 145 Kpb (13).

La protéine ABL1 a une localisation nucléaire et porte une activité tyrosine kinase. Ce gène est constitué de douze exons (1b, 1a, a2, a3,.....) séparés par des introns. La cassure au niveau de ce gène a lieu soit sur le premier intron séparant les deux premiers exons, soit sur le deuxième intron séparant le deuxième et troisième exon. ABL1 porte une activité tyrosine kinase.



Figure 1 : représentation schématique du gène ABL1 (19,32)

Sur le chromosome 22, la cassure se déroule sur le gène BCR. Le gène BCR est constitué de 137672 paires de bases et code un ARNm de 160 Kda. Ce gène est constitué de 23 exons (e1, e2, e3,.....b1, b2, b3, b4, b5.... C3, c4,....) séparés par des introns. La cassure a lieu à ce niveau soit entre le premier et deuxième exon

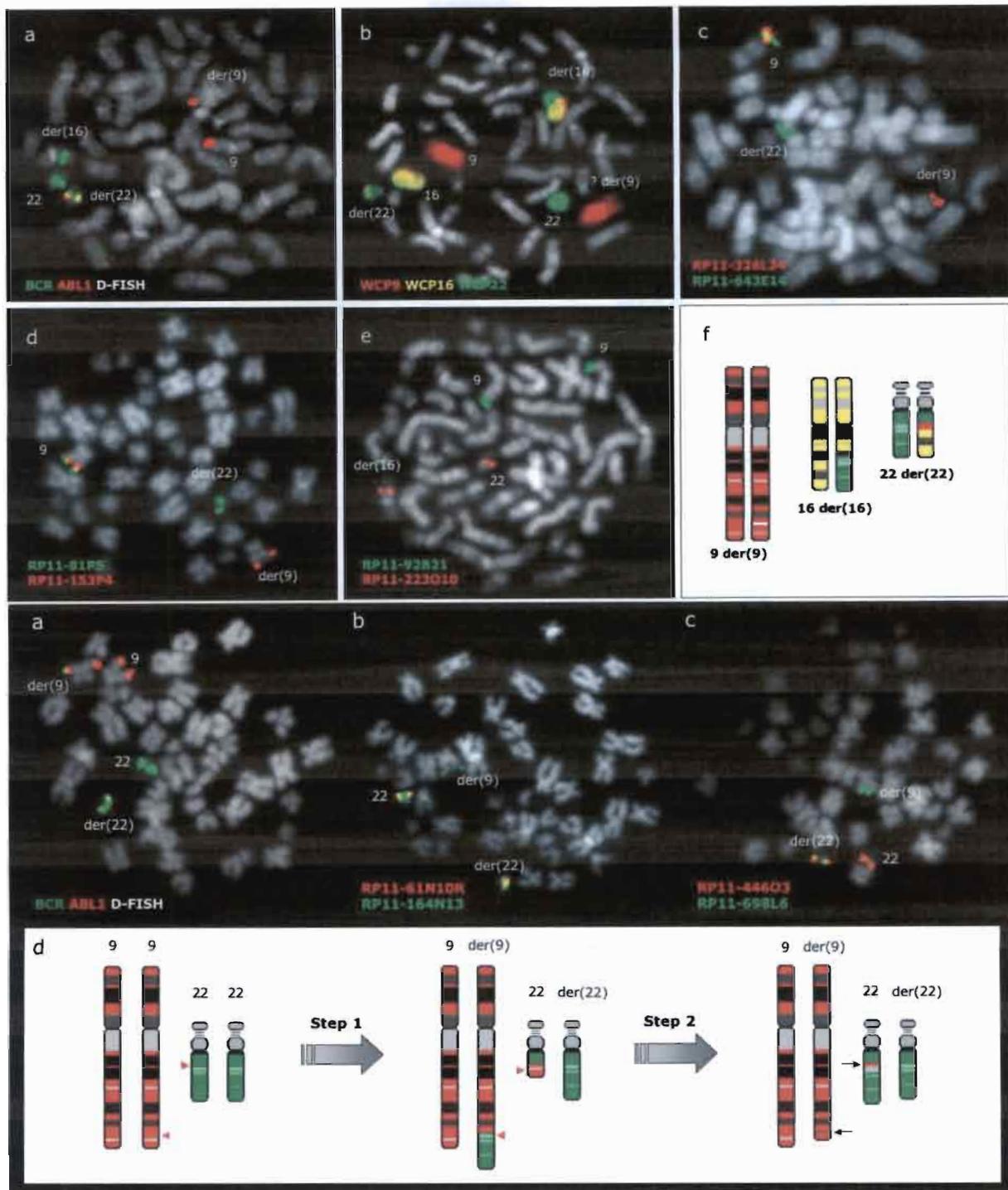


Figure 4 : formation de BCR-ABL1 par insertion

Seule l'hybridation in situ par fluorescence (28-29), ou l'amplification en chaîne par polymérase qualitative pourront confirmer le diagnostic de la LMC.
Le gène de fusion est à l'origine du pouvoir oncogène de la maladie en activant des voies de signalisation dans la cellule leucémique.

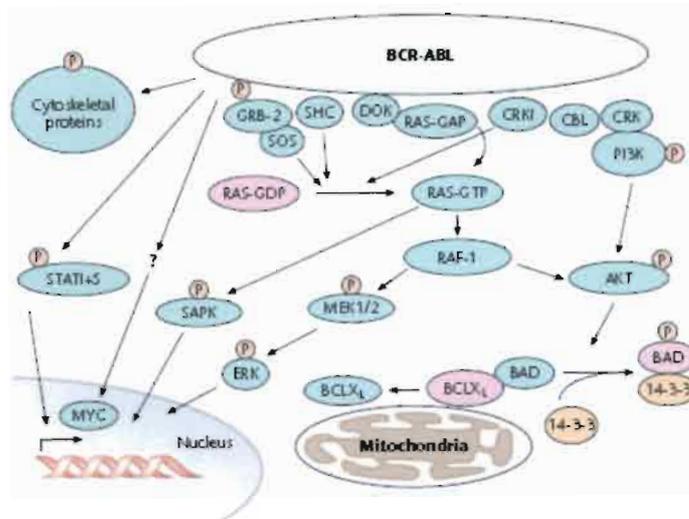


Figure 5 : Représentation simplifiée des voies d'activation de BCR-ABL1 (33)

Les mécanismes expliquant le pouvoir oncogène de BCR-ABL1 sont :

- l'Altération de l'adhésion cellulaire ;
- l'Activation de voies de signalisation cellulaire entraînant l'inhibition de l'apoptose ;
- l'Instabilité génétique. C'est la caractéristique majeure des cellules leucémique de la LMC. Elle intervient lors de la progression de la maladie vers la phase blastique et lors de la résistance aux traitements (33.)

II- EPIDEMIOLOGIE ET HISTORIQUE

La leucémie myéloïde chronique se voit à tous les âges, mais elle est surtout l'apanage des sujets jeunes dans nos régions (10,11).

La première description en Europe de la leucémie myéloïde chronique date de 1845 par Rudolf Virchow (2, 3, 4,5). Les Américains Peter Nowell et David Hungerford en 1960 mettent en évidence l'anomalie chromosomique et en 1973 Rowley identifie la translocation réciproque t(9,22) caractérisant le chromosome Philadelphie. En 1980, la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence le gène hybride BCR-ABL1 (40).

La leucémie myéloïde chronique évolue cliniquement en deux phases sans traitement : une phase chronique qui dure deux à trois voire quatre années émaillée de complications, et une phase accélérée confondue parfois à la phase aiguë qui est fatale en quelques mois ; biologiquement elle évolue en trois phases : chronique,

accélérée et aiguë. Depuis 2006, un groupe d'experts réunis sous l'appellation European LeukemiaNet ont défini ces phases : selon l'ancienne classification et selon la nouvelle classification selon l'OMS (41 ; 42).

III- LE DIAGNOSTIC DE LA LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE.

III.1- Clinique

Les circonstances de découverte : elle peut être fortuite à la suite d'un hémogramme ou être insidieuse au début avec amaigrissement, asthénie.

A la période d'état le signe fondamental est la splénomégalie. Généralement il n'y a pas d'adénopathies, ni d'hypertension portale. L'hépatomégalie est modérée si elle existe. Il peut y avoir des complications : hémorragies de tout ordre, thrombose, priapisme, crise de goutte.

A la phase d'accélération.

Elle est marquée par l'apparition d'une fièvre, d'un amaigrissement qui apparaît ou se majore de sueurs nocturnes, d'une splénomégalie qui s'accroît ou réapparaît même si elle avait disparu sous traitement.

A la phase d'acutisation ou de transformation aiguë

Il y a une majoration des signes de la phase d'accélération avec des adénopathies le plus souvent et où des complications thrombo-emboliques, des hémorragies (45 46).

Cliniquement la phase d'accélération et la phase de transformation peuvent se confondre.

III.2- Biologique

III.2.1- Hématologique

L'hémogramme

-A la phase chronique

L'hémoglobine peut être normale ou bien il y a une discrète anémie normocytaire normochrome si aucune autre cause n'est ajoutée.

Il y a une hyperthrombocytose, une hyperleucocytose avec myélémie comportant tous les stades de maturation sans excès de blastes (<5%), une hyperbasocytose et une hyperéosinophilie.

-A la phase d'accélération : il y a une accentuation ou apparition d'une anémie ; hyperéosinophilie absolue avec une valeur relative supérieure à 20% ou une hyperbasocytose absolue avec une valeur relative supérieure à 20%.

-A la phase de transformation blastique, l'anémie devient sévère. Il y a une présence de blastes (toutes les formes de blastes sont possibles) une thrombopénie ou hyperthrombocytose.

Le myélogramme

-A la phase chronique

Le myélogramme retrouve une moelle très avec hyperplasie granuleuse sans arrêt de maturation dans 30 à 60% des cas ; une hyperbasocytose, une érythroblastopénie relative une lymphopénie. Les mégacaryocytes sont en nombre normal ou augmenté en rapport avec la richesse médullaire. Les phosphatases alcalines leucocytaires sont normales.

-A la phase d'accélération la somme des blastes et promyélocytes est supérieure à 10% mais reste en-dessous de 20%.

Les polynucléaires éosinophiles sont supérieurs à 20% ou bien ce sont les polynucléaires basophiles qui sont supérieurs à 20%. Ces valeurs ne sont pas retrouvées dans notre contexte.

-A la phase d'acutisation ou de transformation aiguë, les blastes sont supérieurs à 20% de la lignée granuleuse si la transformation est myéloblastique ou supérieurs à 30% de la lignée médullaire si la transformation est lymphoblastique.

Les phosphatases alcalines leucocytaires sont augmentées (Supérieure à 100).

La biopsie ostéo-médullaire.

La moelle est très riche avec disparition des adipocytes et absence de myélofibrose (à l'inverse de la splénomégalie myéloïde).

Hyperplasie granulocytaire : avec un rapport Granulocytes/Erythroblastes = 10 - 30 (normale = 2-5).

III.2.2- Cytogénétique

-A la phase chronique

Le caryotype montre la translocation caractéristique dans 95% des cas. Lorsqu'il est négatif, il faut faire recours à la cytogénétique par la technique d'hybridation in situ.

-A la phase d'état et de transformation il y a une présence d'anomalies cytogénétiques additionnelles (duplication du Ph 1, trisomie 8 ou 7, perte de chromosome Y....).

III.2.3- La biologie moléculaire

L'hybridation in situ avec fluorescence met en évidence le gène BCR-ABL1. L'amplification en chaîne par polymérase multiplex (ACP) ou polymérase chain reaction (PCR) qualitative identifie le type de transcrit.

IV- LE TRAITEMENT

Longtemps incurable et rapidement fatale à cause des complications liées à la leucostase et à l'hyperuricémie, sauf en cas de transplantation médullaire, son pronostic s'est vu améliorer par des thérapeutiques comme : l'allopurinol qui a permis d'éviter les complications de l'hyperuricémie, le Busulfan et l'Hydroxyuré, l'Aracytine, le Purinéthol et la Leucophérèse conduisent à une rémission hématologique temporaire. A partir de 1990 sont apparus les différents interférons alpha qui induisent une rémission hématologique et cytogénétique dans 40% des cas ; et, les inhibiteurs de première génération [Imatinib] de deuxième génération [Nilotinib, Dasatinib, bosutinib, radotinib] et de troisième génération [ponatinib] entraînent une rémission hématologique, cytogénétique, moléculaire complète. (47, 48, 50, 51, 52,53, 54, 55) Maintenant on parle de guérison avec l'utilisation des glitazones dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, on parle de guérison définitive parce que ces drogues éradiquent les cellules quiescentes de la maladie (57)

IV-1 La surveillance du traitement

Depuis 2006 le groupe European LeukemiaNet (ELN) a défini des critères clinique, hématologique, cytogénétique et moléculaire de surveillance des patients traités par les anti-tyrosines kinases. Avec la venue des anti-tyrosines kinases de deuxième génération puis de troisième génération entraînant des réponses moléculaires de plus en plus rapide et plus profonde, ces critères ont été révisés en 2009 puis en 2013 et vont bientôt être révisés.

La surveillance du traitement par les anti-tyrosines kinases se fait selon un chronogramme ; elle est clinique, hématologique, cytogénétique et moléculaire (54,56).

La définition faite par l'ELN des différentes phases de la leucémie myéloïde chronique est différente de la définition de l'organisation mondiale de la santé (OMS). La surveillance moléculaire est faite par amplification en chaîne par polymérase en temps réel ou PCR en temps réel. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport au calibrateur utilisé pour le protocole IRIS (protocole international randomisant l'interféron alpha par rapport au STI 571 qui est l'Imatinib). Le calibrateur est le gène cible de contrôle ; sa valeur est comprise entre 0,01 et 10% IS. Le protocole IRIS a utilisé les gènes BCR-ABL1 et ABL1 comme calibrateurs. La première quantification au diagnostic correspond au 100% de BCR-ABL1 du protocole IRIS qui est l'échelle internationale ou international scale [IS]. Chaque laboratoire doit aligner ses résultats sur cette échelle afin de permettre une comparaison inter-laboratoire. La conversion des résultats de chaque laboratoire sur l'échelle internationale se fait par un facteur de conversion (CF ou conversion factor) qui est calculé périodiquement par un laboratoire de référence (58,59). L'expression de la réponse moléculaire proposée par l'ELN pour les LMC traitées par l'Imatinib s'arrête à 0,1% BCR-ABL1 IS (échelle internationale). Cette expression (0,1% IS) correspond à une diminution de trois Log de BCR-ABL1 par rapport au début du traitement et correspond à une réponse moléculaire majeure. Ce seuil correspond à une réponse moléculaire de type 3 (RM3). En-dessous de 0,1% IS rien n'a été proposé. Certains patients sous Imatinib ont une réponse moléculaire au-delà de 0,1% IS. L'apparition d'anti-tyrosine kinases de seconde génération et de troisième génération donnant des réponses moléculaires de plus en plus rapides et plus profondes a conduit un groupe d'experts de « European Treatment and Outcome Study » (EUTOS) à proposer des réponses moléculaires de type 4, 4,5 et 5 (RM⁴, RM^{4,5}, RM⁵) (60) :

- RM⁴ correspond à une réduction supérieure ou égale à quatre log IS ou une maladie détectable inférieure ou égale à 0,01% BCR-ABL1 IS ou une maladie indétectable avec des transcrits ABL1 entre 10000 et 31999 ou transcrits GUSB (bêta-glucuronidase) entre 24000 et 76999 ;
- RM^{4,5} correspond à réduction de BCR-ABL1 supérieur à 4,5Log par rapport au 100%de départ, ou une maladie détectable inférieure ou égale à 0,0032% BCR-

ABL1 ou une maladie indétectable avec des transcrits ABL1 entre 32000 et 99999 ou transcrits GUSB entre 77000 et 239000 ;

- RM⁵ réduction de BCR-ABL1 supérieure ou égale à 5 Log ou une maladie détectable inférieure ou égale à 0,001% BCR-ABL1 ou une maladie indétectable avec des transcrits ABL1 supérieurs ou égaux à 100000 ou des Transcrits GUSB supérieurs ou égaux à 240000

La réponse moléculaire correspond au niveau de réduction de la masse de cellules leucémiques selon Baccarani et al

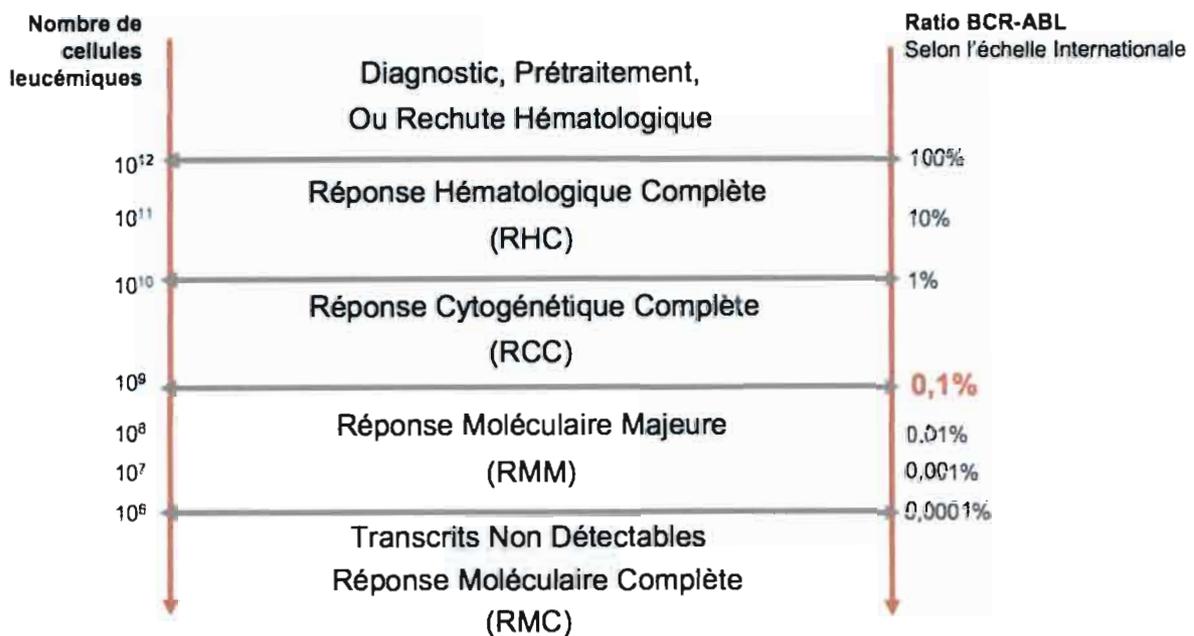


Figure 6 : Corrélation entre le nombre de cellules leucémiques et l'expression de *BCR-ABL1* (60).

Cette proposition n'est pas encore en application partout. La réponse des laboratoires devant une réponse profonde au-delà de 0,1% est donc : 0,04% IS, positif au seuil définit par le laboratoire, positif non quantifiable, négatif. Il est nécessaire de définir des réponses moléculaires plus précises, applicables à tous. Cela permettra de comparer les résultats inter-laboratoires surtout dans les protocoles internationaux de recherche. ABL1, GUSB et BCR sont des gènes de contrôle ou gène de référence (65 ; 66). Ils permettent d'apprécier la qualité et la quantité des ARNm cibles et de calculer les ratios Gène cible (BCR-ABL1)/gène de contrôle. Le ratio $\times 100 \times CF$ permet d'avoir la correspondance sur l'échelle internationale.

V- QUESTION DE RECHERCHE

La question de recherche à laquelle nous devons répondre est la suivante : en présence d'une leucémie myéloïde chronique traitée par les anti-tyrosines kinases et en réponse moléculaire profonde ; est ce qu'en augmentant le nombre de cycles de PCR quantitative et le nombre de répliques (réplicats) pour chaque échantillon, on peut amplifier suffisamment les ARNm de BCR-ABL1 et ABL1 et rendre des résultats en valeur absolue ?

La PCR est l'acronyme anglaise de polymérase chain reaction et l'équivalent française de : Amplification en chaîne par polymérase (ACP). C'est une technique d'amplification enzymatique qui permet à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un nombre important de copies d'ADN identiques au fragment de départ. L'ADN peut être génomique ou complémentaire d'un ARN (ADNc). La PCR peut être qualitative, dans le cas de la leucémie myéloïde chronique, elle permet après une électrophorèse multiplex de déterminer le type de transcrit BCR-ABL1. Elle peut être quantitative, peut être réalisée au diagnostic et surtout pendant le suivi thérapeutique. La PCR ne peut s'appliquer que sur des fragments d'ADN ne dépassant pas 2Kpb. L'ADN peut être génomique ou complémentaire d'un ARN (ADNc). La PCR quantitative sur ADN génomique est dite PCR quantitative ou qPCR. La PCR quantitative sur ADN complémentaire (ADNc) est dite qRT-PCR. Les ADNs génomiques : BCR-ABL1, ABL1, BCR sont trop longs et il n'est pas possible de faire une qPCR (63). Il faut donc une RTqPCR.

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

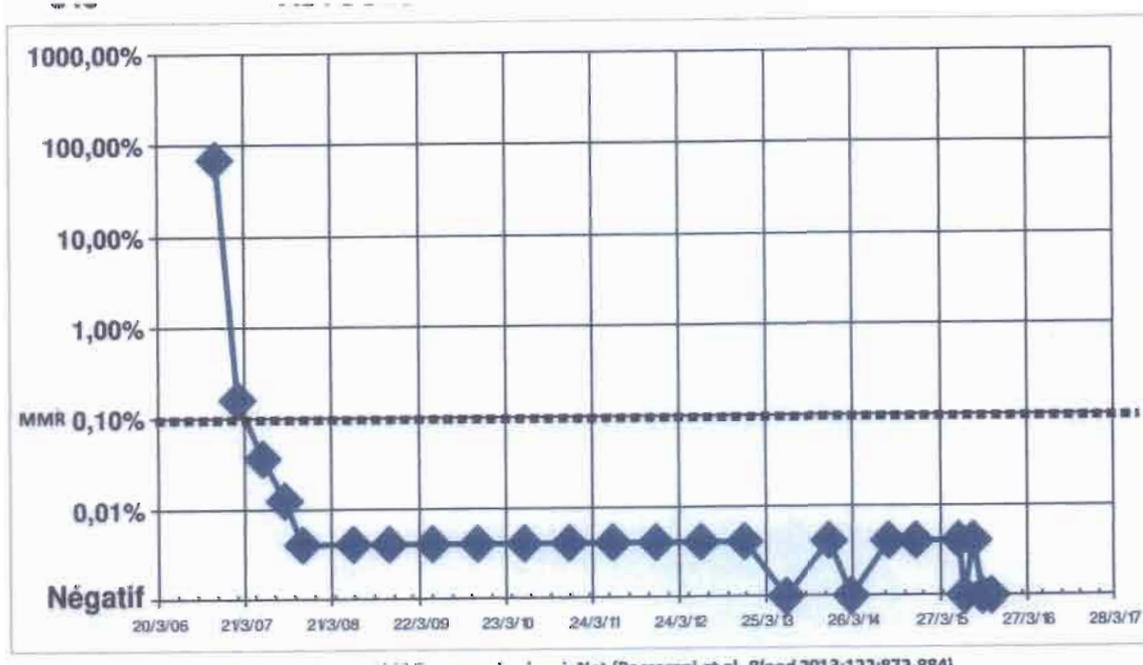
I- LES PRELEVEMENTS

I.1- Première série de prélèvements

Une série de prélèvements de sang périphérique provenant de Sept patients adultes âgés de 80, 72, 69, 67, 61, 58, 45 ans (cinq hommes et deux femmes) sous anti-tyrosine kinase (Imatinib) en réponse moléculaire profonde et dont les transcrits BCR-ABL1 sont de type P210Kda. Certains sont en arrêt thérapeutique sous surveillance régulière. Chaque patient a une serie de prélèvements espacés selon le rythme de surveillance établi par l'ELN. L'intervalle entre chaque prélèvement est de trois ou six mois selon les patients. Le nombre de prélèvements [positifs non quantifiables, Neg, ou positif] (en-dessous du seuil établi par l'ELN) pour chacun d'eux est respectivement de : 8, 5, 6, 6, 6, 6, 6.

Les prélèvements ont été faits sur tube EDTA, les ARNm ont été extraits manuellement, dosés, aliquotés dans des tubes Eppendorff de 1,5 ou 0,5 ml, numérotés, rangés dans des boitiers et conservés à -80°C.

Graphiques de l'évolution des résultats des sept patients.



En abscisse les dates de prélèvement et en ordonnée la réponse moléculaire sur l'échelle internationale selon l'ELN

Figure 7 : Evolution de la réponse moléculaire du patient I

Patient I en réponse moléculaire depuis huit ans, seize contrôles moléculaires RT qPCR classiques effectués. Huit des prélèvements (trois négatifs et cinq positif non quantifiables) ont été analysés à cinquante cycles de qPCR

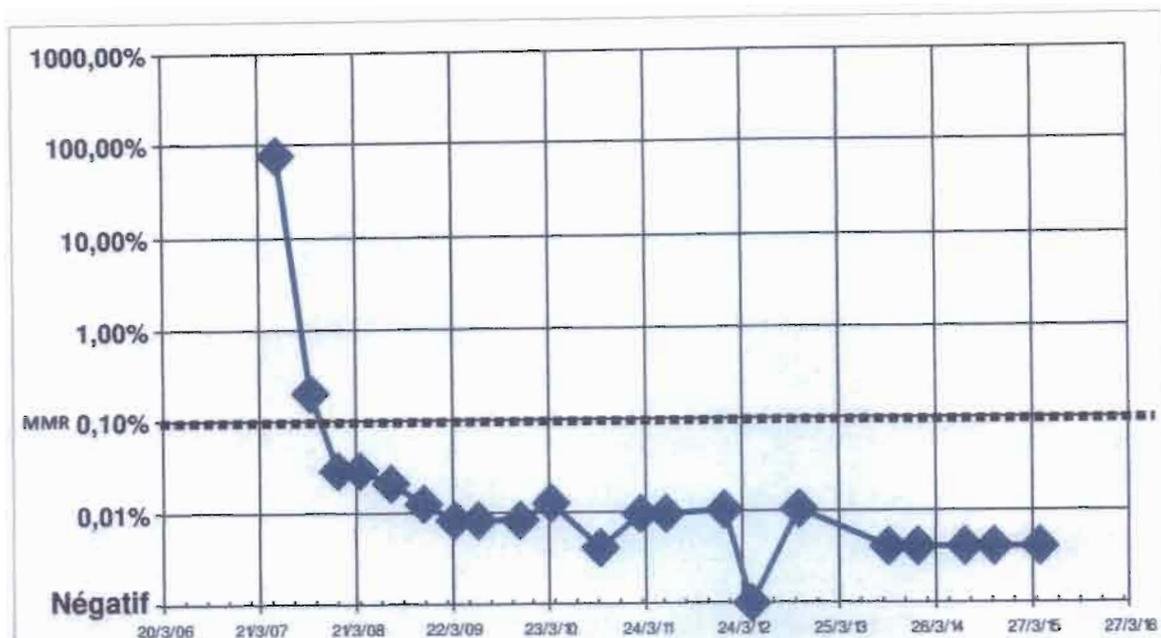
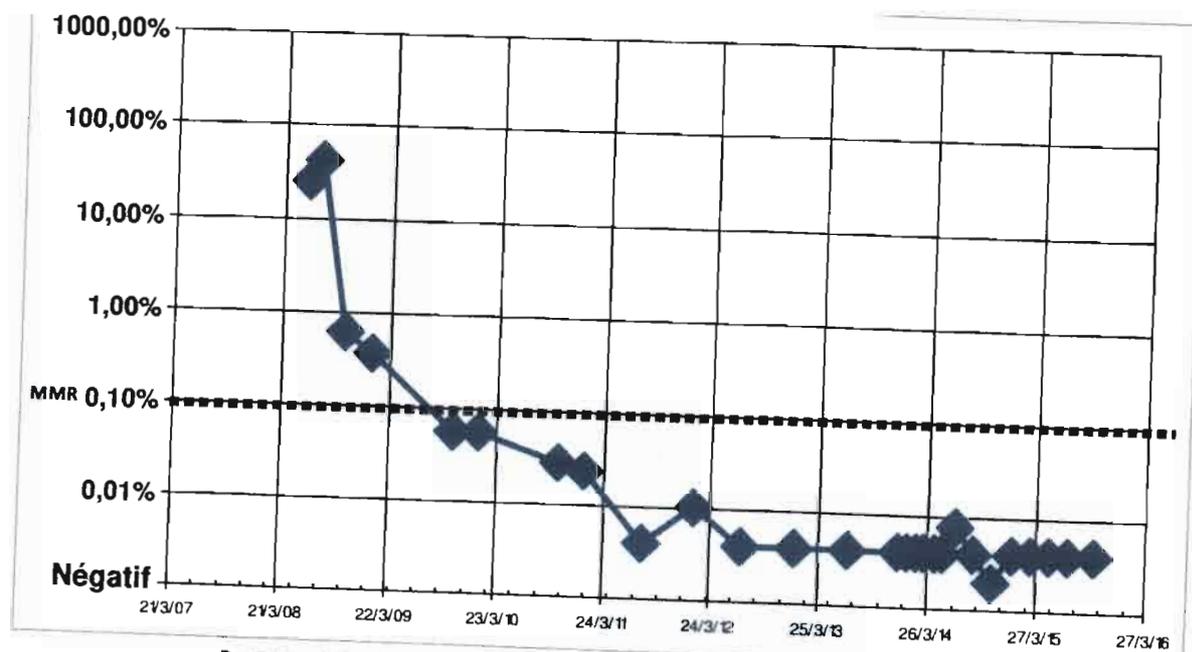


Figure 8 : Evolution de la réponse moléculaire du patient II

Patient II en réponse moléculaire profonde depuis six ans, quinze contrôles de RT qPCR classiques effectués et cinq positifs non quantifiables ont été analysés à cinquante cycles de qPCR.



Patient III en réponse moléculaire profonde depuis quatre ans, dix neuf contrôles RTq PCR classiques, six (deux négatifs et quatre positifs non quantifiables) analysés à cinquante cycles de q PCR

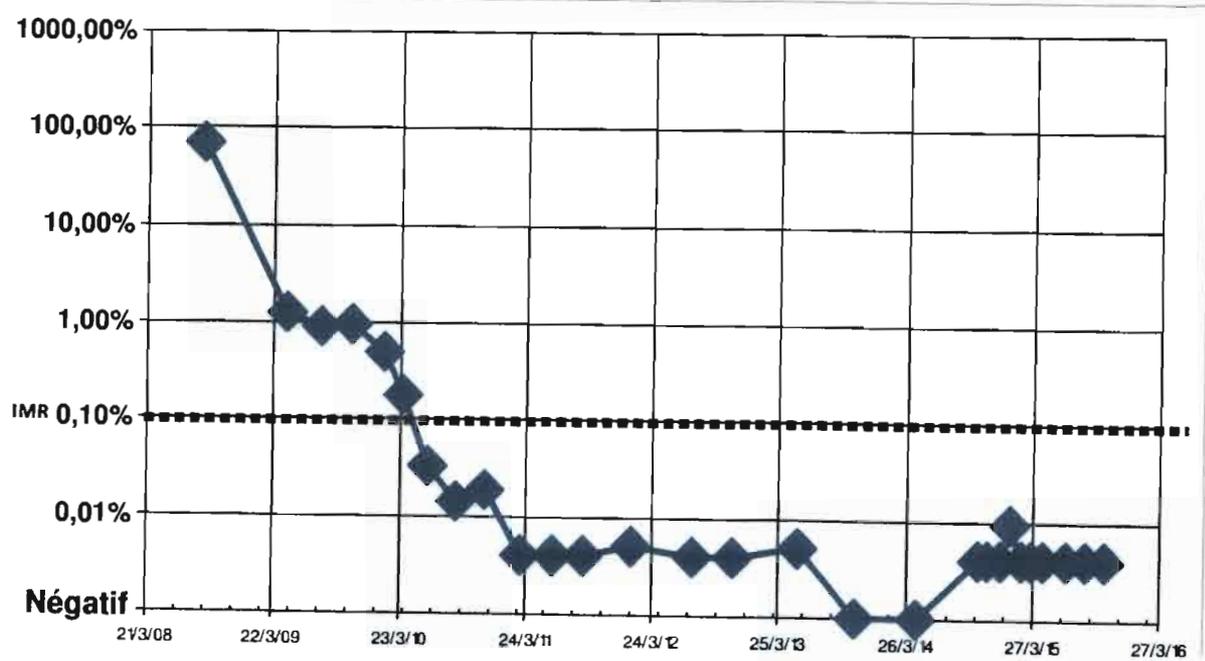


Figure 10 : Evolution de la réponse moléculaire du patient IV

Patient en réponse moléculaire profonde depuis six ans. vingt deux contrôles classiques de RTqPCR effectués. six des prélèvements (tous pnq) ont été analysés à cinquante cycles de qPCR

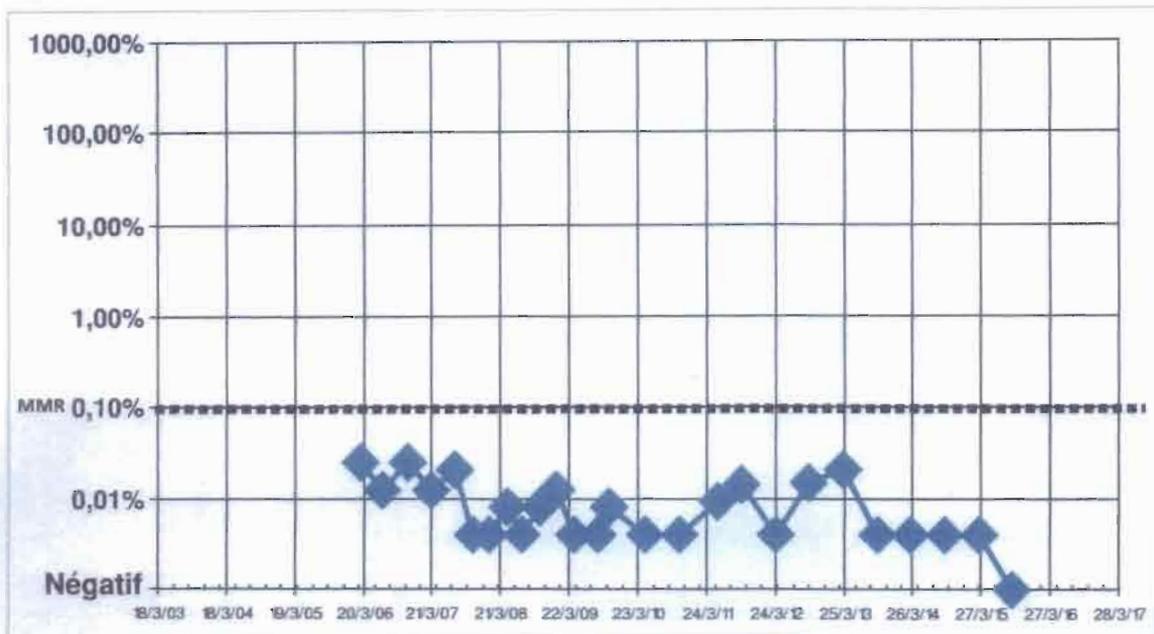


Figure 11 : Evolution de la réponse moléculaire du patient V *Patient V en réponse moléculaire profonde depuis huit ans, vingt deux analyses classiques de RTqPCR.*

Six (deux négatifs et quatre positifs non quantifiables) ont été analysés à cinquante cycles de qPCR

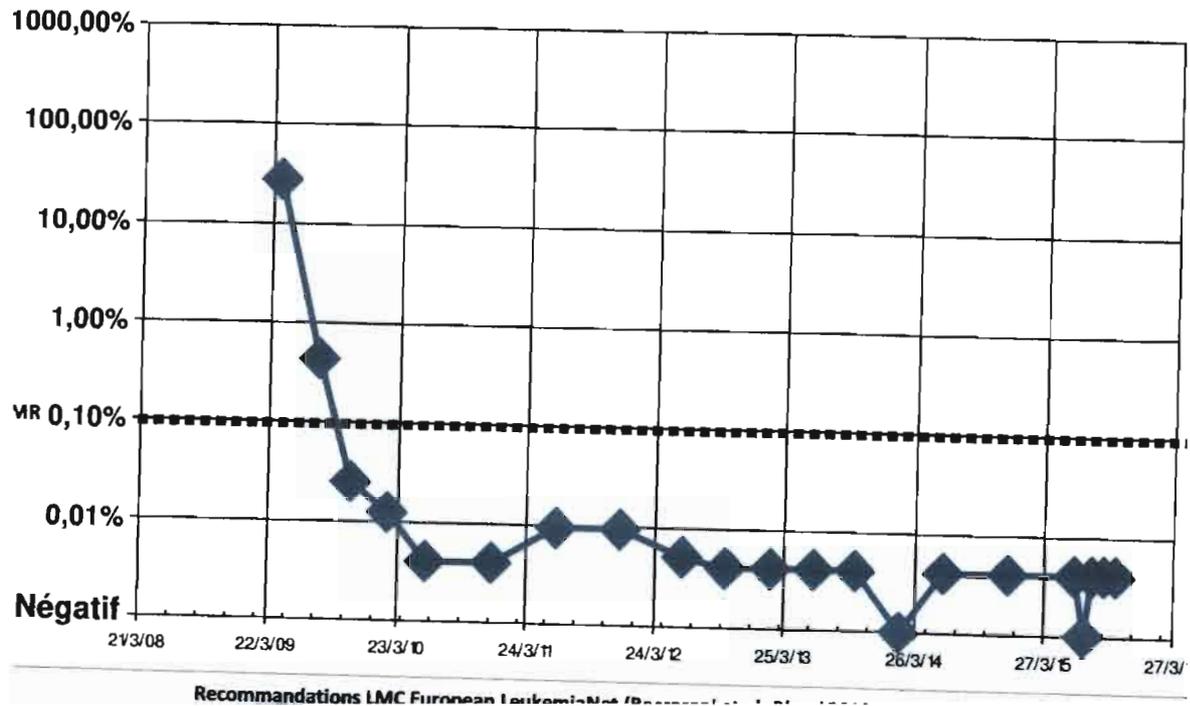


Figure 12 : Evolution de la réponse moléculaire du patient VI

Patient en réponse moléculaire depuis cinq ans. Vingt contrôles classiques de RTqPCR et six (un positif, quatre positifs non quantifiables et un négatif) à cinquante cycles de qPCR effectués.

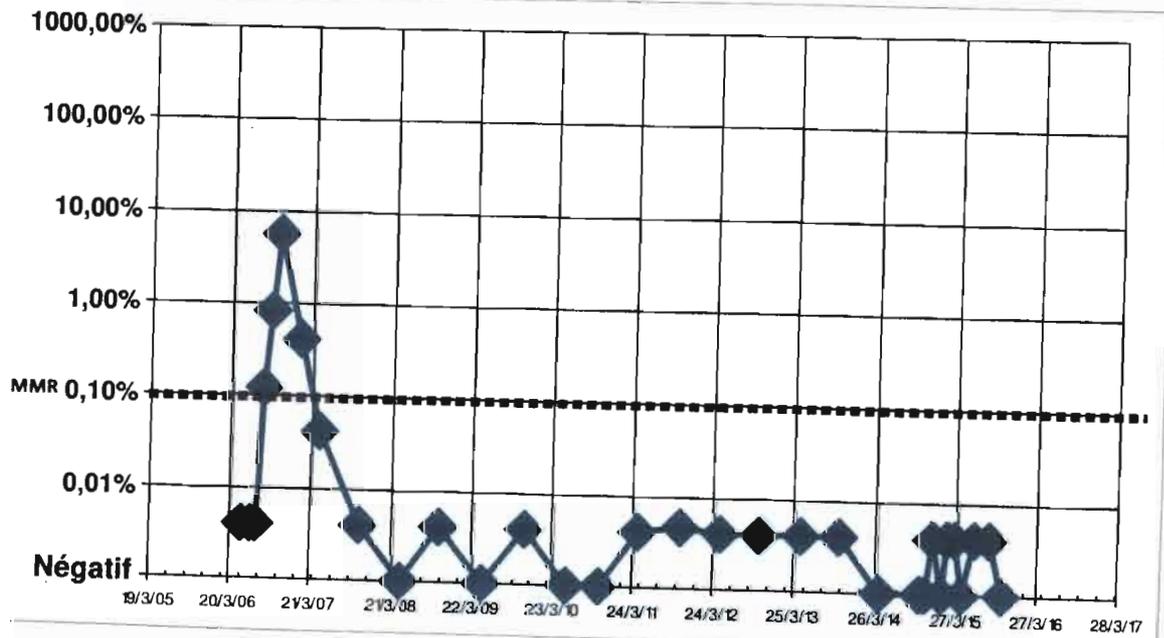


Figure 13 : Evolution de la réponse moléculaire du patient VII

Patient en réponse moléculaire profonde depuis huit ans. Vingt deux analyses classiques de RTqPCR et six (un positif et cinq positif non quantifiables) qPCR à cinquante cycles effectués

I.2- Deuxième série de prélèvements

Dix neuf prélèvements ponctuels de sang périphérique provenant de patients également sous anti-tyrosine kinase et en réponse moléculaire profonde ont été analysés en duplicat et cinquante cycles de RT qPCR. Le type de transcrit est également P210Kda.

I.3- Troisième série de prélèvements.

Dix prélèvements de sang périphérique de dix patients en réponse moléculaire profonde de leucémie myéloïde chronique sous anti-tyrosine kinase de première génération ont été analysés en duplicat avec les plasmides Qiagen-Ipsogen et le plasmide ERM-AD623. Un des patients à une insertion de BCR-ABL1 sur le dérivé 9. Les transcrits BCR-ABL1 sont tous de type P210Kda.

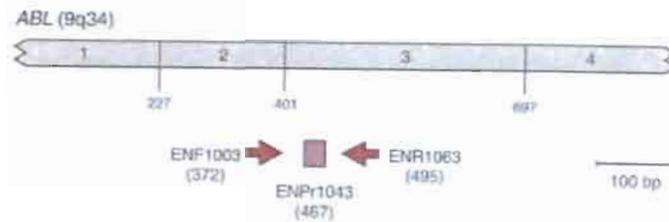
1.4-Analyse de quatre vingt deux échantillons de sang périphérique de LMC en RM dont quatre contrôles externes. Cette analyse a servi pour comparer les résultats des plasmides Qiagen-Ipsogen et ERM-AD623.

II- REACTIFS

Les réactifs qui ont été utilisés sont les suivants :

- Ficoll ;
 - Trizol (phénol et isothiocyanate) ;
 - Isopropanol ;
 - Éthanol 75% dilué dans de l'eau RNase-free ;
 - RNASE out (inhibiteur de RNASE) ;
 - Kit Superscript Vilo cDNA synthesis (Life Technologies) : comprenant Vilo reaction Mix (5X) (4 types de dNTP, Mg², tampon) et SuperScript enzyme Mix (10X) (transcriptase inverse) ;
 - Kit Roche LC480 Probes Master :
- +Amorces sens et anti-sens : ABL1 (ENF1003, ENR1063), P210 (ENF501, ENR561) ;

ENF1003 TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
 ENP1043 **FAM**-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-**TAMRA**
 ENR1063 GATGTAGTTGCTTGGGACCCA



Les numéros en-dessous des amorces et des sondes désignent la position sur le transcrit du gène, du nucléotide en 5'.

Figure 14 : représentation des amorces et sonde ABL1

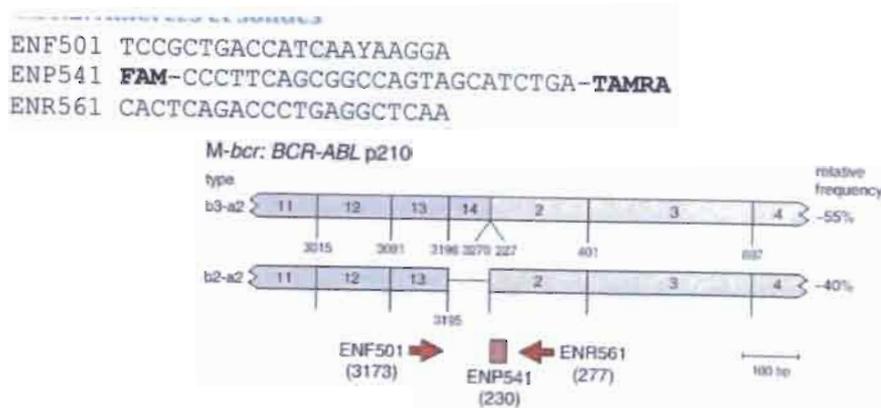


Figure 15 : représentation des amorces et sonde BCR-ABL1 (p210)

- + Sondes : ABL1(ENPr1043), P210(ENP541).
- LightCycler® 480 Probes Master Roche Life science (polymerase, Mg², tampon) ;
- Plasmides :
- + Gène de contrôle=Calibrateur BCR-ABL1(P210)
 Qiagen- ipsogen BCR-ABL1 MbcR Controls Kit
 Le kit contient les concentrations 10³, 10⁴, 10⁵.
- + Gène de contrôle=Calibrateur ABL1 : Qiagen- Ipsogen ABL1 Controls kit
 Le kit contient les concentrations 10³, 10⁴, 10⁵ copies.
- + Gène de contrôle=Plasmide ERM-AD 623: contient calibrateur BCR-ABL1(P210),
 BCR, GUSB (47,48).
 Le kit contient les concentrations 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ copies.

III- MATÉRIELS

Le matériel qui a été utilisé est le suivant :

- Tubes Eppendorff de : 0,2 ; 0,5 et 1,5 ml ;
- Pipettes de : 10, 20, 100,200 et 1000 μ l ;
- Tips de différents volumes ;
- Centrifugeuse thermo scientifique ;
- Cytomètre : Micros 60 ;
- Hotte chimique aspirante pour congélation-extraction des acides nucléiques ;
- Nanovue pour le dosage des ARNm ;
- Frigidaire -20°C ;
- Thermocycleur Veriti 60 puits pour la linéarisation et la transcription ;
- Hotte à double flux laminaire pour les mix et les dilutions ;
- Robot Hamilton pour la distribution des échantillons et des MIX ;
- LightCycler 480 pour l'amplification, le calcul des Cp et des concentrations.



Photo : LightCycler 480 ROCHE.

IV- METHODES

Les prélèvements ont été faits sur tube EDTA et une numération sanguine a été faite sur chacun d'eux pour avoir le nombre de cellules mononucléés. Les cellules mononucléés ont été séparées sur gradient de Ficoll par centrifugation à 16000g puis lavées à l'isopropanol et congelées sous Trizol avant extraction des ARNm. Le nombre de tubes à congeler pour chaque prélèvement a été fonction de la numération globulaire (un seul tube si le nombre de Globules blancs est inférieur à 10³/ μ l). Après le lavage, les cellules mononucléés ont été distribuées sous la hotte dans des tubes Eppendorff puis additionnées de trizol avant congélation à -20°C.

L'extraction des ARNm a été faite sous une hotte après décongélation des culots additionnés de trizol selon la procédure établit par le laboratoire.

Le dosage des ARNm a été effectué sur le Nanovue dans une autre salle selon une procédure écrite. Après le dosage, les ARNm ont été aliquotés, rangés dans des boîtiers adaptés et congelés à -80°C avant la transcription inverse.

La transcription inverse s'est déroulée dans deux salles différentes des précédentes : salle de mix et salle de linéarisation et transcription inverse.

Les échantillons à analyser ont été dilués avec de l'eau dans des tubes Eppendorff de 500µl. La quantité d'ARNm et d'eau à utiliser a été calculée préalablement par un tableur en tenant compte de la concentration d'ARNm de chaque échantillon pour avoir un volume final de 14µl dans chaque tube.

Tableau I : Le volume d'ARN à prélever pour la dilution, en fonction de la concentration de l'ARN à l'extraction.

Identifiant	Dosage	Ratio	µl ARN	µl eau
CF1	215	2,06	4,7	9,3
CF2	151	2,06	6,6	7,4
CF3	324	2,1	3,1	10,9
CF4	233	2,05	4,3	9,7
CF5	247	1,94	4,0	10,0
CF6	169	2,06	5,9	8,1

Le ratio exprime ici la pureté des ARNm, il est déterminé lors du dosage. Les ARNm sont purs si le ratio se rapproche de 2 ou est supérieur ou égal à 2.

Les échantillons ont été ensuite introduits dans les puits de l'appareil thermocycleur Veriti pour la linéarisation des ARNm. Pendant la linéarisation les Mix (amorces, nucléotides [dNTP], Mg²⁺, tampon et la transcriptase inverse) ont été préparés pour tous les échantillons à analyser. Le volume total des mix à préparer est fonction du nombre d'échantillons plus deux.

Tableau II : Le calcul du volume des mix à préparer en fonction du nombre d'échantillons à tester.

Linéarisation	10' à 70°C	Linéarisation	
MIX	c final	n=1	8
5X VILO Réaction	1X	4	32
<i>KIT N° LOT:</i>			
10X SuperScriptEnzyme Mix	1X	2	16
RT +	Volume total	6	48

Utilisation	Temps/ Températures	Veriti 60
RT	10' à 25°C	RT
	60' à 42°C	
	5' à 85°C	
à 4°C	

n=1 quantité à mettre pour un échantillon, 5XVilo Reaction représente les amorces, le magnésium, les dNTP et le tampon, VILO est l'acronyme de : Variable Input, Linear Output 10XSuper ScriptEnzyme mix est la polymérase et l'inhibiteur de RNase dans un milieu approprié. RT ou reverse transcriptase.

A la fin de la linéarisation, les échantillons ont été retirés du thermocycleur Veriti et 6µl de Mix a été introduit dans chaque échantillon linéarisé. Les tubes ainsi additionnés de Mix ont été réintroduit dans le Veriti et le programme transcription inverse a été déclenché. A la fin du programme, tous les ARNm ont été convertis en cADN. Ils ont été ensuite congelés à -20°C avant l'amplification.

L'amplification quantitative

Les réactifs ont été préparés et aliquotés à l'avance et un aliquote est décongelé lors de chaque manipulation.

Les amorces et les sondes ont été reconstituées à 100µM. La solution de travail est de 18µM pour les amorces et 14µM pour les sondes (dilution au 1/5,5 pour les amorces et 1/7,14 pour les sondes).

L'Amplification se fait sur des plaques blanches de 96 puits et chaque échantillon est analysé en double (duplicat) ou en triple (triplicat). Un plan de la plaque qui existe sur un fichier Excel du robot Hamilton a été complété afin de connaître le nombre de tubes à faire pour la préparation de chaque Mix. Ci-dessous un exemple de plaque en triplicata et duplicata ; et mode de calcul pour la préparation des Mix.

Tableau III : représentations des plaques : en Duplicat A et Triplicat B (fonction du nombre d'échantillons)

A

BCR3 CAL BCR3	BCR3 CAL BCR3	ABL CAL ABL	ABL CAL ABL	BCR3 52822169 LACOMB	BCR3 52822169 LACOMB	ABL 52822169 LACOMB	ABL 52822169 LACOMB	P210 5286 2376 HELBIN	P210 5286 2376 HELBIN	ABL 5286 2376 HELBIN	ABL 5286 2376 HELBIN
BCR3 H2O	BCR3 H2O	ABL H2O	ABL H2O	P210 CAL P210	P210 CAL P210	ABL AD623	ABL AD623	P210 5286 2385 ANDRIE	P210 5286 2385 ANDRIE	ABL 5286 2385 ANDRIE	ABL 5286 2385 ANDRIE
BCR3 5272 3790 OLIVAR	BCR3 5272 3790 OLIVAR	ABL 5272 3790 OLIVAR	ABL 5272 3790 OLIVAR	P210 H2O	P210 H2O	P210 AD623	P210 AD623	P210 5286 3511 SERIN	P210 5286 3511 SERIN	ABL 5286 3511 SERIN	ABL 5286 3511 SERIN
BCR3 5273 3689 REYES	BCR3 5273 3689 REYES	ABL 5273 3689 REYES	ABL 5273 3689 REYES	P210 5286 2291 LACAU	P210 5286 2291 LACAU	ABL 5286 2291 LACAU	ABL 5286 2291 LACAU	P210 5286 3523 BOUKKO	P210 5286 3523 BOUKKO	ABL 5286 3523 BOUKKO	ABL 5286 3523 BOUKKO
BCR3 5275 1543 MOREAU	BCR3 5275 1543 MOREAU	ABL 5275 1543 MOREAU	ABL 5275 1543 MOREAU	P210 5286 1834 DE ARC	P210 5286 1834 DE ARC	ABL 5286 1834 DE ARC	ABL 5286 1834 DE ARC	P210 5286 3558 ANDREU	P210 5286 3558 ANDREU	ABL 5286 3558 ANDREU	ABL 5286 3558 ANDREU
BCR3 5280 3100 MILHAV	BCR3 5280 3100 MILHAV	ABL 5280 3100 MILHAV	ABL 5280 3100 MILHAV	P210 5286 1835 CAUHAP	P210 5286 1835 CAUHAP	ABL 5286 1835 CAUHAP	ABL 5286 1835 CAUHAP	P210 5286 3555 TOUPET	P210 5286 3555 TOUPET	ABL 5286 3555 TOUPET	ABL 5286 3555 TOUPET
BCR3 5280 3738 FONTAN	BCR3 5280 3738 FONTAN	ABL 5280 3738 FONTAN	ABL 5280 3738 FONTAN	P210 5286 1836 COCATR	P210 5286 1836 COCATR	ABL 5286 1836 COCATR	ABL 5286 1836 COCATR	P210 5286 3578 DEIXON	P210 5286 3578 DEIXON	ABL 5286 3578 DEIXON	ABL 5286 3578 DEIXON
BCR3 5280 3720 FONTAN	BCR3 5280 3720 FONTAN	ABL 5280 3720 FONTAN	ABL 5280 3720 FONTAN	P210 5286 1827 ALIHAD	P210 5286 1827 ALIHAD	ABL 5286 1827 ALIHAD	ABL 5286 1827 ALIHAD	P210 5286 3563 BOULEY	P210 5286 3563 BOULEY	ABL 5286 3563 BOULEY	ABL 5286 3563 BOULEY

Chaque échantillon a été déposé en double

B

		SALIFO											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P210 P210	P210 P210	P210 P210	ABL ABL	ABL ABL	ABL ABL	P210 CJ1	P210 CJ1	P210 CJ1	ABL CJ1	ABL CJ1	ABL CJ1	
B	P210 H2O	P210 H2O	P210 H2O	ABL H2O	ABL H2O	ABL H2O	P210 CJ2	P210 CJ2	P210 CJ2	ABL CJ2	ABL CJ2	ABL CJ2	
C	P210 CJC1	P210 CJC1	P210 CJC1	ABL CJC1	ABL CJC1	ABL CJC1	P210 CJ3	P210 CJ3	P210 CJ3	ABL CJ3	ABL CJ3	ABL CJ3	
D	P210 CJC2	P210 CJC2	P210 CJC2	ABL CJC2	ABL CJC2	ABL CJC2	P210 CJ4	P210 CJ4	P210 CJ4	ABL CJ4	ABL CJ4	ABL CJ4	
E	P210 CJC3	P210 CJC3	P210 CJC3	ABL CJC3	ABL CJC3	ABL CJC3	P210 CJ5	P210 CJ5	P210 CJ5	ABL CJ5	ABL CJ5	ABL CJ5	
F	P210 CJC4	P210 CJC4	P210 CJC4	ABL CJC4	ABL CJC4	ABL CJC4	P210 CJ6	P210 CJ6	P210 CJ6	ABL CJ6	ABL CJ6	ABL CJ6	
G	P210 CJC5	P210 CJC5	P210 CJC5	ABL CJC5	ABL CJC5	ABL CJC5							
H	P210 CJC6	P210 CJC6	P210 CJC6	ABL CJC6	ABL CJC6	ABL CJC6							

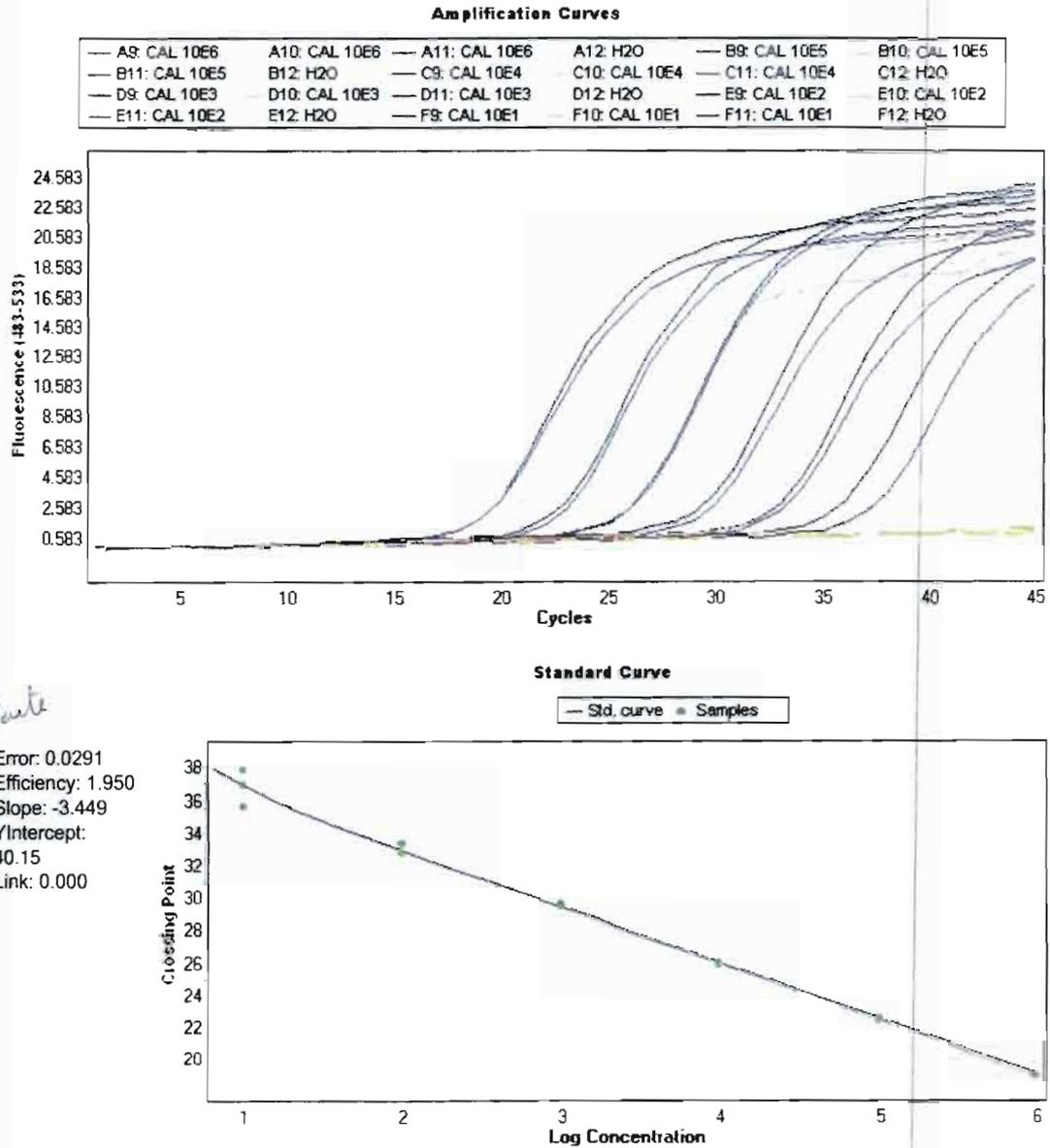
Chaque échantillon a été déposé en triple

Les MIX amorces et sondes :

Il a été mis 100µl d'amorce sens ,100µl amorce anti-sens et 50µl de sonde et des aliquotes de 20 à 45µl ont été réalisés et congelés.

Les plasmides servent à contrôler la qualité et la quantité des ARNm analysés. Une gamme plasmidique qui est une gamme d'étalonnage, spécifique de chaque transcrit a été réalisée et enregistrée dans le LC480. La réalisation de la gamme a été la suivante :

- Le kit des plasmides ABL1 (Qiagen Ipsogen) comprenait les concentrations 10^3 , 10^4 et 10^5 copies. Il a fallu préparer les dilutions manquantes ($10^2, 10^1$): La dilution supérieure a été prise et diluer au $1/10^{\text{ème}}$ ($10\mu\text{l}$ plasmides 10^3 additionné à $90\mu\text{l}$ d'eau pour avoir la dilution 10^2) même procédure avec la dilution 10^2 pour avoir la dilution 10^1 . Pour faire la gamme cible, les dilutions 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ont été prises. Chaque dilution a été testée en triple.
- La dilution 10^4 a été utilisée comme calibrateur.
- La préparation de la gamme p210 (Qiagen Ipsogen) a été identique.



Error= erreur, Efficiency= efficacité, Slope= pente, Y intercept= Y ordonnée
 Link=lien.

Figure 16 : courbes d'amplification de la Gamme p210 QIAGEN-IPSOGEN

Tableau IV : Le calcul des Cp et des concentrations de la Gamme P210 Qiagen-Ipsogen

Identifiant	Type	Cp	concentration	Standard
Cal 10E6	Standard	19,00	1,04E6	1,00E ⁶
Cal 10E6	Standard	19,03	1,02E6	1,00E ⁶
Cal 10E6	Standard	19,04	1,02E6	1,00E ⁶
H ₂ O	C. Neg			
Cal 10E5	Standard	22,49	1,01E5	1,00E ⁵
Cal 10E5	Standard			1,00E ⁵
Cal 10E5	Standard	22,54	9,85E4	1,00E ⁵
H ₂ O	C. Neg			
Cal 10E4	Standard	25,92	1,03E4	1,00E ⁴
Cal 10E4	Standard	25,98	9,88E3	1,00E ⁴
Cal 10E4	Standard	26,00	9,78E3	1,00E ⁴
H ₂ O	C. Neg			
Cal 10E3	Standard	29,51	9,35E2	1,00E ³
Cal 10E3	Standard	29,46	9,68E2	1,00E ³
Cal 10E3	Standard	29,53	9,24E2	1,00E ³
H ₂ O	C. Neg			
Cal 10E2	Standard	32,77	1,06E2	1,00E ²
Cal 10E2	Standard	33,28	7,58E1	1,00E ²
Cal 10E2	Standard	32,77	1,06E2	1,00E ²
H ₂ O	C. Neg			
Cal 10E1	Standard	35,55	1,99E1	1,00E ¹
Cal 10E1	Standard	37,84	6,51E0	1,00E ¹
Cal 10E1	Standard	36,89	1,00E1	1,00E ¹
H ₂ O	C. Neg			

Le standard est la concentration attendue H₂O est le contrôle négatif. il doit être négatif pour valider l'analyse.

Le kit ERM-AD623 contenait toutes les 6 dilutions et chaque dilution a été testée en triple comme les autres plasmides.

Les critères de validation de la gamme ont été les suivants :

- Que les courbes d'amplification soient parallèles ;
- Que la pente de la droite soit comprise entre -3,1 et -3,6 ;
- Que l'efficacité soit supérieure à 1,9.

La pente est l'indicateur de l'efficacité de la PCR. A 100% d'efficacité, elle sera égale à -3.322. L'efficacité permet de calculer le nombre d'amplicons. Si l'efficacité est de 100%, le nombre d'amplicons est égal au nombre de matrices de départ dans l'échantillon $\times 2^n$ n est le nombre de cycle de PCR. Si l'efficacité est de 90% le nombre d'amplicons est égal au nombre de matrices dans l'échantillon examiné $\times 1,9^n$. Si l'efficacité est de 75%, le nombre d'amplicons est égal au nombre de matrices de départ dans l'échantillon $\times 1,75^n$. Le nombre d'amplicons est proportionnel à la fluorescence mesurée.

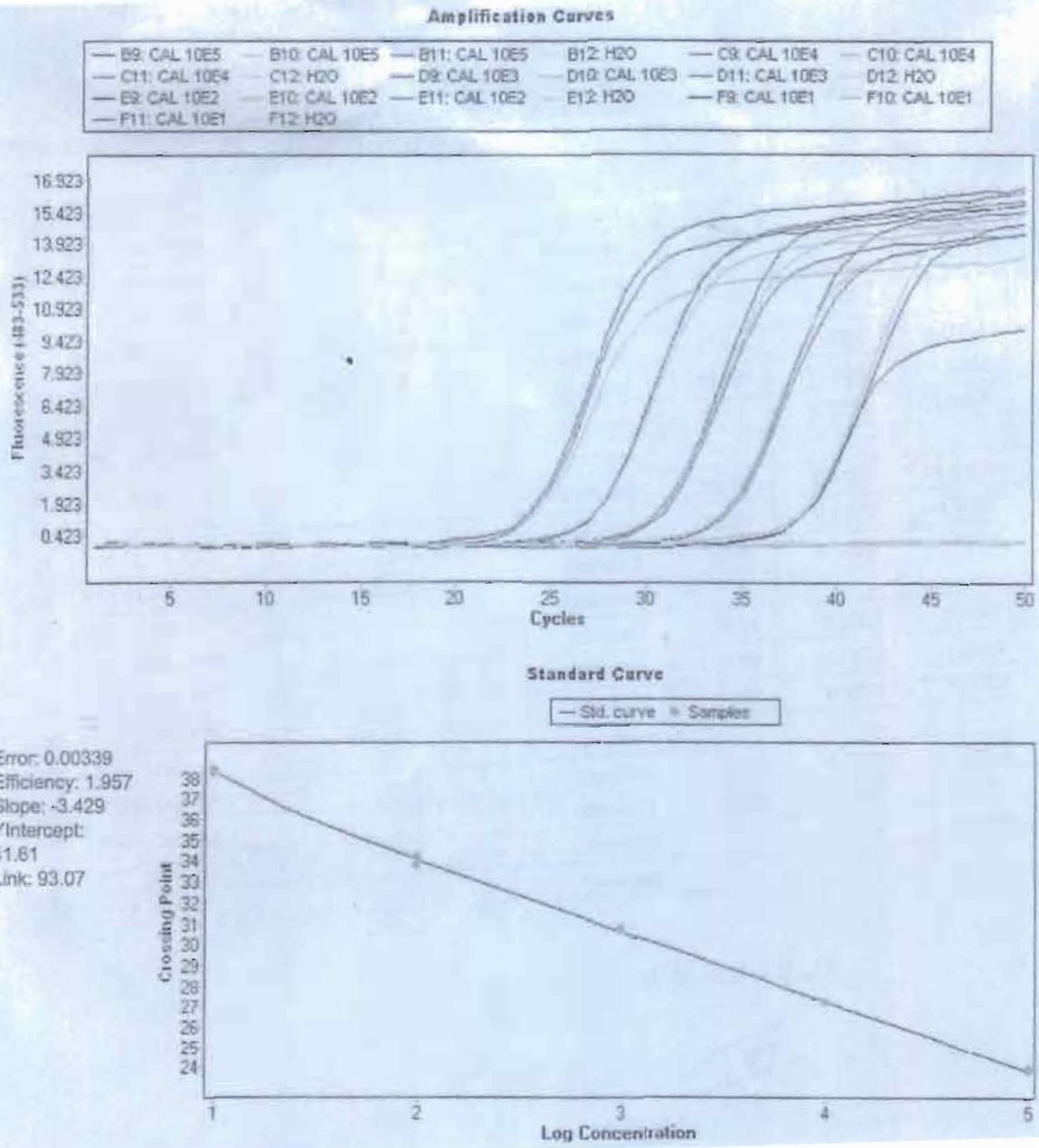


Figure 17 : courbes d'amplification de la GAMME ABL1 QIAGEN IPSOGEN
Les courbes d'amplification sont parallèles

Tableau V : Calcul des Cp et de la concentration des copies d'ABL1 de la Gamme Qiagen-Ipsogen

Identifiant	Cp	concentration	Standard
CAL 10 ⁵	23,81	9,82E4	1,00E ⁵
CAL 10 ⁵	23,85	9,54E4	1,00E ⁵
CAL 10 ⁵	23,81	9,85E4	1,00E ⁵
H ₂ O	C. Neg		
CAL 10 ⁴	27,14	1,05E4	1,00E ⁴
CAL 10 ⁴	27,16	1,03E4	1,00E ⁴
CAL 10 ⁴	27,19	1,02E4	1,00E ⁴
H ₂ O	C. Neg		
CAL 10 ³	30,72	9,47E2	1,00E ³
CAL 10 ³	30,65	9,96E2	1,00E ³
CAL 10 ³	30,66	9,90E2	1,00E ³
H ₂ O	C. Neg		
CAL 10 ²	34,18	9,31E1	1,00E ²
CAL 10 ²	33,83	1,18E2	1,00E ²
CAL 10 ²	34,08	9,96E1	1,00E ²
H ₂ O	C. Neg		
CAL 10 ¹	38,42	9,75E0	1,00E ¹
CAL 10 ¹	38,29	1,03E1	1,00E ¹
CAL 10 ¹			1,00E ¹

La concentration du calibrateur d'ABL1 ou contrôle positif est de 10000 copies. Le contrôle négatif (H₂O) est bien négatif. La différence entre les Cp pour chaque triplicat est inférieure à 0,5

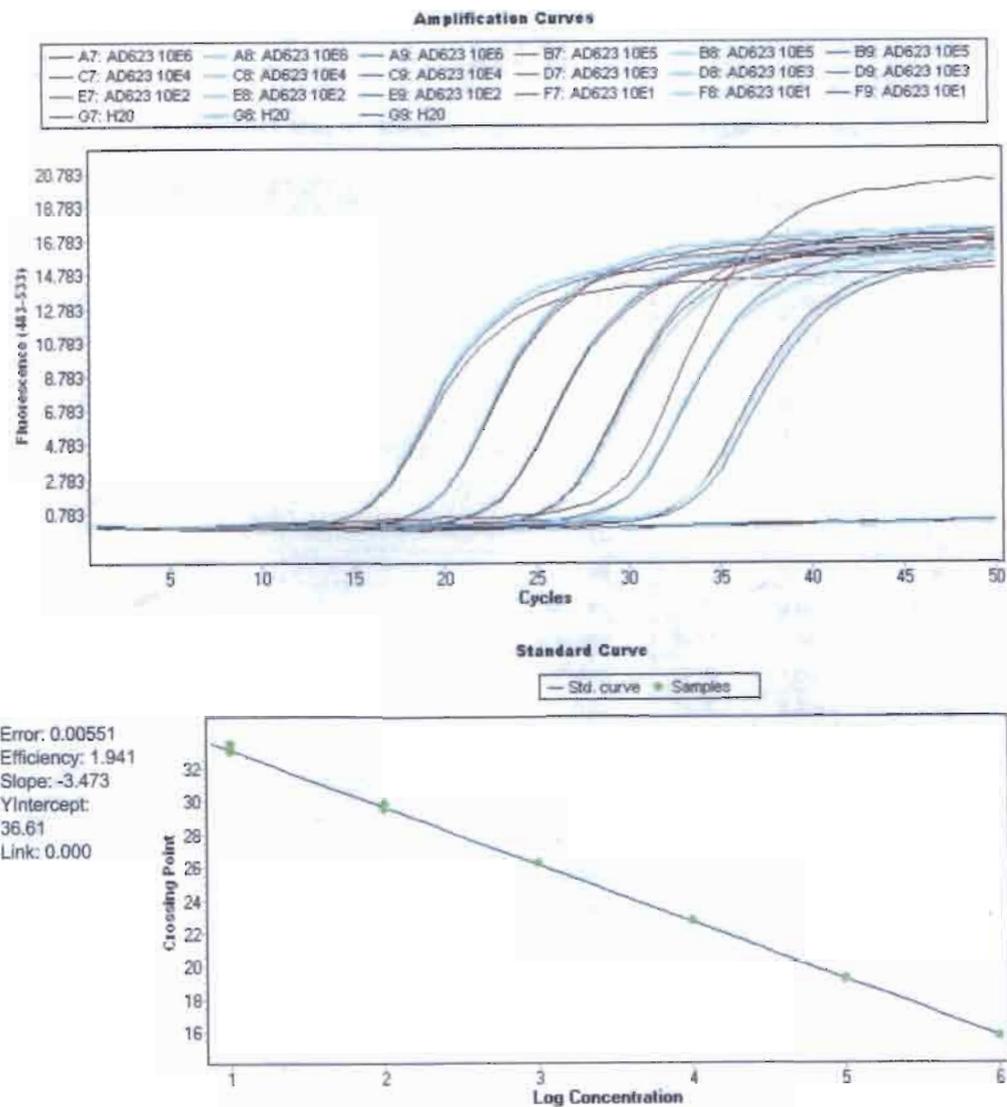


Figure 18 : Courbes d'amplification de la GAMME P210 ERM-AD623

Les courbes d'amplification sont parallèles.

Slope = pente, Y intercept = Y ordonnée, Efficiency = efficacité, Error = Erreur

Cycle threshold (acronyme Ct) ou cycle seuil est le nombre de cycle d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (valeur seuil) (64). Il existe une corrélation linéaire entre le Ct et le Log du nombre de cycles. Plus le log est petit et plus la solution est concentrée. En réponse moléculaire profonde, il y a moins de transcrits BCR-ABL1. Il faut donc plus de cycles pour avoir plusieurs copies. Pour avoir 10 copies il faut 3,32 cycles ; pour 50 cycles le nombre de copies sera 2^{50} copies.

Tableau VI : Calcul des Cp et des Copies P210 de la Gamme ERM-AD623

Identifiant	Cp	Concentration	Standard
AD623 10E6	15,68	1,03E6	1,00E6
AD623 10E6	15,70	1,02E6	1,00E6
AD623 10E6	15,68	1,03E6	1,00E6
H ₂ O	Inconnu		
AD623 10E5	19,22	9,89E4	1,00E5
AD623 10E5	19,19	1,01E5	1,00E5
AD623 10E5	19,23	9,78E4	1,00E5
H ₂ O	Inconnu		
AD623 10E4	22,71	9,73E3	1,00E4
AD623 10E4	22,74	9,59E3	1,00E4
AD623 10E4	22,67	1,00E4	1,00E4
H ₂ O	Inconnu		
AD623 10E3	26,18	9,76E2	1,00E3
AD623 10E3	26,22	9,51E2	1,00E3
AD623 10E3	26,15	9,96E2	1,00E3
H ₂ O			
AD623 10E2	29,53	1,06E2	1,00E2
AD623 10E2	29,56	1,04E2	1,00E2
AD623 10E2	29,86	8,49E1	1,00E2
H ₂ O			
AD623 10E1	32,98	1,08E1	1,00E1
AD623 10E1	33,16	9,54E0	1,00E1
AD623 10E1	33,50	7,63E0	1,00E1
H ₂ O	Inconnu		
H ₂ O	Inconnu		
H ₂ O	Inconnu		

$E6=10^6$, $E5=10^5$, $E4=10^4$, $E3=10^3$, $E2=10^2$, $E1=10^1$. La Concentration du Calibrateur p210 ERM-AD623(AD62310E4) est de 9700 copies, Le Cp du calibrateur est de

22,71 Le contrôle négatif (H₂O) est négatif. la différence entre les Cp des triplicats est inférieure à 0,5

Crossing point (acronyme Cp en anglais).

Quand l'amplification est exponentielle, $C_t = C_p$

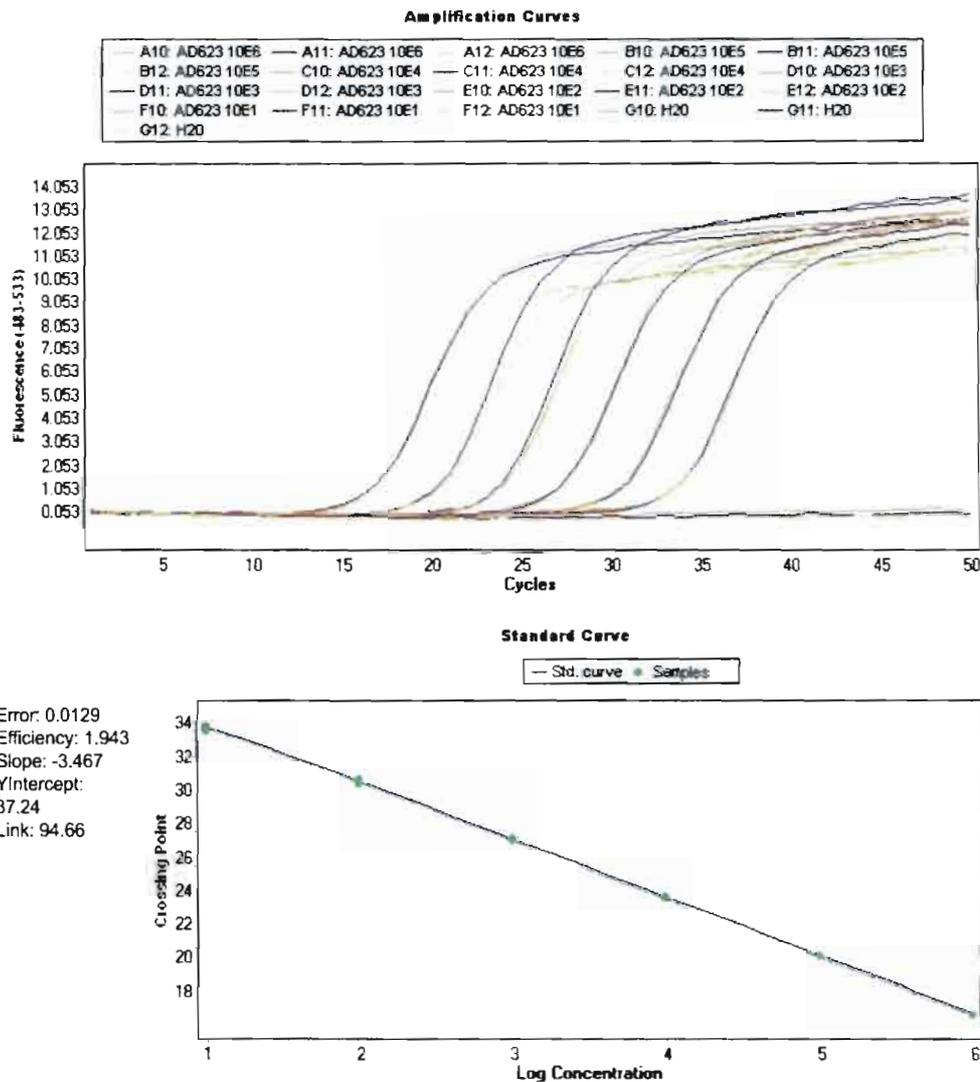


Figure 19 : Courbes d'amplification de la GAMME ABL1 ERM-AD623

Les courbes sont bien parallèles

Tableau VII : Calcul Cp et Copies ABL1 de Gamme ERM-AD623.

Identifiant	Cp	concentration	standard
ERM-AD623 10 ⁶	16,60	1,01E6	1,00E6
ERM-AD623 10 ⁶	16,60	1,01E6	1,00E6
ERM-AD623 10 ⁶	16,60	1,01E6	1,00E6
ERM-AD623 10 ⁵	20,13	9,71E4	1,00E5
ERM-AD623 10 ⁵	20,08	1,00E5	1,00E5
ERM-AD623 10 ⁵	20,10	9,91E4	1,00E5
ERM-AD623 10 ⁴	23,57	9,86E3	1,00E4
ERM-AD623 10 ⁴	23,55	9,99E3	1,00E4
ERM-AD623 10 ⁴	23,64	1,43E3	1,00E4
ERM-AD623 10 ³	27,01	1,01E3	1,00E3
ERM-AD623 10 ³	27,00	1,01E3	1,00E3
ERM-AD623 10 ³	27,47	9,64E2	1,00E3
ERM-AD623 10 ²	30,48	1,00E2	1,00E2
ERM-AD623 10 ²	30,57	9,47E1	1,00E2
ERM-AD623 10 ²	30,33	1,11E2	1,00E2
ERM-AD623 10 ¹	33,78	9,28E0	1,00E1
ERM-AD623 10 ¹	33,53	1,13E1	1,00E1
ERM-AD623 10 ¹	33,69	1,00E1	1,00E1
H ₂ O	Inconnu		
H ₂ O	Inconnu		
H ₂ O	Inconnu		

La concentration du calibrateur ABL1 ERM-AD623 est de 9760, le Cp du calibrateur est de 23,58, le contrôle négatif (H₂O) est négatif. La différence entre les Cp est inférieure à 0,5. Le standard est le nombre de copies normalement attendu. Inconnu

signifie que le contenu est inconnu avant amplification. les cases vides signifie une absence de matrice à amplifier.

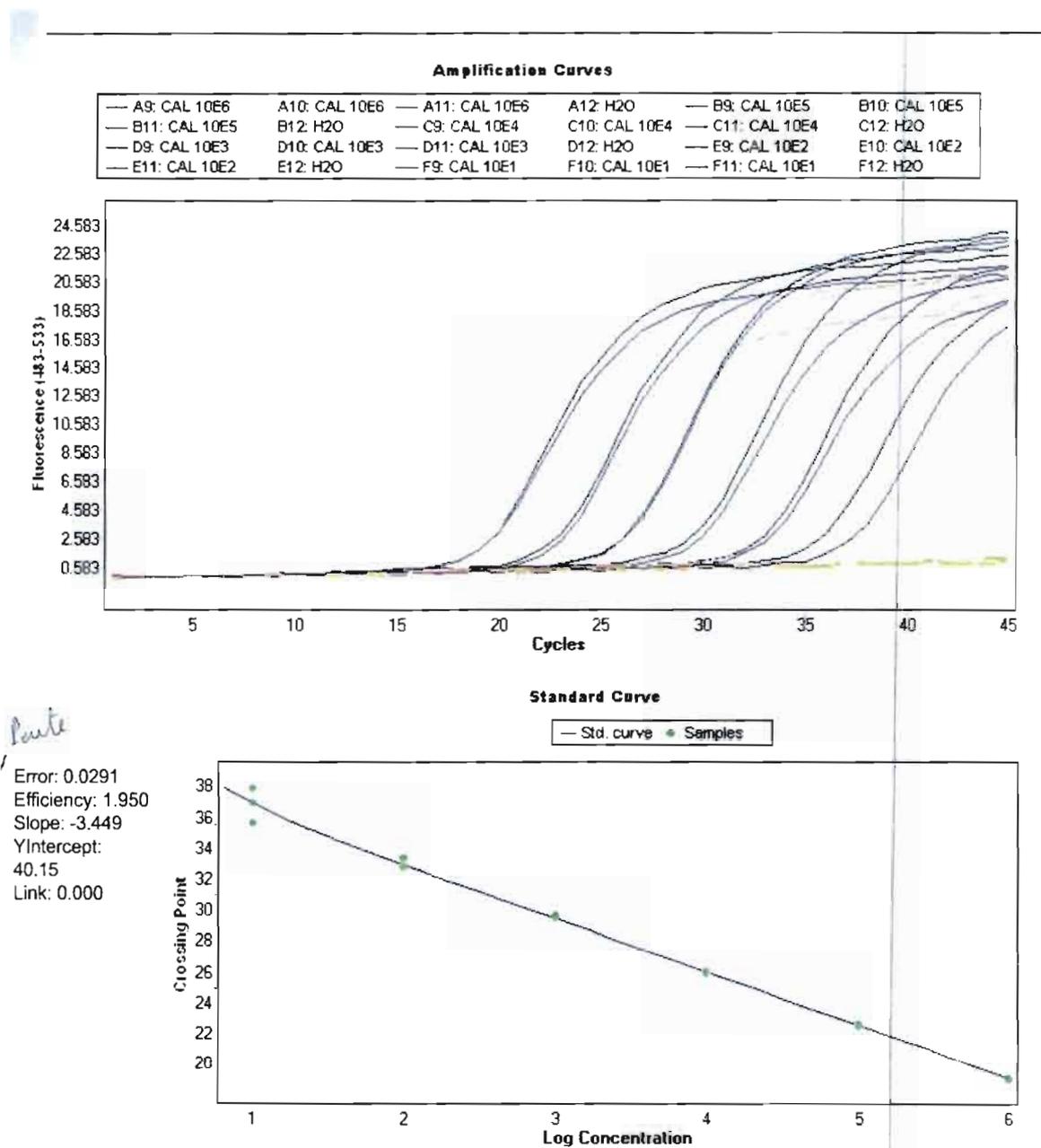


Figure 20 : courbes d'amplification de la GAMME p210 QIAGEN-IPSOGEN

Les courbes d'amplification sont parallèles et la pente est normale

La pureté des ARNm est bonne.

Tableau VIII : Calcul des Cp et copies P210 de la Gamme Qiagen-Ipsogen

La Concentration du calibrateur P210 Qiagen Ipsogen est de 9987 copies, le Cp est à 25,96 cycles, le contrôle négatif (H₂O) est négatif.

Identifiant	Cp	Concentration	Standard
CAL10E ⁶	19,00	1,4E6	1,00E6
CAL10E ⁶	19,03	1,02E6	1,00E6
CAL10E ⁶	19,04	1,02E6	1,00E6
H2O	Inconnu		
CAL10E ⁵	22,49	1,01E5	1,00E5
CAL10E ⁵			1,00E5
CAL10E ⁵	22,54	9,85E4	1,00E5
H2O	Inconnu		
CAL10E ⁴	25,92	1,03E4	1,00E4
CAL10E ⁴	25,98	9,88E3	1,00E4
CAL10E ⁴	26,00	9,78E3	1,00E4
H2O	Inconnu		
CAL10E ³	29,51	9,35E2	1,00E3
CAL10E ³	29,46	9,68E2	1,00E3
CAL10E ³	29,53	9,24E2	1,00E3
H2O	Inconnu		
CAL10E ²	32,77	1,06E2	1,00E2
CAL10E ²	33,28	7,58E1	1,00E2
CAL10E ²	32,77	1,06E2	1,00E2
H2O	Inconnu		
CAL10E ¹	35,55	1,99E1	1,00E1
CAL10E ¹	37,84	6,51E0	1,00E1
CAL10E ¹	36,89	1,00E1	1,00E1
H2O	Inconnu		

A chaque analyse, il a été utilisé un point de la gamme (10^4) qui a permis le calcul du ratio gène cible/gène de référence.

Pour l'amplification des échantillons cibles les cADN concernés ont été dilués avec 30µl d'eau sous la hotte à double flux laminaire située dans la salle pré-pcr. Chaque tube cible avait 50µl de cADN dilué.

Dans la salle des Mix, ont été constitués en fonction du nombre de patients à tester plus deux et du nombre du type de répliques (duplicat, triplicat) la quantité de MIX à préparer.

Tableau IX : Calcul du volume des MIX pour la PCR en fonction du nombre d'échantillons à analyser plus 2

N° LOT KIT PROBE MASTER :

Date MIX Amorces/Sonde :								
Date MIX Plasmides								
Transcrits	n=1	P210	ABL					
H2O du kit	4,3	206,4	206,4	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
MIX amorces + sonde	0,7	33,6	33,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
MIX(LC 480 Probes Master, 2X)	10	480	480	10	10	10	10	10
Volume final	15	720	720	15	15	15	15	15
Nbre de puits	1	48	48	1	1	1	1	1

Volume de MIX par puit	15 µL
Volume de cADN dilué par puit	5 µL
Centrifugation	2 mn à 1500 tours/minute

n=1 la quantité à mettre dans un puits, P210 quantité à mettre pour la cible, ABL quantité à mettre pour le gène de contrôle, MIX (LC 480 probes Master, 2X) est la polymérase.

Les échantillons dilués, les calibrateurs, l'eau et les Mix, la plaque de 96 puits ont été introduits dans des places déterminées dans le robot Hamilton. Le robot Hamilton a distribué en fonction du plan de la plaque qui a été introduit, 15µl de Mix dans chaque puit et 5µl d'échantillon dans chaque puits correspondant. A la fin de la distribution par le robot, la plaque a été retirée, a été recouverte d'un film plastique adhésif. La plaque a été amenée dans la salle PCR et centrifugée 2 minutes à 1500g. Après la centrifugation, la plaque été placé dans l'appareil LC480 qui a été programmé pour 50 cycles, le mode opératoire LightCycler 480 a été lancé pour l'amplification et l'analyse.

Les critères de validation des résultats ont été les suivants :

- Que les contrôles négatifs ne soient pas amplifiés ;

- Que les copies ABL1 soient supérieurs à 10000 copies pour chaque échantillon ;
- Que le ratio des calibrateurs soient entre 0,7 et 1,4 ;
- Que la variation résultats entre eux en duplicats ou en triplicats soit $<0,5$ en + ou en - pour des valeurs de Ct inférieur à 35 cycles ;
- Que les courbes d'amplifications soient parallèles.

Au diagnostic les Cp des patients sont inférieurs au Cp de la Gamme. En suivi et surtout en réponse moléculaire profonde les Cp des patients sont supérieurs au Cp de la gamme.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

I- RESULTATS

I.1- La première série de prélèvements

La première série de prélèvements a été analysée avec les réactifs Qiagen-Ipsogen et les tests ont été réalisés à cinquante cycles de PCR, en triplicat. Quatre plaques de 96 puits ont été utilisées pour l'analyse des différents prélèvements des sept patients.

I.1.1- Première plaque (premier et deuxième patient)

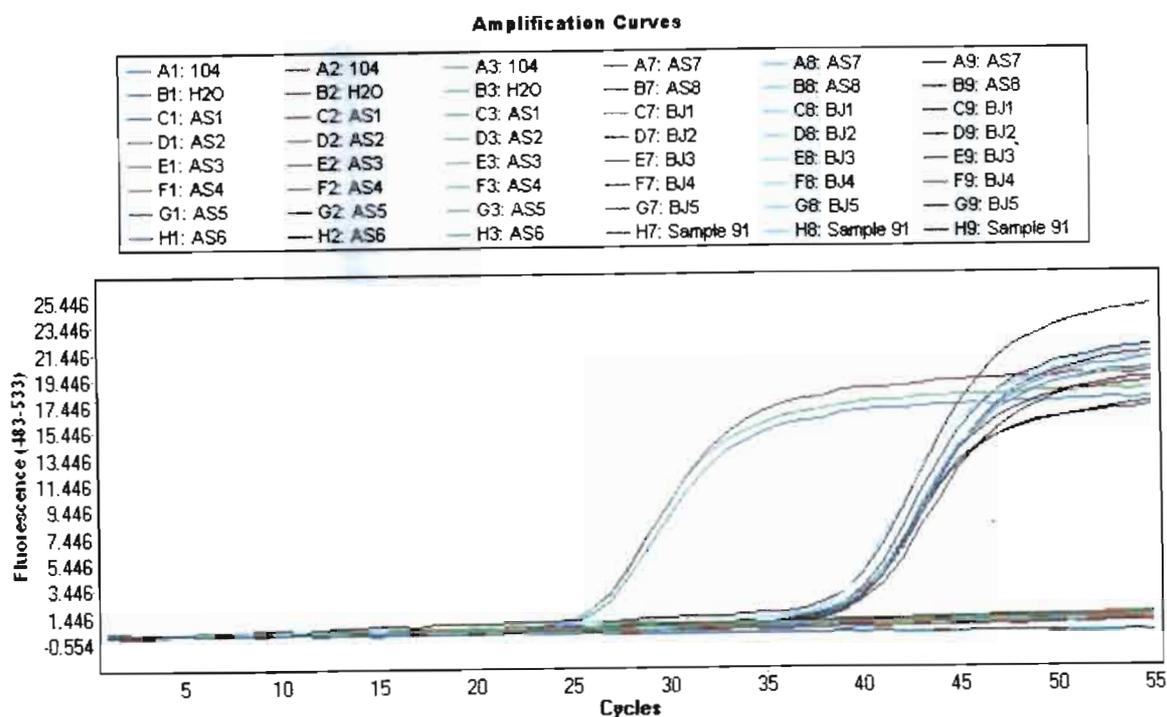


Figure 21 : Courbes d'amplification de BCR-ABL1(P210) de la première plaque
En abscisse le nombre de cycles et en ordonnée la fluorescence émise

Tableau X : Calcul des Cp P210 de la première plaque (Cp du calibrateur de la Gamme=25,96)

Identifiant	Type	Cp
10 ⁴	Calibrateur Contrôle+	26,02
10 ⁴	Calibrateur contrôle+	25,96
10 ⁴	Calibrateur contrôle+	25,72
AS7	Inconnu	
AS7	Inconnu	
AS7	Inconnu	39,16
H ₂ O	Inconnu	
H ₂ O	Inconnu	
H ₂ O	Inconnu	
AS8	Inconnu	39,93
AS8	Inconnu	
AS8	Inconnu	
AS1	Inconnu	
AS1	Inconnu	
AS1	Inconnu	39,61
BJ1	Inconnu	
BJ1	Inconnu	
BJ1	Inconnu	39,49
AS2	Inconnu	39,59
AS2	Inconnu	
AS1	Inconnu	
BJ2	Inconnu	
BJ2	Inconnu	
BJ2	Inconnu	39,35
AS3	Inconnu	
AS3	Inconnu	
AS3	Inconnu	
BJ3	Inconnu	39,30
BJ3	Inconnu	38,54
BJ3	Inconnu	
AS4	Inconnu	
AS4	Inconnu	
AS4	Inconnu	
BJ4	Inconnu	39,78

BJ4	Inconnu	39,85
BJ4	Inconnu	
AS5	Inconnu	
AS5	Inconnu	
AS5	Inconnu	
BJ5	Inconnu	39,50
BJ5	Inconnu	
BJ5	Inconnu	
AS6	Inconnu	39,61
AS6	Inconnu	
AS6	Inconnu	
Echantillon 91	Inconnu	
Echantillon 91	Inconnu	
Echantillon 91	Inconnu	

L'absence de valeur de Cp pour un échantillon signifie une absence de matrice à amplifier ?

Tableau XI : Copies P210 de la première plaque

Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard	Statut
10 ⁴	Standard	26,02	9,56E3	1,00E4	
10 ⁴	Standard	25,96	1,00E4	1,00E4	
10 ⁴	Standard	25,78	1,17E4	1,00E4	
AS7	Inconnu	39,16	3,79E0		E
AS7	Inconnu				
AS7	Inconnu				
H ₂ O	Inconnu				
H ₂ O	Inconnu				
H ₂ O	Inconnu				
AS8	Inconnu				
AS8	Inconnu	39,93	2,88E0		E
AS8	Inconnu				
AS1	Inconnu				
AS1	Inconnu				
AS1	Inconnu	39,61	3,23E0		E
BJ1	Inconnu	39,49	3,37E0		

BJ1	Inconnu				
BJ1	Inconnu				
AS2	Inconnu	39,59	3,25E0		E
AS2	Inconnu				
AS2	Inconnu				
BJ2	Inconnu				
BJ2	Inconnu				
BJ2	Inconnu	39,35	3,54E0		
AS3	Inconnu				
AS3	Inconnu				
AS3	Inconnu				
BJ3	Inconnu	39,30	3,61E0		E
BJ3	Inconnu	38,54	4,84E0		E
BJ3	Inconnu				
AS4	Inconnu				
AS4	Inconnu				
AS4	Inconnu				
BJ4	Inconnu	39,78	3,04E0		
BJ4	Inconnu	39,85	2,97E0		
BJ4	Inconnu				
AS5	Inconnu				
AS5	Inconnu				
AS5	Inconnu				
BJ5	Inconnu	39,50	3,36E0		E
BJ5	Inconnu				
BJ5	Inconnu				
AS6	Inconnu	39,61	3,23E0		
AS6	Inconnu				
AS6	Inconnu				
Echantillon 91					
Echantillon 91					
Echantillon 91					

E signifie que le nombre de copies a été extrapolé à partir de la courbe d'amplification.

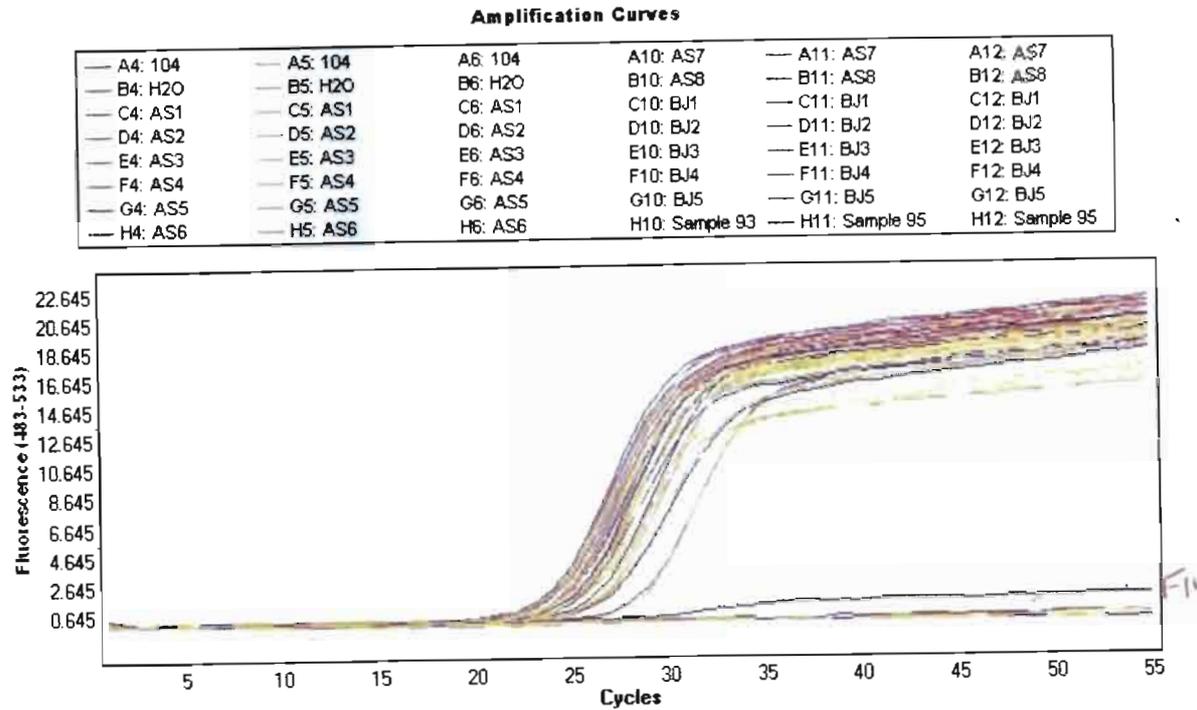


Figure 22 : Courbes d'amplification d'ABL1 de la première plaque

Tableau XII : Calcul Cp d'ABL1 de la première plaque Cp du calibrateur de la Gamme=28,17

Identifiant	CP	Type
Cal 10 ⁴	28,30	Contrôle positif
Cal 10 ⁴	28,23	Contrôle positif
Cal 10 ⁴	28,30	Contrôle positif
AS1	23,81	Inconnu
AS1	23,80	Inconnu
AS1	23,84	Inconnu
BJ1	26,07	Inconnu
BJ1	26,09	Inconnu
BJ1	26,13	Inconnu
AS2	23,74	Inconnu
AS2	23,73	Inconnu
AS2	23,74	Inconnu

BJ2	25,24	Inconnu
BJ2	25,31	Inconnu
BJ2	25,35	Inconnu
AS3	25,13	Inconnu
AS3	25,16	Inconnu
AS3	25,16	Inconnu
BJ3	24,56	Inconnu
BJ3	24,59	Inconnu
BJ3	24,64	Inconnu
AS4	24,47	Inconnu
AS4	24,52	Inconnu
AS4	24,54	Inconnu
BJ4	26,59	Inconnu
BJ4		Inconnu
BJ4	26,21	Inconnu
AS5	24,08	Inconnu
AS5	24,04	Inconnu
AS5	24,06	Inconnu
BJ5	24,90	Inconnu
BJ5	24,92	Inconnu
BJ5	24,98	Inconnu
AS6	24,15	Inconnu
AS6	24,21	Inconnu
AS6	24,17	Inconnu
H ₂ O	Inconnu	Contrôle négatif
H ₂ O	Inconnu	Contrôle négatif
H ₂ O	Inconnu	Contrôle négatif
AS7	26,75	Inconnu
AS7	26,75	Inconnu
AS7	26,72	Inconnu
AS8	25,28	Inconnu
AS8	25,28	Inconnu
AS8	25,28	Inconnu

Tableau XIII : Copies d'ABL1 de la première plaque

?= Le détecteur est incertain

E= extrapolated concentration in standard curve (concentration extrapolée sur la courbe standard)

Identifiant	Cp	Concentration	Standard	Status
CAL 104	28,30	9,79E3	1,00E4	
CAL 104	28,23	1,04E4	1,00E4	
CAL 104	28,28	1,00E4	1,00E4	
AS7	26,75	3,50E4	Inconnu	
AS7	26,75	3,49E4	Inconnu	
AS7	26,72	3,59E4	Inconnu	
H2O	Inconnu		Contrôle négatif	
H2O	Inconnu		Contrôle négatif	
H2O	Inconnu		Contrôle négatif	
AS8	25,28	1,16E5	Inconnu	E
AS8	25,28	1,17E5	Inconnu	E
AS8	25,28	1,17E5	Inconnu	E
AS1	23,81	3,88E5	Inconnu	E
AS1	23,80	3,92E5	Inconnu	E
AS1	23,84	3,80E5	Inconnu	E
BJ1	26,07	6,11E4	Inconnu	
BJ1	26,09	5,98E4	Inconnu	
BJ1	26,13	5,78E4	Inconnu	
AS2	23,74	4,12E5	Inconnu	E
AS2	23,73	4,14E5	Inconnu	E
AS2	23,74	4,12E5	Inconnu	E
BJ2	25,24	1,20E5	Inconnu	E

BJ2	25,31	1,13E5	Inconnu	E
BJ2	25,35	1,10E5	Inconnu	E
AS3	25,13	1,31E5	Inconnu	E
AS3	25,16	1,28E5	Inconnu	E
AS3	25,16	1,29E5	Inconnu	E
BJ3	24,56	2,10E5	Inconnu	E
BJ3	24,59	2,05E5	Inconnu	E
BJ3	24,64	1,97E5	Inconnu	E
AS4	24,47	2,25E5	Inconnu	E
AS4	24,52	2,17E5	Inconnu	E
AS4	24,54	2,13E5	Inconnu	E
BJ4	26,59	3,98E4	Inconnu	
BJ4				?
BJ4	26,21	5,43E4	Inconnu	E
AS5	24,08	3,12E5	Inconnu	E
AS5	24,04	3,21E5	Inconnu	E
AS5	24,06	3,17E5	Inconnu	E
BJ5	24,90	1,58E5	Inconnu	E
BJ5	24,92	1,56E5	Inconnu	E
BJ5	24,98	1,49E5	Inconnu	E
AS6	24,15	2,93E5	Inconnu	E
AS6	24,21	2,79E5	Inconnu	E
AS6	24,17	2,90E5	Inconnu	E
H2O			Contrôle négatif	
H2O			Contrôle négatif	
H2O			Contrôle négatif	

E signifie que le résultat a été extrapolé à partir des courbes d'amplification

1.1.2- Deuxième plaque (troisième et quatrième patient)

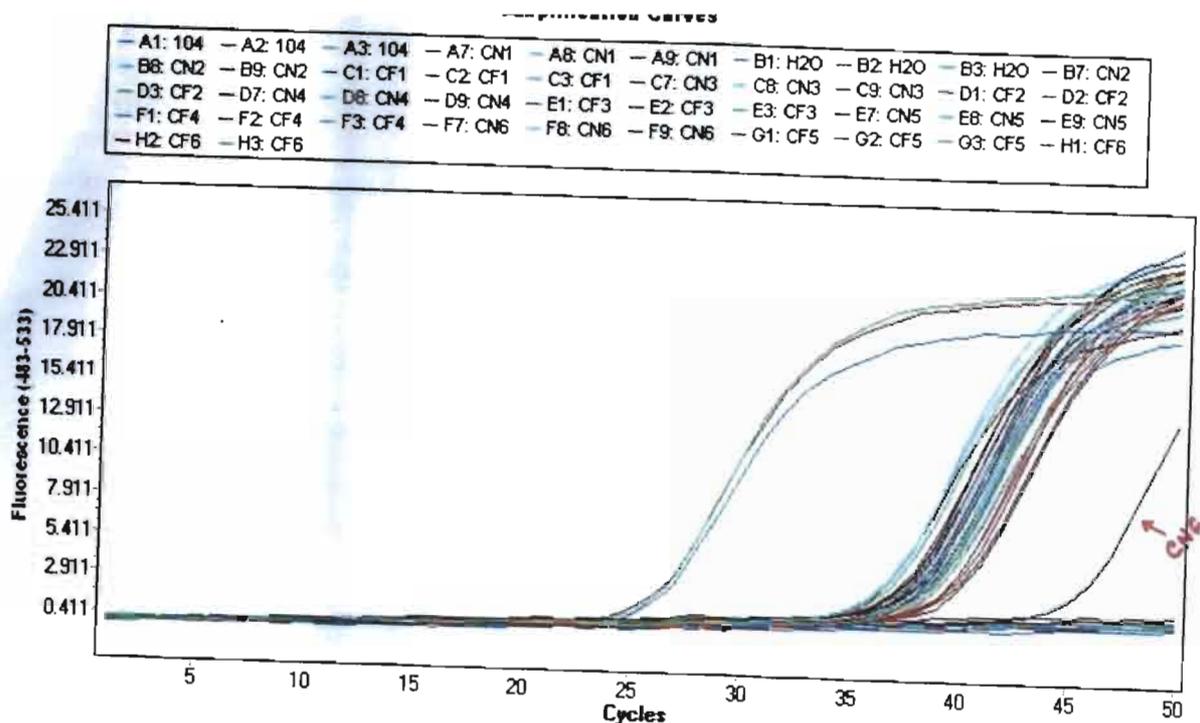


Figure 23 : Courbes d'amplification P210 de la deuxième plaque

Tableau XIV : Calcul des Cp de P210 de la deuxième plaque

identifiant	Type	Cp
10 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	28,30
10 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	28,24
10 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	28,27
CN1	Inconnu	23,18
CN1	Inconnu	23,13
C N1	Inconnu	23,13
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
CN2	Inconnu	23,80
CN2	Inconnu	23,77
CN2	Inconnu	23,81
CF1	Inconnu	23,30

CF1	Inconnu	23,18
CF1	Inconnu	23,45
CN3	Inconnu	24,22
CN3	Inconnu	24,13
CN3	Inconnu	24,12
CF2	Inconnu	24,22
CF2	Inconnu	24,34
CF2	Inconnu	24,50
CN4	Inconnu	23,87
CN4	Inconnu	23,92
CN4	Inconnu	23,99
CF3	Inconnu	25,51
CF3	Inconnu	25,51
CF3	Inconnu	25,59
CN5	Inconnu	24,18
CN5	Inconnu	24,15
CN5	Inconnu	24,21
CF4	Inconnu	24,71
CF4	Inconnu	24,70
CF4	Inconnu	24,81
CN6	Inconnu	23,88
CN6	Inconnu	24,03
CN6	Inconnu	24,05
CF5	Inconnu	23,92
CF5	Inconnu	23,92
CF5	Inconnu	23,94
CF6	Inconnu	23,95
CF6	Inconnu	24,13
CF6	Inconnu	24,14

P210 10⁴ représente à la fois le contrôle positif et le calibrateur.

Tableau XV : la concentration des Copies de P210 de la deuxième plaque

Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard	Statuts
10 ⁴	Standard	26,03	1,00E4	1,00E4	
10 ⁴	Standard	26,03	1.10E4	1,00E4	
10 ⁴	standard	26,05	9, 86E3	1,00E4	
CN1	Inconnu	35,86	1,36E1		
CN1	Inconnu	37,44	5,36E0		E
CN1	Inconnu	37,24	6,03E0		E
H ₂ O				00	
H ₂ O				00	
H ₂ O				00	
CN2	Inconnu	38,25	3,36E0		E
CN2	Inconnu	36,44	9,69E0		E
CN2	Inconnu	37,30	5,80E0		E
CF1	Inconnu	38,51	2,91E0		E
CF1	Inconnu	37,10	6,55E0		E
CF1	Inconnu	37,91	4,07E0		E
CN3	Inconnu	39,78	1,44E0		E
CN3	Inconnu	38,13	3,59E0		E
CN3	Inconnu	38,10	3,65E0		E
CF2	Inconnu	38,56	2,82E0		E
CF2	Inconnu	38,95	2,27E0		E
CF2	Inconnu	38,48	2,96E0		E
CN4	Inconnu				
CN4	Inconnu				
CN4	Inconnu	38,03	3,80E0		E

CF3	Inconnu				
CF3	Inconnu	39,67	1,53E0		E
CF3	Inconnu	38,71	2,59E0		E
CN5	Inconnu				
CN5	Inconnu	36,22	1,11E1		E
CN5	Inconnu	37,32	5,75E0		E
CF4	Inconnu				
CF4	Inconnu	39,06	2,13E0		E
CF4	Inconnu				
CN6	Inconnu	39,73	1,48E0		E
CN6	Inconnu	38,24	3,37E0		>.E
CN6	Inconnu	45,00	1,15E-1		E
CF5	Inconnu	37,59	4,90E0		E
CF5	Inconnu	37,55	5,03E0		E
CF5	Inconnu	36,74	8,08E0		E
CF6	Inconnu	37,61	4,84 ^{E0}		E
CF6	Inconnu	37,73	4,51 ^{E0}		E
CF6	Inconnu	38,74	2,55 ^{E0}		E

Inconnu parce que l'on ne connaît pas le nombre de matrices dans l'échantillon, le Cp et le nombre de copies attendu. E = extrapolé à partir des courbes d'amplification

Amplification Curves

A4: 10 ⁴	A5: 10 ⁴	A6: 10 ⁴	A10: CN1	A11: CN1	A12: CN1	B4: H ₂ O	B5: H ₂ O	B6: H ₂ O
B10: CN2	B11: CN2	B12: CN2	C4: CF1	C5: CF1	C6: CF1	C10: CN3	C11: CN3	C12: CN3
D4: CF2	D5: CF2	D6: CF2	D10: CN4	D11: CN4	D12: CN4	E4: CF3	E5: CF3	E6: CF3
E10: CN5	E11: CN5	E12: CN5	F4: CF4	F5: CF4	F6: CF4	F10: CN6	F11: CN6	F12: CN6
G4: CF5	G5: CF5	G6: CF5	H4: CF6	H5: CF6	H6: CF6			

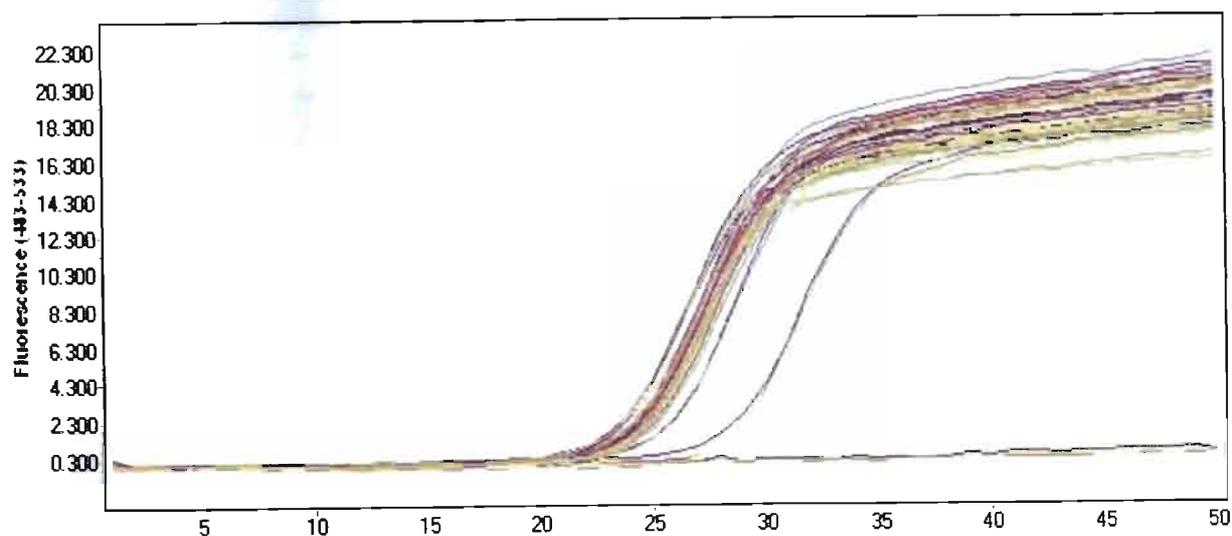


Figure 24 : Courbes amplification d'ABL1 de la deuxième plaque.

Les courbes sont parallèles

Tableau XVI : Calcul des Cp d'ABL1 de la deuxième plaque.

La différence entre les Cp est inférieure à 0,5.

Identifiant	Type	Cp
10 ⁴	Contrôle positif calibrateur	26,03
10 ⁴	Contrôle positif calibrateur	26,03
10 ⁴	Contrôle positif calibrateur	26,05
CN1	Inconnu	35,86
CN1	Inconnu	37,44
CN1	Inconnu	37,24
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
CN2	Inconnu	38,25
CN2	Inconnu	36,44
CN2	Inconnu	37,30

CF1	Inconnu	38,51
CF1	Inconnu	37,10
CF1	Inconnu	37,91
CN3	Inconnu	39,78
CN3	Inconnu	38,13
CN3	Inconnu	38,10
CF2	Inconnu	38,56
CF2	Inconnu	38,95
CF2	Inconnu	38,48
CN4	Inconnu	
CN4	Inconnu	
CN4	Inconnu	38,03
CF3	Inconnu	
CF3	Inconnu	39,67
CF3	Inconnu	38,71
CN5	Inconnu	
CN5	Inconnu	36,22
CN5	Inconnu	37,32
CF4	Inconnu	
CF4	Inconnu	39,06
CF4	Inconnu	
CN6	Inconnu	39,73
CN6	Inconnu	38,24
CN6	Inconnu	45,00
CF5	Inconnu	37,59
CF5	Inconnu	37,55
CF5	Inconnu	36,74
CF6	Inconnu	37,61
CF6	Inconnu	37,73
CF6	Inconnu	38,74

Tableau XVII : concentration des Copies d'ABL1 de la deuxième plaque

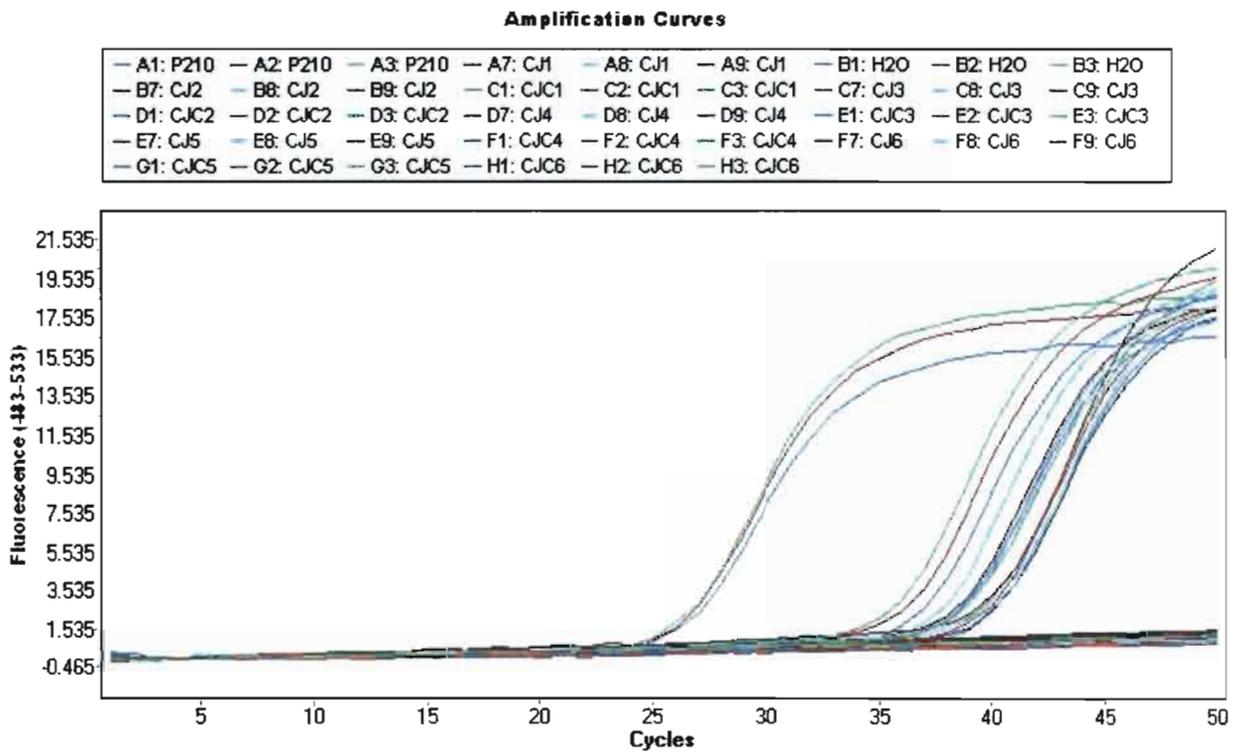
Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard
10 ⁴	CAL	28,30	9,82E3	1,00E4
10 ⁴	CAL	28,24	1,01E4	1,00E4
10 ⁴	CAL	28,27	1,00E4	1,00E4
CN1	Inconnu	23,18	2,84E5	E
CN1	Inconnu	23,13	2,94E5	E
CN1	Inconnu	23,13	2,95E5	E
H ₂ O	C Neg			
H ₂ O	C Neg			
H ₂ O	C Neg			
CN2	Inconnu	23,80	1,90E5	E
CN2	Inconnu	23,77	1,93E5	E
CN2	Inconnu	23,82	1,89E5	E
CF1	Inconnu	23,30	2,63E5	E
CF1	Inconnu	23,18	2,85E5	E
CF1	Inconnu	23,45	2,39E5	E
CN3	Inconnu	24,22	1,44E5	E
CN3	Inconnu	24,13	1,52E5	E
CN3	Inconnu	24,12	1,54E5	E
CF2	Inconnu	24,22	1,43E5	E
CF2	Inconnu	24,34	1,33E5	E
CF2	Inconnu	24,50	1,20E5	E
CN4	Inconnu	23,87	1,81E5	E
CN4	Inconnu	23,92	1,75E5	E

CN4	Inconnu	23,99	1,68E5	E
CF3	Inconnu	25,51	6,15E4	E
CF3	Inconnu	25,51	6,14E4	E
CF3	Inconnu	25,59	5,85E4	E
CN5	Inconnu	24,18	1,48E5	E
CN5	Inconnu	24,15	1,51E5	E
CN5	Inconnu	24,21	1,45E5	E
CF4	Inconnu	24,71	1,04E5	E
CF4	Inconnu	24,70	1,05E5	E
CF4	Inconnu	24,81	9,73E4	E
CN6	Inconnu	23,88	1,80E5	E
CN6	Inconnu	24,03	1,63E5	E
CN6	Inconnu	24,05	1,61E5	E
CF5	Inconnu	23,92	1,75E5	E
CF5	Inconnu	23,92	1,75E5	E
CF5	Inconnu	23,94	1,73E5	E
CF6	Inconnu	23,95	1,71E5	E
CF6	Inconnu	24,13	1,52E5	E
CF6	Inconnu	24,14	1,51E5	E

E= résultat extrapolé à partir des courbes d'amplification. CAL=calibrateur

C. Neg=contrôle négatif

1.1.3- Troisième Plaque (cinquième et sixième patient)



ubordinate for ABL483-533p210 (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Figure 25 : Courbes d'amplification deP210 de la troisième plaque.
Elles sont parallèles

Tableau XVIII : Calcul des Cp de P210 de la troisième plaque

Identifiant	Type	Cp
P210	Contrôle positif/calibrateur	26,16
P210	Contrôle positif/calibrateur	26,08
P210	Contrôle positif/calibrateur	26,06
CJ1	Inconnu	
CJ1	Inconnu	
CJ1	Inconnu	39,80
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
CJ2	Inconnu	

CJ2	Inconnu	
CJ2	Inconnu	
CJC1	Inconnu	36,60
CJC1	Inconnu	36,03
CJC1	Inconnu	36,55
CJ3	Inconnu	38,25
CJ3	Inconnu	
CJ3	Inconnu	
CJC2	Inconnu	38,52
CJC2	Inconnu	
CJC2	Inconnu	39,65
CJ4	Inconnu	
CJ4	Inconnu	37,49
CJ4	Inconnu	
CJC3	Inconnu	39,67
CJC3	Inconnu	
CJC3	Inconnu	
CJ5	Inconnu	39,98
CJ5	Inconnu	38,27
CJ5	Inconnu	
CJC4	Inconnu	38,19
CJC4	Inconnu	
CJC4	Inconnu	38,65
CJ6	Inconnu	
CJ6	Inconnu	39,89
CJ6	Inconnu	
CJC5	Inconnu	
CJC5	Inconnu	39,62
CJC5	Inconnu	
CJC6	Inconnu	
CJC6	Inconnu	
CJC6	Inconnu	

Tableau XIX : Concentration des Copies de P210 de la troisième plaque

Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard	Statuts
P210	Standard	26,16	9,48E3	1,00E4	
P210	Standard	26,08	1,00E4	1,00E4	
P210	Standard	26,06	1,02E4	1,00E4	
CJ1	Inconnu				
CJ1	Inconnu				
CJ1	Inconnu	39,80	3,28E0		E
H ₂ O	C Neg				
H ₂ O	C Neg				
H ₂ O	CNeg				
CJ2	Inconnu				
CJ2	Inconnu				
CJ2	Inconnu				
CJC1	Inconnu	36,60	1,25E1		
CJC1	Inconnu	36,03	1,67E1		
CJC1	Inconnu	35,55	2,15E1		
CJ3	Inconnu	38,25	5,91E0		E
CJ3	Inconnu				
CJ3	Inconnu				
CJC2	Inconnu	38,52	5,29E0		E
CJC2	Inconnu				
CJC2	Inconnu	39,65	3,46E0		E
CJ4	Inconnu				
CJ4	Inconnu	37,49	8,20E0		E
CJ4	Inconnu				
CJC3	Inconnu	39,67	3,43E0		E

CJC3	Inconnu				
CJC3	Inconnu				
CJ5	Inconnu	39,98	3,09E0		E
CJ5	Inconnu	38,27	5,86E0		E
CJ5	Inconnu				
CJC4	Inconnu	38,19	6,07E0		E
CJC4	Inconnu				
CJC4	Inconnu	38,65	5,02E0		E
CJ6	Inconnu				
CJ6	Inconnu	39,89	3,18E0		E
CJ6	Inconnu				
CJC5	Inconnu				
CJC5	Inconnu	39,62	3,49E0		E
CJC5	Inconnu				
P210	Inconnu				
P210	Inconnu				
P210	Inconnu				
CJC6	Inconnu				
CJC6	Inconnu				
CJC6	Inconnu				
P210	Inconnu				
P210	Inconnu				
P210	Inconnu				

E=résultat extrapolé les cases vides signifient qu'il n'y pas de matrice à amplifier et donc pas de copies détectées.

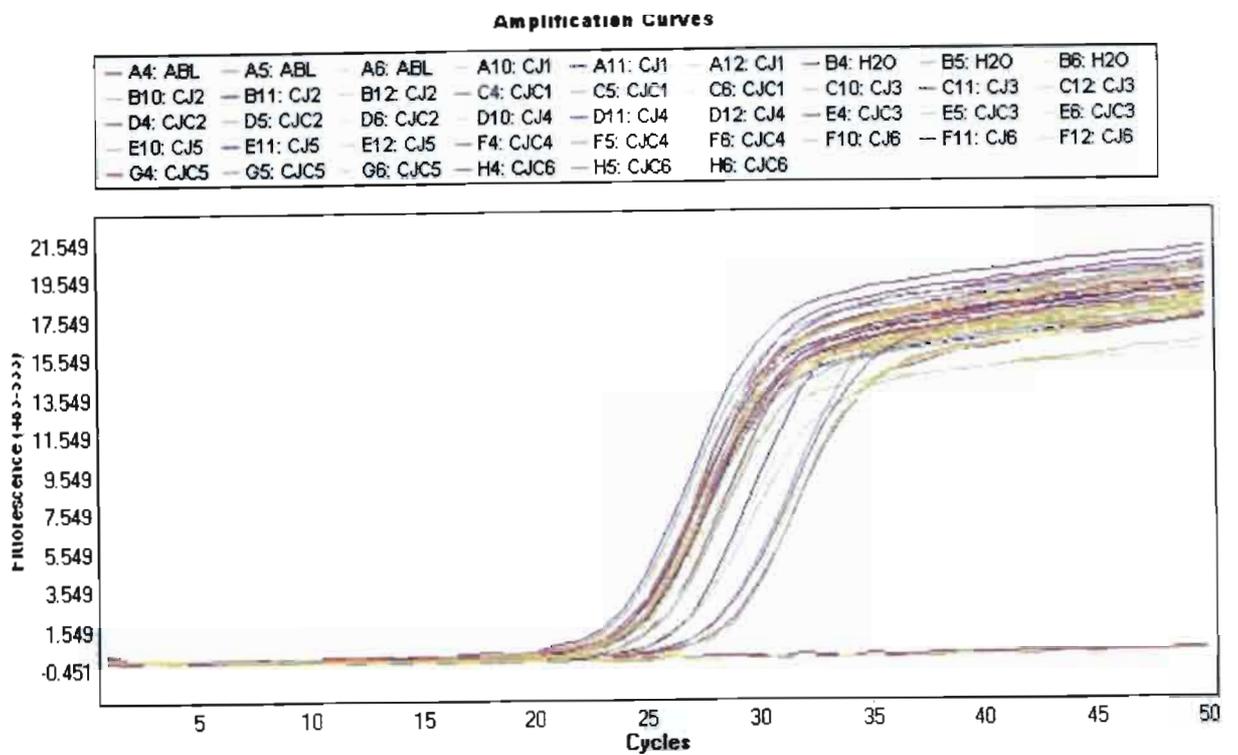


Figure 26 : Courbes d'amplification d'ABL1 de la troisième plaque

Tableau XX : Calcul Cp d'ABL1 de la troisième plaque

Identifiant	Type	Cp
ABL1	Contrôle positif/calibrateur	28,42
ABL1	Contrôle positif/calibrateur	28,36
ABL1	Contrôle positif/calibrateur	28,48
CJ1	Inconnu	24,46
CJ1	Inconnu	24,44
CJ1	Inconnu	24,55
H2O	Contrôle négatif	
H2O	Contrôle négatif	
H2O	Contrôle négatif	
CJ2	Inconnu	26,33
CJ2	Inconnu	26,34
CJ2	Inconnu	26,49

CJC1	Inconnu	24,09
CJC1	Inconnu	24,16
CJC1	Inconnu	24,13
CJ3	Inconnu	24,08
CJ3	Inconnu	24,07
CJ3	Inconnu	24,17
CJC2	Inconnu	23,58
CJC2	Inconnu	23,60
CJC2	Inconnu	23,71
CJ4	Inconnu	24,01
CJ4	Inconnu	24,06
CJ4	Inconnu	24,02
CJC3	Inconnu	24,70
CJC3	Inconnu	24,58
CJC3	Inconnu	24,69
CJ5	Inconnu	24,54
CJ5	Inconnu	24,59
CJ5	Inconnu	24,61
CJC4	Inconnu	24,33
CJC4	Inconnu	24,25
CJC4	Inconnu	24,34
CJ6	Inconnu	24,48
CJ6	Inconnu	24,55
CJ6	Inconnu	24,57
CJC5	Inconnu	28,03
CJC5	Inconnu	28,02
CJC5	Inconnu	27,96
CJC6	Inconnu	25,24
CJC6	Inconnu	25,20
CJC6	Inconnu	25,21

Tableau XXI : concentration des Copies d'ABL1 de la troisième plaque

Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard	Statuts
ABL	Standard	28,42	1,00E4	1,00E4	
ABL	Standard	28,36	1,04E4	1,00E4	
ABL	Standard	28,48	9,61E3	1,00E4	
CJ1	Inconnu	24,46	1,36E5		E
CJ1	Inconnu	24,44	1,38E5		E
CJ1	Inconnu	24,55	1,27E5		E
H2O	C. Neg				
H2O	C. Neg				
H2O	C. Neg				
CJ2	Inconnu	26,33	3,95E4		
CJ2	Inconnu	26,34	3,92E4		
CJ2	Inconnu	26,49	3,56E4		
CJC1	Inconnu	24,09	1,72E5		E
CJC1	Inconnu	24,16	1,65E5		E
CJC1	Inconnu	24,13	1,68E5		E
CJ3	Inconnu	24,08	1,74E5		E
CJ3	Inconnu	24,07	1,75E5		E
CJ3	Inconnu	24,17	1,65E5		E
CJC2	Inconnu	23,58	2,42E5		E
CJC2	Inconnu	23,60	2,39E5		E
CJC2	Inconnu	23,71	2,22E5		E
CJ4	Inconnu	24,01	1,82E5		E
CJ4	Inconnu	24,06	1,77E5		E
CJ4	Inconnu	24,02	1,81E5		E

CJC3	Inconnu	24,70	1,16E5		E
CJC3	Inconnu	24,58	1,26E5		E
CJC3	Inconnu	24,69	1,17E5		E
CJ5	Inconnu	24,54	1,28E5		E
CJ5	Inconnu	24,59	1,25E5		E
CJ5	Inconnu	24,61	1,22E5		E
CJC4	Inconnu	24,33	1,48E5		E
CJC4	Inconnu	24,25	1,55E5		E
CJC4	Inconnu	24,34	1,46E5		E
CJ6	Inconnu	24,48	1,34E5		E
CJ6	Inconnu	24,55	1,28E5		E
CJ6	Inconnu	24,57	1,26E5		E
CJC5	Inconnu	28,03	1,29E4		E
CJC5	Inconnu	28,02	1,30E4		E
CJC5	Inconnu	27,96	1,35E4		
Echantillon 82	C. Neg				
Echantillon 83	C. Neg				
Echantillon 84	C. Neg				
CJC6	Inconnu	25,24	8,11E5		
CJC6	Inconnu	25,20	8,31E5		
CJC6	Inconnu	25,21	8,28E5		

1.1.4- Plaque (septième patient et reprise de deux prélèvements précédents)

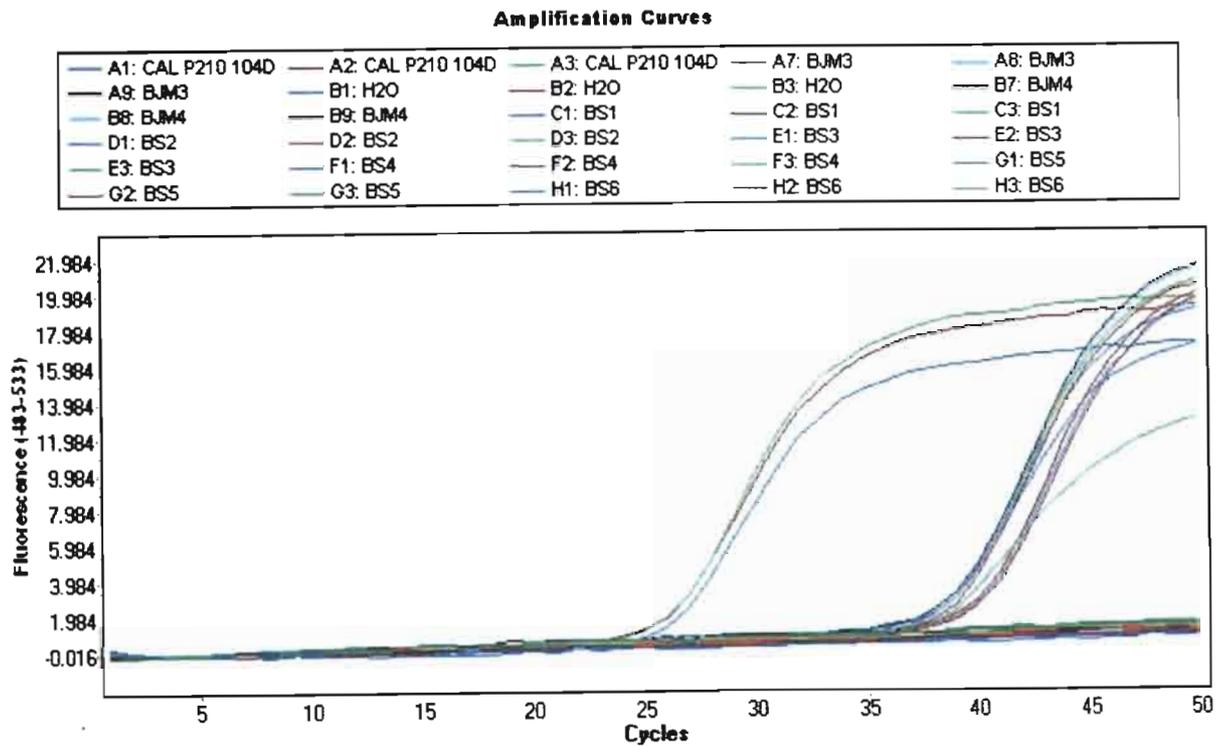


Figure 27 : Courbes d'amplification de P210 de la quatrième plaque

Tableau XXII : Calcul des Cp de P210 de la quatrième plaque

Identifiant	Type	Cp
Cal P21010 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	26,09
Cal P21010 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	26,00
Cal P21010 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	25,98
BJM3	Inconnu	
BJM3	Inconnu	
BJM3	Inconnu	
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	

H ₂ O	Contrôle négatif	
BJM4	Inconnu	
BJM4	Inconnu	39,00
BJM4	Inconnu	38,84
BS1	Inconnu	38,32
BS1	Inconnu	
BS1	Inconnu	38,90
BS2	Inconnu	38,72
BS2	Inconnu	38,89
BS2	Inconnu	
BS3	Inconnu	39,88
BS3	Inconnu	
BS3	Inconnu	
BS4	Inconnu	39,94
BS4	Inconnu	
BS4	Inconnu	
BS5	Inconnu	
BS5	Inconnu	40,09
BS5	Inconnu	
BS6	Inconnu	
BS6	Inconnu	
BS6	Inconnu	38,23

Tableau XXIII : concentration des Copies de P210 de la quatrième plaque

Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard	Statut
Cal P210 10 ⁴	Standard	26,09	9,42E3	1,00E4	
Cal P210 10 ⁴	Standard	26,00	1,00E4	1,00E4	
Cal P210 10 ⁴	Standard	25,98	1,01E4	1,00E4	
BJM3	Inconnu				
BJM3	Inconnu				
BJM3	Inconnu				
H ₂ O	C. Neg				
H ₂ O	C. Neg				
H ₂ O	C. Neg				
BJM4	Inconnu				
BJM4	Inconnu	39,00	4,14E0		E
BJM4	Inconnu	38,84	4,40E0		E
BS1	Inconnu	38,32	5,42E0		E
BS1	Inconnu				
BS1	Inconnu	38,90	4,31E0		E
BS2	Inconnu	38,72	4,61E0		E
BS2	Inconnu	38,89	4,32E0		E
BS2	Inconnu				
BS3	Inconnu				
BS3	Inconnu	39,88	3,02E0		E
BS3	Inconnu				
BS4	Inconnu	39,94	2,95E0		E
BS4	Inconnu				
BS4	Inconnu				
BS5	Inconnu				
BS5	Inconnu	40,09	2,81E0		E
BS5	Inconnu				
BS6	Inconnu				
BS6	Inconnu				
BS6	Inconnu	38,23	5,63E0		E

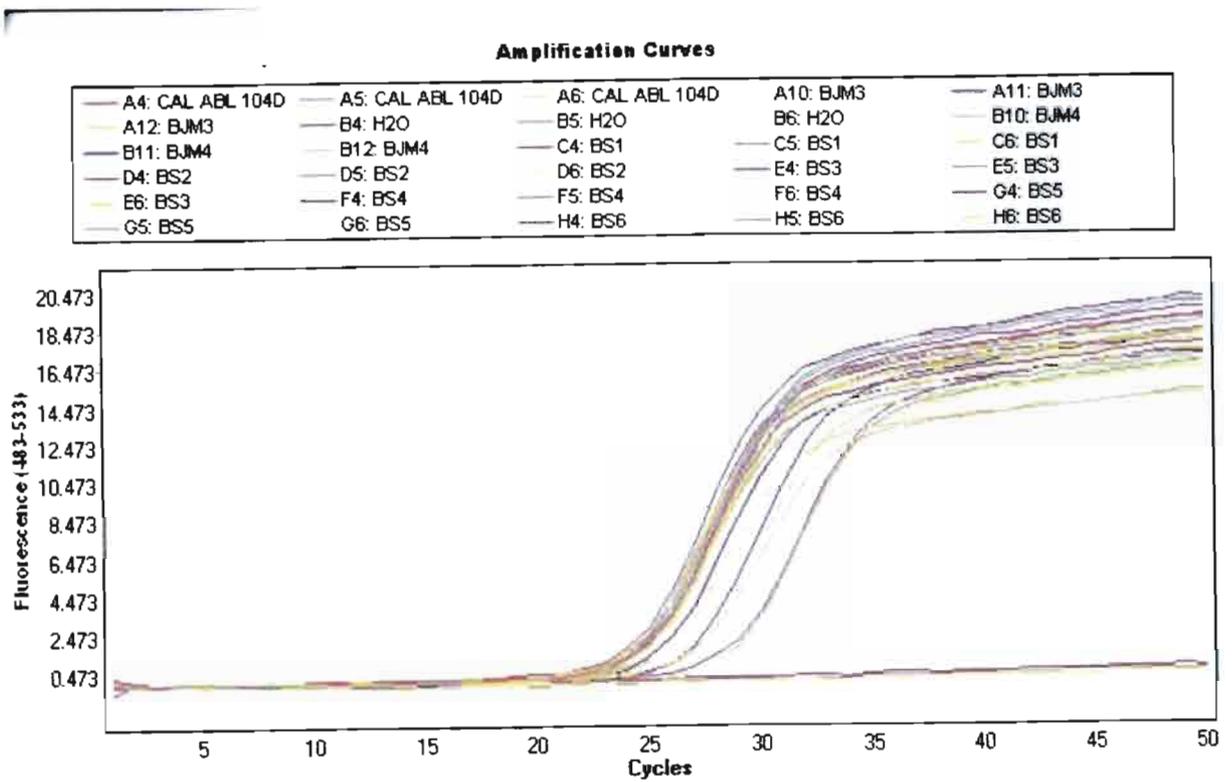


Figure 28 : Courbes d'amplification d'ABL1 de la quatrième plaque

Tableau XXIV : Calcul des Cp d'ABL1 de la quatrième plaque

Identifiant	Type	Cp
Cal ABL ₁ 10 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	28,51
Cal ABL ₁ 10 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	28,48
Cal ABL ₁ 10 ⁴	Contrôle positif/calibrateur	28,54
BJM3	Inconnu	25,19
BJM3	Inconnu	25,22
BJM3	Inconnu	25,29
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
H ₂ O	Contrôle négatif	
BJM4	Inconnu	26,69
BJM4	Inconnu	26,66

Tableau XXV : concentration des Copies d'ABL1 de la quatrième plaque

Identifiant	Type	Cp	Concentration	Standard	Status
Cal ABL1 10 ⁴	Standard	28,51	1,00E4	1,00E4	
Cal ABL1 10 ⁴	Standard	28,48	1,02E4	1,00E4	
Cal ABL1 10 ⁴	Standard	28,54	9,79E4	1,00E4	
BJM3	Inconnu	25,19	8,87E4		
BJM3	Inconnu	25,22	8,70E4		
BJM3	Inconnu	25,29	8,31E4		
H ₂ O	C. Neg				
H ₂ O	C. Neg				
H ₂ O	C. Neg				
BJM4	Inconnu	26,69	3,30E4		
BJM4	Inconnu	26,66	3,36E4		
BJM4	Inconnu	26,71	3,26E4		
BS1	Inconnu	24,84	1,12E5		E
BS1	Inconnu	24,81	1,14E5		E
BS1	Inconnu	24,82	1,13E5		E
BS2	Inconnu	24,22	1,68E5		E
BS2	Inconnu	24,22	1,68E5		E
BS2	Inconnu	24,30	1,60E5		E
BS3	Inconnu	24,73	1,20E5		E
BS3	Inconnu	24,76	1,18E5		E
BS3	Inconnu	24,81	1,14E5		E
BS4	Inconnu	24,31	1,59E5		E
BS4	Inconnu	24,28	1,61E5		E
BS4	Inconnu	24,30	1,60E5		E
BS5	Inconnu	24,66	1,26E5		E
BS5	Inconnu	24,63	1,28E5		E
BS5	Inconnu	24,67	1,25E5		E
BS6	Inconnu	24,59	1,31E5		E
BS6	Inconnu	24,61	1,30E5		E
BS6	Inconnu	24,69	1,24E5		E

BJM4	Inconnu	26,71
BS1	Inconnu	24,84
BS1	Inconnu	24,81
BS1	Inconnu	24,82
BS2	Inconnu	24,22
BS2	Inconnu	24,22
BS2	Inconnu	24,30
BS3	Inconnu	24,73
BS3	Inconnu	24,76
BS3	Inconnu	24,81
BS4	Inconnu	24,31
BS4	Inconnu	24,28
BS4	Inconnu	24,30
BS5	Inconnu	24,66
BS5	Inconnu	24,63
BS5	Inconnu	24,67
BS6	Inconnu	24,59
BS6	Inconnu	24,61
BS6	Inconnu	24,69

1.1.5- Récapitulatif des quatre plaques

Tableau XXVI : Récapitulatif des résultats des Sept patients avec interprétation.

Code	Date RQ	Rendu	Caussement			P210					ABL1								
			Old	New1	New3	P210_1	P210_2	P210_3	Moy_P210x2	Moy_P210x3	ABL1_1	ABL1_2	ABL1_3	Moy_ABL1x2	Moy_ABL1x3	Nx2	Nx3	Nx2_5	Nx3_5
3 AS1	150918_RQ_Salifo	NEG	NEG	NEG	NEG														
3 AS2	150918_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
4 AS3	150918_RQ_Salifo	NEG	NEG	NEG	NEG														
4 AS4	150918_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
4 AS5	150918_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
5 AS6	150918_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 AS7	150918_RQ_Salifo	NEG	NEG	NEG	NEG														
5 AS8	150918_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
3 BJ1	150918_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
3 BJ2	150918_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
4 BJ3	150925_rq_salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
4 BJ3*	150918_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	NEG	3,8	4,8		4,2										6,9E-06
4 BJ4	150925_rq_salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
4 BJ4*	150918_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	NEG	3	3		3,0										2,8E-05
5 BS1	150918_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 BS1	150925_rq_salifo	NEG	PNQ	NEG	NEG														
5 BS2*	150925_rq_salifo	PNQ	PNQ	POS	NEG	4,6	4,3		4,5										9,0E-06
5 BS3	150925_rq_salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 BS4	150925_rq_salifo	NEG	PNQ	NEG	NEG														
5 BS5	150925_rq_salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 BS6	150925_rq_salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
4 CF1	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	POS	2,9	6,6	4,1	4,8	4,5									1,7E-05
4 CF2	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	POS	2,8	2,3	3	2,6	2,7									2,0E-05
5 CF3	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 CF4	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 CF5	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	POS	4,9	5	8,1	5,0	6									1,4E-05
5 CF6	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	POS	4,8	4,5	2,6	4,7	4,0									8,5E-06
4 CJ1	150922_RQ_Salifo	NEG	NEG	NEG	NEG														
4 CJ2	150922_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
4 CJ3	150922_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
5 CJ4	150922_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
5 CJ5*	150922_RQ_Salifo	NEG	PNQ	POS	NEG	5,1	5,9		4,5										1,2E-05
5 CJ6	150922_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
13 CJC1	150922_RQ_Salifo	POS	PNQ	POS	POS	12,5	16,7	21,5	14,6	16,9									1,0E-04
13 CJC2	150922_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
14 CJC3	150922_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
14 CJC4	150922_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
15 CJC5	150922_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
15 CJC6	150922_RQ_Salifo	NEG	NEG	NEG	NEG														
15 CN1	150921_RQ_Salifo	POS	PNQ	POS	POS	13,8	5,4	6	9,6	8,4									1,3E-05
15 CN2	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	POS	3,4	9,7	5,8	6,6	6,3									1,2E-05
15 CN3	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	POS	POS	1,4	3,6	3,7	2,5	2,9									1,3E-05
15 CN4	150921_RQ_Salifo	PNQ	NEG	NEG	NEG														
15 CN5	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG														
15 CN6*	150921_RQ_Salifo	PNQ	PNQ	NEG	NEG	1,4	1,4		2,5										4,9E-06

Old = interprétation traditionnelle faite par le laboratoire pour des analyses faite en duplicat et 45 cycles. **New2** = nouvelle interprétation si l'analyse est faite en duplicat à 50 cycles : **NEG** = NEGATIF si les deux puits sont négatifs, **Pos** = positif si deux puits positifs, **pnq** = positif non quantifiable (pnq) si un puit est positif **New3** = nouvelle interprétation si l'analyse est faite en triplicat : **NEG** si tous les trois puits sont négatifs ou les deux premiers puits négatifs. **Positif (Pos)** si les trois puits sont positifs. **Positif non quantifiable (pnq)** si un puit est positif. **P210_1** = concentration de P210 dans le premier puit en triplicat ; **P210_2**= concentration de P210 dans le deuxième puit si l'analyse est faite en triplicat ; **P210_3**=concentrations de P210 dans le troisième puit si l'analyse est faite en triplicat. **Moy_P210 x 2** = moyenne de P210_2 = moyenne de P210 dans les deux premiers puits en triplicat **Moy_P210 x 3** = moyenne de p210 dans les trois puits en triplicat. **ABL1 1** = concentration d'ABL1 dans le premier puit **ABL1 2** = concentration d'ABL1 dans les deuxième puit **ABL1 3** = concentration d'ABL1 dans le troisième puit **Moy_ABL1 x 2** = moyenne de ABL1 dans les deux premiers puits. **Moy_ABL1 x 3** = moyenne de ABL1 dans les trois

puits en triplicat $RATIO : \% \times 2 = (P210_1 + P210_2 / ABL1_1 + ABL1_2) \times 100 ; \% \times 3 = (P210_1 + P210_2 + P210_3 / ABL1_1 + ABL1_2 + ABL1_3) \times 100$

$\% \times 2_{IS} = \% \times 2 \times CF$ $\% \times 3_{IS} = \% \times 3 \times CF$ CF (facteur de conversion ou factor conversion) IS (international scale ou échelle internationale).

L'analyse des résultats rendus en antériorité pour chacun des 45 prélèvements montre qu'il y a huit cas qui étaient négatifs, deux cas positifs et vingt cinq positifs non quantifiables.

Lorsque l'interprétation des résultats des quarante cinq prélèvements analysés sous cinquante cycles de PCR et en triplicat, est faite selon la méthode traditionnelle du laboratoire ; le résultat est le suivant :

- en duplicat (deux premiers puits) il y a treize [13] cas positif et trente deux [32] cas négatifs ;
- en triplicat (on analyse tous les trois puits d'un même échantillon), il y a huit cas positifs et trente sept cas négatif.

Les résultats rendus aux patients ne sont pas les mêmes si l'examen est fait sous quarante cinq cycles et cinquante cycles.

Il existe les différentes présentations suivantes pour le même échantillon :

Tableau XXVII : comparaison des résultats en fonction du nombre de réplicats à cinquante cycles (interprétation traditionnelle du laboratoire) l'interprétation ici est le type de résultat rendu au patient.

Antériorité à 45 cycles	Quarante cinq cycles en duplicat	Cinquante cycles en duplicat	Cinquante cycles en triplicat
Négatif (Neg)	Neg	Neg	Neg
Positif non quantifiable (pnq)	Pnq	Neg	Neg
Neg	Pnq	Neg	Neg
Positif (Pos)	Pnq	Pos	Pos
Pnq	Neg	Neg	Neg

A cinquante cycles selon que le calcul soit fait avec les deux premiers puits (duplicat) ou avec les trois puits (triplicat), l'expression sur l'échelle internationale (IS) n'est pas toujours le même pour le même échantillon (tableau XXVI).

Le même échantillon positif en duplicat et en triplicat peuvent ne pas avoir la même expression IS (ligne 23) $6,3 \times 10^6$ en duplicat et $7,0 \times 10^6$ en triplicat.

Deux échantillons négatifs en duplicat et en triplicat peuvent ne pas avoir la même signification, il faut donc ne pas se limiter à l'absence de détection de BCR-ABL1 pour conclure le résultat. il faut inclure la quantité d'ABL1.

En appliquant les propositions du groupe d'experts EUTOS :

- le mode de calcul pour apprécier la réponse moléculaire ($[(\sum \text{gène cible} / \sum \text{gène de référence}) * CF * 100]$;
- que toute concentration d'ABL1 inférieur à 10000 copies rend la réponse moléculaire Inévaluable ;
- que tout résultat dont les copies de BCR-ABL1 sont indétectables avec moins de 100000 copies d'ABL1 ne peut être étiqueté RM5) ;
- et en appliquant la loi de Poisson pour les petits évènements pour la réponse moléculaire profonde (tout puit positif pour BCR-ABL1 ne peut avoir moins de trois copies) même le résultat est 1 ou 2, il faut prendre 3 et faire le calcul.

Aux quarante cinq prélèvements ci-dessus, on a les résultats suivants : la méthode traditionnelle d'appréciation du laboratoire de la réponse moléculaire profonde est qualitative alors que cette méthode donne des résultats quantitatifs.

Un échantillon peut ne pas avoir le même résultat testé en duplicat et triplicat (numéro 11687 2^{ème} ligne, numéro 2291 sixième ligne).

Un même échantillon détectable n'a pas toujours la même profondeur de réponse en duplicat et triplicat (numéro 10589 première ligne).

La même profondeur de réponse moléculaire n'a pas le même nombre de copies d'ABL1.

Deux échantillons négatifs n'ont pas la même valeur.

Le même échantillon n'a pas la même valeur sur l'échelle internationale en duplicat et triplicat.

1.1.5.1- Duplicat

Tableau XXVIII : Commentaire des résultats en duplicat

Code	RM duplicat IS	RM triplicat IS	Commentaires duplicat IS
348a	0	0	RM5 indétectable* avec 780000copies ABL1
348b	0	0	RM5 indétectable avec 826000 copies ABL1
348c	0	0	RM5 indétectable avec 259000 copies ABL1
348d	0	0	RM5 indétectable avec 442000 copies ABL1
348e	0	0	RM5 indétectable avec 633000 copies ABL1
348f	0	0	RM5 indétectable avec 572000 copies ABL1
348g	0	0	RM4,5 indétectable avec 69900copies ABL1
348h	0	0	RM5 indétectable avec 233000copies ABL1
8736a	0	0	RM5 indétectable avec120900 copies ABL1
8736b	0	0	RM5 indétectable avec 233000 copies ABL1
8736c	0	0	RM5 indétectable avec175700 copies ABL1
8736d	688193*10 ⁹	466667*10 ⁹	RM5 détectable* avec 415000 copies ABL1
8736e			RM4,5 indétectable avec 66600 copies ABL1
8736f	5125628*10 ⁹	2167906*10 ⁹	RM4, 5 détectable avec 39800 copies ABL1
8736g	0	0	RM5 indétectable avec 314000 copies ABL1
845a	0	0	RM5 indétectable avec 226000 copies ABL1
845b	900595*10 ⁹	610081*10 ⁹	RM5 détectable avec 336000 copies ABL1
845c	0	0	RM5 indétectable avec 238000 copies ABL1
845d	0	0	RM5 indétectable avec 320000 copies ABL1
845e	0	0	RM5 indétectable avec 254000 copies ABL1
845f	0	0	RM5 indétectable avec 261000 copies ABL1
10286a	589416*10 ⁹	587548*10 ⁹	RM5 détectable avec 548000 copies ABL1
10286b	628261*10 ⁹	695455*10 ⁹	RM5 détectable avec 276000 copies ABL1

10286c	0	0	RM5 indétectable avec 122900 copies ABL1
10286d	0	0	RM5 indétectable avec 209000 copies ABL1
10286e	96171*10 ⁸	117017*10 ⁸	RM4,5 détectable avec 209000 copies ABL1
10286f	97895*10 ⁸	88228*10 ⁸	RM5 détectable avec 323000 copies ABL1
11687a	0	0	RM5 indétectable avec 274000 copies ABL1
11687b	0	0	RM4, 5 Indétectable avec 78700 copies ABL1
11687c	0	0	RM5 indétectable avec 164000 copies ABL1
11687d	0	0	RM5 indétectable avec 181000 copies ABL1
11687e	0	0	RM5 indétectable avec 126000 copies ABL1
11687f	120949*10 ⁸		RM4,5 détectable avec 523000 copies ABL1
2291a	2945994*10 ⁹	341347*10 ⁸	détectable avec 168000 copies ABL1
2291b	0	0	RM5 indétectable avec 222000 copies ABL1
2291c	0	0	RM5 indétectable avec 117000 copies ABL1
2291d	0	0	RM5 indétectable avec 146000 copies ABL1
2291e	0	0	RM4 indétectable avec 13500 copies ABL1
2291f			RM4, 5 détectable avec 82800 copies ABL1
10589a	1129412*10 ⁹	98144*10 ⁸	RM4, 5 détectable avec 295000 copies ABL1
10589b	1162924*10 ⁹	112343*10 ⁸	RM4, 5 détectable avec 189000 copies ABL1
10589c	574324*10 ⁹	65733*10 ⁸	RM5 détectable avec 154000 copies ABL1
10589d	0	0	RM5 indétectable avec 168000 copies ABL1
10589e	0	0	RM5 indétectable avec 145000 copies ABL1
10589f	485714*10 ⁹	33056*10 ⁸	RM5 détectable avec 161000 copies ABL1

C'est BCR-ABL1 qui est détectable ou indétectable

Le commentaire est le résultat rendu au patient. C'est le gène cible BCR-ABL1 qui est indétectable ou détectable.

I.1.5.2- Triplicat

Tableau XXIX : Commentaire des résultats en triplicat.

Code	RM duplicat IS	RM triplicat IS	Commentaire triplicat
348a	0	0	RM5 indétectable avec 1160000 copies ABL1
348b	0	0	RM5 indétectable avec 1238000 copies ABL1
348c	0	0	RM5 indétectable avec 388000 copies ABL1
348d	0	0	RM5 indétectable avec 655000 copies ABL1
348e	0	0	RM5 indétectable avec 950000 copies ABL1
348f	0	0	RM5 indétectable avec 862000 copies ABL1
348g	0	0	RM5 indétectable avec 105800 copies ABL1
348h	0	0	RM5 indétectable avec 350000 copies ABL1
8736a	0	0	RM5 indétectable avec 178700 copies ABL1
8736b	0	0	RM5 indétectable avec 343000 copies ABL1
8736c	0	0	RM5 indétectable avec 258800 copies ABL1
8736d	$688193 \cdot 10^9$	$46667 \cdot 10^8$	RM5 détectable avec 612000 copies ABL1
8736e	$5125628 \cdot 10^9$	$216791 \cdot 10^8$	RM4, 5 indétectable avec 99200 copies ABL1
8736f	0	0	RM4, 5 détectable avec 94100 copies ABL1
8736g	0	0	RM5 indétectable avec 463000 copies ABL1
845a	0	0	RM5 indétectable avec 339000 copies ABL1
845b	$900595 \cdot 10^9$	$61008 \cdot 10^8$	détectable avec 496000 copies ABL1
845c	0	0	RM5 indétectable avec 352000 copies ABL1
845d	0	0	RM5 indétectable avec 480000 copies ABL1
845e	0	0	RM5 indétectable avec 379000 copies ABL1
845f	0	0	RM5 indétectable avec 385000 copies ABL1
10286a	0	0	RM5 détectable avec 787000 copies ABL1

10286b	0	0	RM5 détectable avec 396000 copies ABL1
10286c	0	0	RM5 indétectable avec 181000 copies ABL1
10286d	0	0	RM5 indétectable avec 306300 copies ABL1
10286e	961714*10 ⁹	117017*10 ⁸	RM4, 5 détectable avec 523000 copies ABL1
10286f	978947*10 ⁹	85359*10 ⁸	RM5 détectable avec 474000 copies ABL1
11687a	0	0	RM5 indétectable avec 401000 copies ABL1
11687b	0	0	RM5 indétectable avec 114300 copies ABL1
11687c	0	0	RM5 indétectable avec 513000 copies ABL1
11687d	0	0	RM5 indétectable avec 540000 copies ABL1
11687e	0	0	RM5 indétectable avec 388000copies ABL1
11687f	0	0	RM5 indétectable avec 388000copies ABL1
2291a	2945994*10 ⁹	341347*10 ⁸	RM4 détectable avec 505000 copies ABL1
2291b	0	0	RM5 indétectable avec 703000 copies ABL1
2291c	0	0	RM5 indétectable avec 359000 copies ABL1
2291d	0	0	RM5 indétectable avec 449000 copies ABL1
2291e	0	0	RM4 Indétectable avec 39400 copies ABL1
2291f	0	0	RM5 Indétectable avec 247000 copies ABL1
10589a	1129412*10 ⁹	98144*10 ⁸	RM5 détectable avec 873000 copies ABL1
10589b	1162924*10 ⁹	112343*10 ⁸	RM4, 5 détectable avec 572000 copies ABL1
10589c	574324*10 ⁹	65733*10 ⁸	RM5 détectable avec 450000 copies ABL1
10589d	0	0	RM5 indétectable avec 524000 copies ABL1
10589e	0	0	RM5 indétectable avec 444000 copiesABL1

C'est BCR-ABL1 qui est détectable ou indétectable

RM duplicat IS = réponse moléculaire sur l'échelle internationale en duplicat.

RM triplicat IS = réponse moléculaire sur l'échelle internationale en triplicat.

Le commentaire représente le type de réponse rendu au patient.

Pour les mêmes échantillons il y a plus de RM 4,5 en duplicat qu'en triplicat et plus de RM5 en triplicat qu'en duplicat. Autrement dit le même échantillon en duplicat peut être RM 4,5 alors qu'en triplicat il serait en RM5.

Plus il y a de réplicats et plus le résultat se rapproche de celui de la PCR numérique ou digital PCR (56).

Une RM5 avec BCR-ABL1 indétectable, autorise le médecin à arrêter le traitement par les anti-tyrosines kinases donc soulage le patient (achat et prise de médicaments qui coutent chers).

L'Augmentation d'un réplicat dans les tests, augmente les réactifs de cinquante pour cent donc les charges du laboratoire qui n'a pas un budget extensible.

I.2- La deuxième série de prélèvements

L'analyse a été faite en duplicat et les résultats sont dans les deux tableaux ci-dessous : le premier représente les résultats bruts de l'analyse et le deuxième le commentaire des résultats.

Tableau XXX : Résultats de la deuxième série de prélèvements

Identifiant	Moyenne Cp ABL1	Moyenne Cp P210	CONC1 p210	CONC2 p210	CONC1 ABL1	CONC2 ABL1	Ratio	IS
CAL ABL/CALP210	28,075	26,1	1,02E+04	9,79E+03	1,02E+04	9,82E+03	9,99E-01	3,39E+01
5274 3405	28,8	38,32	0,00E+00	5,80E+00	6,33E+03	6,08E+03	4,67E-04	1,59E-02
5279 1746	22,94	0	0,00E+00	0,00E+00	2,91E+05	2,96E+05	0,00E+00	0,00E+00
H2O								0,00E+00
5278 2384	23,81	0	0,00E+00	0,00E+00	1,66E+05	1,63E+05	0,00E+00	0,00E+00
5279 3240	23,09	29,86	7,82E2	8,32E+00	2,74E+05	2,58E+05	3,03E-04	1,03E-02
5006 4368	24,6	24,18	3,69E+04	3,49E+04	9,62E+04	1,00E+05	3,66E-01	1,24E+01
5278 3037	23,5	0	0,00E+00	0,00E+00	2,05E+05	2,01E+05	0,00E+00	0,00E+00

5279 3286	23,5	38,37	4,28E+00	7,75E+00	2,04E+05	2,02E+05	2,96E-05	1,01E-03
50432192	23,51	24,05	4,06E+04	3,77E+04	1,99E+05	2,04E+05	1,94E-01	6,61E+00
5279 2118	23,79	0	0,00E+00	0,00E+00	1,66E+05	1,68E+05	0,00E+00	0,00E+00
5279 3315	23,83	37,26	1,76E+01	5,20E+00	1,62E+05	1,63E+05	7,02E-05	2,39E-03
5160 2338	22,93	25,5	1,49E+04	1,49E+04	2,92E+05	2,97E+05	5,06E-02	1,72E+00
5279 2532	23,32	34,93	2,91E+01	3,23E+01	2,28E+05	2,28E+05	1,35E-04	4,58E-03
5279 3511	23,21	35,18	3,24E+01	2,19E+01	2,49E+05	2,42E+05	1,11E-04	3,76E-03
5272 3908	24,5	23,58	5,48E+04	5,24E+04	1,22E+05	1,26E+05	4,32E-01	1,47E+01
5279 2543	24,21	31,67	2,37E+02	2,46E+02	1,29E+05	1,25E+05	1,90E-03	6,47E-02
52741513	25,03	35,7	2,56E+01	1,58E+01	7,41E+05	7,37E+05	2,80E-05	9,52E-04
5279 2227	24,24	36,28	1,38E+01	1,59E+01	1,21E+05	1,19E+05	1,24E-04	4,21E-03
52742165	24,18	34,88	3,08E+01	3,21E+01	1,28E+05	1,31E+05	2,43E-04	8,26E-03
5279 2548	23,25	35,22	2,70E+01	2,51E+01	2,39E+05	2,39E+05	1,09E-04	3,71E-03

CONC1 ABL1 = concentration d'ABL1 dans le premier puit. CONC2 ABL1 = concentration d'ABL1 dans le deuxième puit. Mean Cp P210 = moyenne des Cp de P210, CONC1P210=concentration de P210 dans le premier puit ;

CONC2 P210= concentration deP210 dans le deuxième puits ;

Ratio = $\frac{\sum \text{CONCp210}}{\sum \text{CONC ABL1}}$. IS = échelle international = ratio*0,34*10.

Tableau XXXI : Commentaire des résultats de la deuxième série de prélèvements

Identifiant	IS	Antériorité		Commentaires
CAL ABL/CALP210	3,39E+01			
5274 3405	1,59E-02	Pnq	0,02%	Inévaluable pour la RM
5279 1746	0,00E+00	Neg	0	BCR-ABL1indéetectable avec 587000 copies ABL1 RM5 stable
H2O	0,00E+00			
5278 2384	0,00E+00	Neg	0	BCR-ABL1indéetectable avec 329000 copies ABL1 RM5 stable

5279 3240	1,03E-02	0,12%	1,03E-02	En baisse, BCR-ABL1 détectable avec 523000 copies RMM
5006 4368	1,24E+01		12,40%	BCR-ABL1 détectable à 12,40% IS
5278 3037	0,00E+00	Neg	0	BCR-ABL1 indétectable avec 406000 copies ABL1 RM5 stable
5279 3286	1,01E-03	0,02%	0,00%	BCR-ABL1 indétectable avec 406000 copies ABL1 en baisse RM5
50432192	6,61E+00		661,00%	BCR-ABL1 détectable à 6,61% IS avec 303000 copies ABL1
5279 2118	0,00E+00	Pnq	0	BCR-ABL1 indétectable en baisse avec 334000 copies ABL1 RM5
5279 3315	2,39E-03	0,38%	0,24%	BCR-ABL1 en baisse avec 325000 copies ABL1 RMM
5160 2338	1,72E+00		1,72%	BCR-ABL1 détectable avec 589000 copies ABL1 1,72% IS
5279 2532	4,58E-03	0,28%	0,46%	BCR-ABL1 en progression à 0,46% IS
5279 3511	3,76E-03	0,15%	0,00376	BCR-ABL1 en baisse avec 491000 copies ABL1 RM 4,5
5272 3908	1,47E+01		14,70%	BCR-ABL1 détectable à 14,70% IS
5279 2543	6,47E-02	0,08%	0,0647	BCR-ABL1 détectable en baisse à 0,0647 % IS
52741513	9,52E-04	21%	0,000952	BCR-ABL1 détectable en baisse avec 1478000 copies ABL1 RM 4,5
5279 2227	4,21E-03	0,01%	0,00421	BCR-ABL1 détectable en baisse avec 240000 copies ABL1 RMM
52742165	8,26E-03	0,06%	0,00826	BCR-ABL1 détectable en baisse avec 259000 copies ABL1 RM4
5279 2548	3,71E-03	0,01%	0,00371	BCR-ABL1 détectable en baisse avec 478000 copies ABL1 RM4

La conclusion qui se dégage de l'analyse de la deuxième série de prélèvements est la suivante : la méthode proposée par le groupe d'experts d'EUTOS est meilleure que la méthode traditionnelle du laboratoire parce que :- elle est quantifiable, elle permet de discriminer les cas dits négatifs et positif non quantifiables en traditionnelle. Les cas négatifs n'ont pas tous le même nombre de copies d'ABL1 et donc la profondeur peut varier. Les cas PNQ peuvent être Inévaluables, indétectable ou indétectable. La méthode du groupe EUTOS permet une meilleure décision thérapeutique.

I.3- La troisième série de prélèvements

Le groupe d'experts d'EUTOS a proposé d'utiliser le plasmide ERM-AD 623 comme gène de référence ou gène contrôle (54, 58,59). Ceci permettrait de ne plus recourir au facteur de conversion pour comparer les résultats inter-laboratoires. La même série de prélèvements a été analysée en duplicat, en utilisant le plasmide Qiagen-Ipsogen (traditionnellement utilisé par le laboratoire) et le plasmide ERM-AD623. Les résultats et commentaires sont ci-dessous.

Tableau XXXII : Résultats de la troisième série de prélèvements avec le Plasmide ERM-AD623

Identifiant	Cp p210	Concentration P210	Standard	Statuts	Identifiant	CpABL1 ERM	CONC ABL1ERM	Standard
CALp210ERM	22.71	1.01E4	10000	CONTROLE+	CAL ABL1ERM	23,57	1,04E+04	10000
CALp210ERM	22.74	9.92E3	10000	CONTROLE+	CAL ABL1ERM	23,55	1,01E+04	10000
5285 2109						24,85	4,13E+03	
5285 2109						24,87	4,05E+03	
H20	C. Neg		0					
H20	C. Neg		0					
5188 2297	26.26	8.65E2				23,04	1,45E+04	
5188 2297	26.27	8.56E2				23,02	1,46E+04	
5285 2249	38.96	1.29E-1				24,24	6,30E+03	
5285 2249	39.16	1.13E-1				24,28	6,10E+03	
5218 2697	25.58	1.39E3				23,25	1,25E+04	
5218 2697	25.83	1.16E3				23,26	1,25E+04	
5275 1393						28,26	3,88E+02	
5275 1393						28,23	3,95E+02	
5285 2647						23,15	1,34E+04	
5285 2647						23,27	1,23E+04	
5275 1960						35,51	2,54E+00	
5275 1960						35,8	2,08E+00	
52813491	37.91	2.68E-1				23,69	9,21E+03	
52813491	37.77	2.96E-1				23,65	9,45E+03	
5285 2571	35.68	1.26E0				23,89	8,03E+03	
5285 2571	37.16	4.51E-1				23,94	7,75E+03	
52821720						24,66	4,69E+03	
52821720						24,72	4,50E+03	

Tableau XXXIII : Commentaires des résultats de la troisième série de prélèvements avec le Plasmide ERM-AD623

Ratio	IS	Commentaire ERM_AD623				
1						
0		Inévaluable pour la RM				
0,059140893	2,01079038	BCR-ABL1 détectable avec 29100 copies ABL1 2,01%IS				
1,95161E-05	0,00066355	Inévaluable pour la RM				
0,0000102	0,0003468	BCR-ABL1 détectable avec 25000 copies ABL1 RM4,5				
0	0	Inévaluable pour la RM				
0	0	Indétectable avec 25700 copies ABL1 RM4,5				
0	0	Inévaluable pour la RM				
3,02251E-05	0,00102765	BCR-ABL1 détectable avec 18660 copies ABL1 RM4,5				
0,000108428	0,00368657	Inévaluable pour la RM				
0		Inévaluable pour la RM				

Tableau XXXIV : résultats de la troisième série de prélèvements avec les plasmides Qiagen-Ipsogen

Identifiant	Cp ABL1 IPSO	Concentration	ABL IPSOGEN		Cp p210 IPSO	P210 IPSOGEN	RATIO	IS
			Standard	Statut		Concentration		
cal ABL	28.17	9.92E3	10000		26,15	9,90E+03	1	100%
cal ABL	28.15	1.01E4	10000		26,13	1,01E+04	1	
H20			0					0%
H20			0					
5285 2109	24.85	8.83E4	0			0	0	
5285 2109	24.87	8.68E4	0			0		
5188 2297	23.04	2.90E5	0		26,26	9,23E+03	0,026	0,884% IS
5188 2297	23.02	2.94E5	0		26,27	9,14E+03		
5218 2697	23.25	2.53E5	0		25,58	1,48E+04	0,045	1,53% IS
5218 2697	23.26	2.52E5	0		25,83	1,24E+04		
5285 2249	24.24	1.32E5	0		38,96	1,38E+00	8,69E-04	0,0295% IS
5285 2249	24.28	1.28E5	0		39,16	1,20E+00		
5275 1393	28.26	9.36E3	0			0,00E+00		
5275 1393	28.23	9.51E3	0			0,00E+00	0	0
5275 1960	35.51	7.88E1	0			0,00E+00	0	
5275 1960	35.80	6.52E1	0			0,00E+00		
5285 2647	23.15	2.70E5	0			0,00E+00	0	0
5285 2647	23.27	2.49E5	0			0,00E+00		
52813491	23.69	1.89E5	0		37,91	2,86E+00	0,001	0,034% IS
52813491	23.65	1.94E5	0		37,77	3,16E+00		
52821720	24.66	9.98E4	0			0,00E+00	0	
52821720	24.72	9.59E4	0			0,00E+00		
5285 2571	23.89	1.66E5	0			1,35E+01	4,83E-05	0,00164% IS
5285 2571	23.94	1.61E5	0			4,08E+03		

Le ratio est le rapport de la concentration du gène cible sur la concentration du gène de contrôle. $IS = \text{ratio} * CF * 100$ $CF = 0,34$

Tableau XXXV : Commentaires des résultats de la troisième série de prélèvements avec les plasmides Qiagen-Ipsogen.

RATIO	IS	Commentaire IPSOGEN			
1	100%				
1					
	0%				
0		BCR-ABL1 indétectable avec 175100 copies ABL1 RM5			
0,026	0,884% IS	BCR-ABL1 détectable à 0,884%IS			
0,045	1,53% IS	BCR-ABL1 détectable à 1,53%IS			
8,69E-04	0,0295% IS	BCR-ABL1 détectable à 0,295% IS			
		Inévaluable pour la réponse moléculaire			
0	0				
0		Inévaluable pour la réponse moléculaire			
		BCR-ABL1 Indétectable avec 519000 copies ABL1 RM5			
0	0				
0,001	0,034% IS	BCR-ABL1 détectable à 0,034% IS			
0		Inévaluable pour la RM			
4,83E-05	0,00164 % IS	BCR-ABL1 détectable avec 327000copies ABL1 RM4,5			

La PCR à cinquante cycles et la méthode de calcul en appliquant la loi de poisson proposée par le groupe d'experts d'EUTOS permet de donner des résultats

quantifiables avec le plasmide ERM-AD623 et les plasmides Qiagen-Ipsogen. Elle est discriminative et meilleure que la méthode traditionnelle qualitative antérieurement utilisée.

En comparant les conclusions sur les mêmes échantillons avec les gènes de contrôle Qiagen-Ipsogen et ERM-AD623 le constat est le suivant :

Tableau XXXVI : Comparaison des commentaires des résultats de la troisième série de prélèvements avec les plasmides Qiagen-ipsogen et ERM-AD623.

Echantillon	Commentaire Qiagen-Ipsogen	Commentaire ERM-AD623
cal ABL		
H ₂ O		
5285 2109	BCR-ABL1 indétectable avec 175100 copies ABL1 RM5	Inévaluable pour la RM
5188 2297	BCR-ABL1 détectable à 0,884% IS	BCR-ABL1 détectable avec 29100 copies ABL1 à 2,01% IS
5218 2697	BCR-ABL1 détectable à 1,53% IS	Bcr-ABL1 détectable avec 25000 copies ABL1 RM 4 ,5
5285 2249	BCR-ABL1 détectable à 0,295% IS	Inévaluable pour la RM
5275 1393	Inévaluable pour la réponse moléculaire	Inévaluable pour la RM
5275 1960	Inévaluable pour la réponse moléculaire	Inévaluable pour la RM
5285 2647	BCR-ABL1 indétectable avec 519000 copies ABL1 RM5	BCR-ABL1 indétectable avec 25700 copies ABL1 RM 4,5
52813491	Bcr-abl1 détectable à 5,3441 % IS	BCR-ABL1 détectable avec 18660 copies ABL1 RM 4,5
52821720	Inévaluable pour la réponse moléculaire	Inévaluable pour la RM
5285 2571	BCR-ABL1 détectable avec 327000 copies ABL1RM 4,5	Inévaluable pour la RM

Le commentaire est celui rendu comme résultat final au patient

Le gène de référence Qiagen-Ipsogen qui utilise un facteur de conversion et le gène de référence ERM-AD623 sans facteur de conversion doivent donner les mêmes conclusions avec les mêmes échantillons. Ce n'est pas le cas ici.

I.4- Analyse des données portant sur le suivi de 82 échantillons dont 4 contrôles de qualité externe testés avec les plasmides Qiagen-Ipsogen et le plasmide ERM-AD623.

Le tableau a été divisé en trois parties pour pouvoir être représenté.

Tableau XXXVII a : Analyse de 82 échantillons en duplicat

D	E	F	G	H	I	J
Identifiant de l'échantillon	Cp1_P210	Cp2_P210	Moyenne Cp_P210	Delta Cp_P210	Cp1_ABL1	Cp2_ABL1
5302 2260	34,71	34,50	34,61	0,21	24,23	24,24
5313 1695				0,00	22,86	22,89
5313 3469				0,00	22,52	22,29
5314 1658				0,00	22,84	22,85
5314 1721				0,00	22,73	22,79
5314 2339				0,00	22,91	22,93
5314 2622	30,52	30,52	30,52	0,00	23,33	23,26
5314 3768				0,00	23,14	23,17
5314 4162				0,00	23,47	23,48
5316 3717				0,00	23,25	23,23
5321 1323				0,00	25,11	25,15
5321 1853				0,00	23,23	23,22
5321 3689				0,00	23,43	23,32
5321 3880				0,00	24,35	24,34
5322 3416				0,00	23,67	23,60
5322 3432				0,00	24,71	24,72
5328 3474				0,00	24,76	24,73
5329 3716				0,00	25,85	25,84
5329 4167				0,00	24,32	24,29
5329 4183				0,00	24,66	24,76

5330 4064				0,00	23,68	23,67
CQ18,1 SD	29,76	29,76	29,76	0,00	23,76	23,75
5328 3666	25,38	25,35	25,36	0,03	24,70	24,68
5329 3711	29,26	29,29	29,27	0,03	24,30	24,32
5309 4139	23,87	23,91	23,89	0,04	24,42	24,34
5309 4046	29,98	30,03	30,00	0,05	23,05	23,07
5322 4191	28,71	28,76	28,73	0,05	23,84	23,89
5314 4229	22,83	22,89	22,86	0,06	21,99	22,21
5314 2959	27,89	27,97	27,93	0,08	23,69	23,66
5330 2167	36,73	36,65	36,69	0,08	24,92	24,91
CQ18,1 SA	27,26	27,34	27,30	0,08	24,44	24,37
CQ18,1 SB	24,91	24,83	24,87	0,08	24,30	24,30
5314 4169	39,55	39,63	39,59	0,08	23,97	23,94
5316 3713	29,69	29,78	29,73	0,09	23,00	23,11
5328 1613	33,74	33,64	33,69	0,10	24,30	24,29
5330 2336	38,54	38,66	38,60	0,12	23,08	23,06
5322 2494	30,09	30,22	30,16	0,13	23,67	23,71
5321 3135	23,61	23,75	23,68	0,14	23,20	23,16
5328 2213	33,66	33,81	33,73	0,15	24,05	23,98
5321 3885	27,91	28,07	27,99	0,16	23,92	23,92
5330 3319	32,10	31,93	32,01	0,17	23,17	23,18
5321 3861	32,67	32,49	32,58	0,18	24,27	24,28
5309 3507	36,77	36,57	36,67	0,20	23,74	23,75
5328 2753	34,20	33,99	34,09	0,21	24,25	24,25
5316 1767	36,97	36,74	36,85	0,23	22,57	22,58
5328 3697	29,14	29,38	29,26	0,24	25,42	25,35
5328 3664	33,17	32,88	33,03	0,29	23,98	23,94
5321 3723	35,05	34,75	34,90	0,30	23,32	23,33
5329 3523	30,97	31,29	31,13	0,32	25,06	25,02
5321 1361	37,47	37,80	37,64	0,33	25,74	25,77
5320 2484	34,76	34,39	34,57	0,37	24,26	24,23
5330 3584	35,90	35,53	35,71	0,37	23,95	23,96

5330 3589	38,18	38,58	38,38	0,40	23,72	23,71
CQ18,1 SC	33,56	33,10	33,33	0,46	24,06	24,11
5330 2164	35,65	36,20	35,93	0,55	25,15	25,12
5322 3413	38,62	38,06	38,34	0,56	24,53	24,56
5322 1531	37,18	36,57	36,88	0,61	23,88	23,86
5330 4055	36,60	37,23	36,91	0,63	24,09	24,12
5321 2874	39,30	39,96	39,63	0,66	23,45	23,44
5313 2967	35,85	36,52	36,18	0,67	23,05	23,06
5317 2619	38,75	38,06	38,41	0,69	22,59	22,52
5323 2305	36,47	37,21	36,84	0,74	23,97	23,98
5330 3585	37,70	36,94	37,32	0,76	23,46	23,44
5314 3509	36,49	35,70	36,10	0,79	22,76	22,79
5320 1826	37,83	38,62	38,22	0,79	24,23	24,19
5314 2142	35,83	36,64	36,24	0,81	23,63	23,58
5322 3415	36,75	35,77	36,26	0,98	24,21	24,22
5320 2236	38,28	37,25	37,77	1,03	24,49	24,46
5330 1691	35,73	36,98	36,35	1,25	23,56	23,47
5322 2112	39,27	37,57	38,42	1,70	23,49	23,48
5314 4112	37,23	39,15	38,19	1,92	22,47	22,33
5321 2892	39,59	37,65	38,62	1,94	23,67	23,73
5308 3700	39,23		39,23	1/2	24,82	24,69
5313 3923	39,56		39,56	1/2	23,58	23,56
5316 2642		39,98	39,98	1/2	25,27	25,46
5317 1733		39,44	39,44	1/2	24,71	24,70
5321 3711		37,91	37,91	1/2	24,44	24,45
5321 3717	38,77		38,77	1/2	24,41	24,33
5321 3903	39,23		39,23	1/2	22,97	22,94
5327 3379	39,68		39,68	1/2	25,42	25,44
5328 3471	39,72		39,72	1/2	24,41	24,28
5330 2595		39,34	39,34	1/2	22,77	22,72

CQ =contrôle de qualité externe delta Cp doit être inférieur à 0,5 pour que l'analyse soit valide

Deuxième tiers du tableau

Tableau XXXVII b : Analyse de 82 échantillons

D	K	L	M	N	O	P
Identifiant échantillon	Moyenne_ABL1_IPSO	Cible/Ref_IPSO	Normalized_IPSO	Status_IPSO_Non IS	Copies P210	Status_CROSS_IPSO_Non IS
5302 2260	78 450	0,046%	0,047%	0,047%	3,66E+01	0,047%
5313 1695	201 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5313 3469	279 000	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5314 1658	216 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5314 1721	230 000	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5314 2339	206 000	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5314 2622	158 500	0,343%	0,326%	0,33%	5,17E+02	0,33%
5314 3768	175 000	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5314 4162	139 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5316 3717	164 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5321 1323	42 100	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5321 1853	157 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5321 3689	142 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5321 3880	72 900	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5322 3416	119 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5322 3432	56 500	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5328 3474	44 850	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5329 3716	21 450	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5329 4167	60 100	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5329 4183	45 950	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
5330 4064	107 000	0,000%		NEG MR5		NEG MR5
CQ18,1 SD	101 500	0,775%	0,712%	0,71%	7,23E+02	0,71%
5328 3666	46 450	27,460%	30,790%	31%	1,43E+04	31%
5329 3711	59 950	1,570%	1,760%	1,8%	1,06E+03	1,8%
5309 4139	74 550	59,850%	56,780%	57%	4,23E+04	57%
5309 4046	177 000	0,415%	0,424%	0,42%	7,50E+02	0,42%
5322 4191	101 850	1,660%	1,760%	1,8%	1,79E+03	1,8%
5314 4229	364 500	25,510%	24,200%	24%	8,82E+04	24%
5314 2959	122 000	2,490%	2,370%	2,4%	2,89E+03	2,4%
5330 2167	40 000	0,024%	0,027%	0,027%	1,06E+01	0,027%
CQ18,1 SA	65 900	6,180%	5,680%	5,7%	3,74E+03	5,7%
CQ18,1 SB	70 650	29,300%	26,920%	27%	1,90E+04	27%
5314 4169	100 150	0,004%	0,003%	PNQ	6,00E+00	0,006%
5316 3713	177 500	0,494%	0,490%	0,49%	8,70E+02	0,49%
5328 1613	70 650	0,083%	0,076%	0,076%	5,36E+01	0,076%

5330 2336	160 000	0,003%	0,003%	PNQ	6,00E+00	0,004%
5322 2494	115 000	0,570%	0,603%	0,60%	6,93E+02	0,60%
5321 3135	162 500	30,590%	30,310%	30%	4,93E+04	30%
5328 2213	73 300	0,067%	0,075%	0,075%	5,48E+01	0,075%
5321 3885	97 800	2,830%	3,000%	3,0%	2,93E+03	3,0%
5330 3319	149 000	0,117%	0,108%	0,11%	1,61E+02	0,11%
5321 3861	76 550	0,168%	0,178%	0,18%	1,36E+02	0,18%
5309 3507	110 500	0,011%	0,011%	0,011%	1,23E+01	0,011%
5328 2753	62 500	0,063%	0,070%	0,070%	4,38E+01	0,070%
5316 1767	261 500	0,005%	0,004%	PNQ	1,12E+01	0,004%
5328 3697	29 200	3,240%	3,640%	3,6%	1,06E+03	3,6%
5328 3664	75 850	0,101%	0,113%	0,11%	8,57E+01	0,11%
5321 3723	148 000	0,021%	0,022%	0,022%	3,27E+01	0,022%
5329 3523	36 850	0,739%	0,829%	0,83%	3,05E+02	0,83%
5321 1361	27 200	0,027%	0,027%	0,027%	7,21E+00	0,027%
5320 2484	77 400	0,047%	0,047%	0,047%	3,60E+01	0,047%
5330 3584	88 850	0,020%	0,019%	0,019%	1,66E+01	0,019%
5330 3589	104 000	0,005%	0,005%	PNQ	6,00E+00	0,006%
CQ18,1 SC	81 450	0,090%	0,083%	0,083%	6,74E+01	0,083%
5330 2164	34 500	0,040%	0,045%	0,045%	1,56E+01	0,045%
5322 3413	63 350	0,009%	0,009%	PNQ	6,00E+00	0,009%
5322 1531	101 500	0,011%	0,011%	0,011%	1,15E+01	0,011%
5330 4055	80 450	0,012%	0,011%	0,011%	9,09E+00	0,011%
5321 2874	136 500	0,003%	0,003%	PNQ	6,00E+00	0,004%
5313 2967	178 000	0,009%	0,009%	PNQ	1,58E+01	0,009%
5317 2619	250 500	0,002%	0,002%	PNQ	6,00E+00	0,002%
5323 2305	94 350	0,012%	0,012%	0,012%	1,17E+01	0,012%
5330 3585	124 000	0,007%	0,006%	PNQ	7,45E+00	0,006%
5314 3509	227 500	0,008%	0,007%	PNQ	1,63E+01	0,007%
5320 1826	79 400	0,007%	0,007%	PNQ	6,00E+00	0,008%
5314 2142	128 000	0,012%	0,012%	0,012%	1,48E+01	0,012%
5322 3415	79 850	0,018%	0,019%	0,019%	1,54E+01	0,019%
5320 2236	66 150	0,011%	0,011%	0,011%	7,01E+00	0,011%
5330 1691	119 000	0,011%	0,010%	0,010%	1,19E+01	0,010%
5322 2112	132 500	0,004%	0,004%	PNQ	6,00E+00	0,005%
5314 4112	296 000	0,002%	0,002%	PNQ	6,19E+00	0,002%
5321 2892	114 000	0,004%	0,005%	PNQ	6,00E+00	0,005%

5308 3700	54 750			PNQ	3,00E+00	0,005%
5313 3923	131 000			PNQ	3,00E+00	0,002%
5316 2642	37 850			PNQ	3,00E+00	0,008%
5317 1733	56 350			PNQ	3,00E+00	0,005%
5321 3711	68 050			PNQ	3,00E+00	0,004%
5321 3717	71 550			PNQ	3,00E+00	0,004%
5321 3903	191 000			PNQ	3,00E+00	0,002%
5327 3379	28 300			PNQ	3,00E+00	0,011%
5328 3471	58 850			PNQ	3,00E+00	0,005%
5330 2595	198 500			PNQ	3,00E+00	0,002%

Les K, L, M, N, O, P sont la suite de la colonne J , Status_CROSS Ipsogen non IS = résultat attendu en analyse traditionnelle donc qualitative, cible/ref_Ipsogen=ratio avec les plasmides Qiagen-Ipsogen , Status_CROSS_IPSO_Non IS=résultats attendus avec la proposition du groupe EUTOS en utilisant les plasmides Qiagen-Ipsogen

Dernier tiers du tableau

Tableau XXXVII c : Analyse de 82 échantillons

D	Q	R	U	V	W	X	Y
Identifiant des échantillons	Copies P210	Status _CROSS_ IPSO _Non IS	Status_ ED_IPSO _Non IS	Moyenne _ABL1_ AD623	Status _AD623_ Non IS	Status _CROSS_ AD623_Non IS	Status _ED_AD63 _Non IS
5302 2260	3,66E+01	0,047%	0,047%	30 850	0,12%	0,12%	0,12%
5313 1695		NEG MR5	NEG MR5	76 100	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5313 3469		NEG MR5	NEG MR5	104 100	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5314 1658		NEG MR5	NEG MR5	81 400	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5314 1721		NEG MR5	NEG MR5	86 350	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5314 2339		NEG MR5	NEG MR5	77 650	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5314 2622	5,17E+02	0,33%	0,33%	60 250	0,86%	0,86%	0,86%
5314 3768		NEG MR5	NEG MR5	66 150	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5314 4162		NEG MR5	NEG MR5	53 350	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5316 3717		NEG MR5	NEG MR5	62 550	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5321 1323		NEG MR5	NEG MR5	16 700	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5321 1853		NEG MR5	NEG MR5	59 800	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5321 3689		NEG MR5	NEG MR5	55 400	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5321 3880		NEG MR5	NEG MR5	29 100	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5322 3416		NEG MR5	NEG MR5	46 700	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5322 3432		NEG MR5	NEG MR5	22 800	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5328 3474		NEG MR5	NEG MR5	22 250	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5329 3716		NEG MR5	NEG MR5	10 750	NEG MR4,5	NEG MR4,5	NEG MR4,5
5329 4167		NEG MR5	NEG MR5	29 700	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5329 4183		NEG MR5	NEG MR5	22 800	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
5330 4064		NEG MR5	NEG MR5	44 500	NEG MR5	NEG MR5	NEG MR5
CQ18,1 SD	7,23E+02	0,71%	0,71%	42 250	1,7%	1,7%	1,7%
5328 3666	1,43E+04	31%	31%	23 050	62%	62%	62%
5329 3711	1,06E+03	1,8%	1,8%	29 600	3,6%	3,6%	3,6%
5309 4139	4,23E+04	57%	57%	29 000	146%	146%	146%
5309 4046	7,50E+02	0,42%	0,42%	67 200	1,1%	1,1%	1,1%
5322 4191	1,79E+03	1,8%	1,8%	40 050	4,5%	4,5%	4,5%
5314 4229	8,82E+04	24%	24%	135 000	65%	65%	65%
5314 2959	2,89E+03	2,4%	2,4%	46 800	6,2%	6,2%	6,2%
5330 2167	1,06E+01	0,027%	0,027%	19 850	0,053%	0,053%	0,053%

CQ18,1 SA	3,74E+03	5,7%	5,7%	27 450	14%	14%	14%
CQ18,1 SB	1,90E+04	27%	27%	29 400	65%	65%	65%
5314 4169	6,00E+00	0,006%	0,006%	38 650	PNQ	0,016%	0,016%
5316 3713	8,70E+02	0,49%	0,49%	67 100	1,3%	1,3%	1,3%
5328 1613	5,36E+01	0,076%	0,076%	29 450	0,18%	0,18%	0,18%
5330 2336	6,00E+00	0,004%	0,004%	66 450	PNQ	0,009%	0,009%
5322 2494	6,93E+02	0,60%	0,60%	45 000	1,5%	1,5%	1,5%
5321 3135	4,93E+04	30%	30%	61 800	80%	80%	80%
5328 2213	5,48E+01	0,075%	0,075%	36 150	0,15%	0,15%	0,15%
5321 3885	2,93E+03	3,0%	3,0%	38 550	7,6%	7,6%	7,6%
5330 3319	1,61E+02	0,11%	0,11%	61 850	0,26%	0,26%	0,26%
5321 3861	1,36E+02	0,18%	0,18%	30 500	0,45%	0,45%	0,45%
5309 3507	1,23E+01	0,011%	0,011%	42 850	0,029%	0,029%	0,029%
5328 2753	4,38E+01	0,070%	0,070%	30 900	0,14%	0,14%	0,14%
5316 1767	1,12E+01	0,004%	0,004%	97 700	PNQ	0,012%	0,012%
5328 3697	1,06E+03	3,6%	3,6%	14 550	7,3%	7,3%	7,3%
5328 3664	8,57E+01	0,11%	0,11%	37 400	0,23%	0,23%	0,23%
5321 3723	3,27E+01	0,022%	0,022%	57 300	0,057%	0,057%	0,057%
5329 3523	3,05E+02	0,83%	0,83%	18 300	1,7%	1,7%	1,7%
5321 1361	7,21E+00	0,027%	0,027%	10 950	0,066%	0,066%	0,066%
5320 2484	3,60E+01	0,047%	0,047%	30 150	0,12%	0,12%	0,12%
5330 3584	1,66E+01	0,019%	0,019%	36 950	0,045%	0,045%	0,045%
5330 3589	6,00E+00	0,006%	0,006%	43 200	PNQ	0,014%	0,014%
CQ18,1 SC	6,74E+01	0,083%	0,083%	33 850	0,20%	0,20%	0,20%
5330 2164	1,56E+01	0,045%	0,045%	17 150	0,091%	0,091%	0,091%
5322 3413	6,00E+00	0,009%	0,009%	25 450	PNQ	0,024%	0,024%
5322 1531	1,15E+01	0,011%	0,011%	40 000	0,029%	0,029%	0,029%
5330 4055	9,09E+00	0,011%	0,011%	33 450	0,027%	0,027%	0,027%
5321 2874	6,00E+00	0,004%	0,004%	52 950	PNQ	0,011%	0,011%
5313 2967	1,58E+01	0,009%	0,009%	67 500	0,023%	0,023%	0,023%
5317 2619	6,00E+00	0,002%	0,002%	94 000	PNQ	0,006%	0,006%
5323 2305	1,17E+01	0,012%	0,012%	37 300	0,031%	0,031%	0,031%
5330 3585	7,45E+00	0,006%	0,006%	51 600	PNQ	0,014%	0,014%
5314 3509	1,63E+01	0,007%	0,007%	85 400	PNQ	0,019%	0,019%
5320 1826	6,00E+00	0,008%	0,008%	30 850	PNQ	0,019%	0,019%
5314 2142	1,48E+01	0,012%	0,012%	49 000	0,030%	0,030%	0,030%

5322 3415	1,54E+01	0,019%	0,019%	31 800	0,048%	0,048%	0,048%
5320 2236	7,01E+00	0,011%	0,011%	25 900	PNQ	0,027%	0,027%
5330 1691	1,19E+01	0,010%	0,010%	49 400	0,024%	0,024%	0,024%
5322 2112	6,00E+00	0,005%	0,005%	51 550	PNQ	0,012%	0,012%
5314 4112	6,19E+00	0,002%	0,002%	110 500	PNQ	0,006%	0,006%
5321 2892	6,00E+00	0,005%	0,005%	44 650	PNQ	0,013%	0,013%
5308 3700	3,00E+00	0,005%	NEG MR5	21 900	PNQ	0,014%	NEG MR5
5313 3923	3,00E+00	0,002%	NEG MR5	50 200	PNQ	0,006%	NEG MR5
5316 2642	3,00E+00	0,008%	NEG MR5	15 050	PNQ	0,020%	NEG MR5
5317 1733	3,00E+00	0,005%	NEG MR5	22 150	PNQ	0,014%	NEG MR5
5321 3711	3,00E+00	0,004%	NEG MR5	27 250	PNQ	0,011%	NEG MR5
5321 3717	3,00E+00	0,004%	NEG MR5	28 600	PNQ	0,010%	NEG MR5
5321 3903	3,00E+00	0,002%	NEG MR5	73 100	PNQ	0,004%	NEG MR5
5327 3379	3,00E+00	0,011%	NEG MR5	14 100	PNQ	0,021%	NEG MR5
5328 3471	3,00E+00	0,005%	NEG MR5	29 150	PNQ	0,010%	NEG MR5
5330 2595	3,00E+00	0,002%	NEG MR5	82 350	PNQ	0,004%	NEG MR5

Les colonnes Q, R, U, V, W, X, Y sont la suite en horizontale de la colonne P.

Status-ED_IPSO_Non IS=Résultats attendus selon l'adaptation d'Eric Delabesse avec les plasmides Qiagen-Ipsogen, moyenne_ABL1-AD623= moyenne des copies d'ABL1 avec le plasmide ERM-AD623, Status_AD623_Non IS=résultats attendus avec le plasmide ERM-AD623 en interprétation traditionnelle ou qualitative, Status_Cross_AD623 attendus Non IS =résultats attendus selon le calcul du groupe EUTOS avec le plasmide ERM-AD623

Status_ED_AD623_Non IS=résultats adaptés par Eric Delabesse avec le plasmide ERM-AD623.

En comparant le mode de calcul selon les règles traditionnelles du laboratoire en duplicat :

- POS si les deux puits sont positifs, PNQ si un puit sur deux est positif ou résultat <0.01% non IS et NEG si les deux puits sont négatifs
- à celles de Cross et al (groupe d'experts d'EUTOS)
- et si l'on adapte la méthode du groupe EUTOS (seul les duplicats positifs sont positifs, donc élimination des PNQ) avec le calibrateur Qiagen Ipsogen (colonnes P et R) ou le calibrateur AD623 (colonnes V et W) ;

- le nombre de copies définissant le seuil de sensibilité (moyenne ABL1>16.000 copies = RM 4.5 ; moyenne ABL1>50.000 copies [donc 100.000 copies avec 2 puits] = RM 5).

La grande majorité des échantillons ont une sensibilité de RM de 5. Les résultats globaux sont les suivants :

Tableau XXXVIII : Copies p210. Comparaison résultats Ipsogen et ERM-AD623

Statut	IPSO	CROSS_IPSO	ED_IPSO	AD623	CROSS_AD623	ED_AD623
PNQ	24	0	0	24	0	0
POS	39	63	53	39	63	53
NEG MR5	19	19	29	18	18	28
MEG MR4,5	0	0	0	1	1	1
	82	82	82	82	82	82

Ipsogen = méthode traditionnelle avec les plasmides Qiagen –Ipsogen.

AD623 = méthode traditionnelle avec le plasmide ERM-AD423.

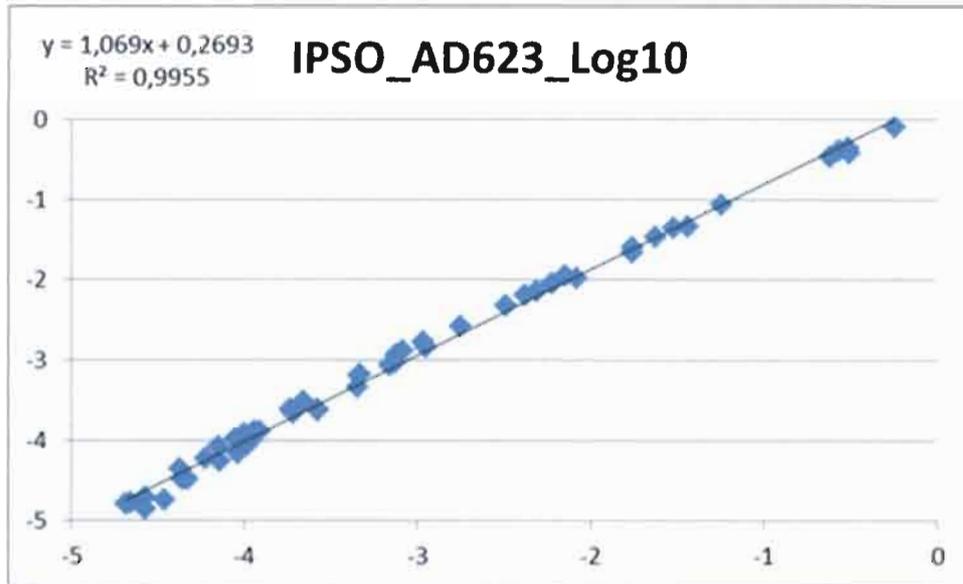
CROSS_IPSO et CROSS_AD623 = méthode proposée par le groupe EUTOS avec les plasmides correspondants.

ED_IPSO et ED_AD623 = méthode traditionnelle adaptée selon Eric Delabesse.

En appliquant la proposition du groupe EUTOS en duplicat et avec les plasmides Qiagen-Ipsogen, les 24 PNQ passent tous en POS tandis qu'avec la règle traditionnelle du laboratoire adaptée, seulement 14 PNQ passent en positif.

Le plasmide ERM-AD623 diverge surtout sur le nombre de copies ABL1 (conduisant avec des échantillons non évaluables supérieurs, qui peut être rattrapé si on définit un seuil de non évaluabilité à 5.000 copies par exemple). En calcul normalisé le résultat est cependant similaire (calcul sur les 53 échantillons ayant un résultat positif sur les 2 puits) :

Tableau XXXIX : Calcul normalisé



Chaque laboratoire a un facteur de conversion qui peut varier avec le temps. S'il faut pour chaque laboratoire faire un calcul normalisé pour avoir une concordance avec les résultats du plasmide ERM-AD623, surtout qu'avec le temps il faut recommencer, il n'y a aucun intérêt à changer de plasmide.

En appliquant la méthode adaptée du laboratoire à partir de la proposition du groupe EUTOS, le commentaire sur la troisième série de prélèvement devient le suivant (tableau ci-dessous)

Tableau XXXX : Application du calcul normalisé au tableau XXXVI

Echantillon	Commentaire Qiagen-Ipsogen	Commentaire ERM-AD623
cal ABL		
H ₂ O		
5285 2109	BCR-ABL1 indétectable avec 175100 copies ABL1 RM5	RM5 BCR-ABL1 indétectable avec 8180000 copies ABL1
5188 2297	BCR-ABL1 détectable à 0,884%IS	BCR-ABL1 détectable avec 29100 copies ABL1 à 2,01% IS
5218 2697	BCR-ABL1 détectable à 1,53%IS	Bcr-ABL1 détectable avec 25000 copies ABL1 RM 4 ,5
5285 2249	BCR-ABL1 détectable à 0,295% IS	détectable 2,42% IS avec 12400 copies ABL1 RM4

5275 1393	Inévaluable pour la réponse moléculaire	Inévaluable pour la RM avec 783 copies ABL1
5275 1960	Inévaluable pour la réponse moléculaire	Inévaluable pour la RM
5285 2647	BCR-ABL1 indétectable avec 519000 copies ABL1 RM5	BCR-ABL1 indétectable avec 25700 copies ABL1 RM4,5
52813491	Bcr-abl1 détectable à 5,3441 % IS	BCR-ABL1 détectable avec 18660 copies ABL1 RM4,5
52821720	Inévaluable pour la réponse moléculaire	Indétectable avec 9190 copies ABL1 RM 4
5285 2571	BCR-ABL1 détectable avec 327000 copies ABL1RM 4, 5	détectable 15780 copies ABL1 RM4

Même si le nombre de cas d'Inévaluables a nettement diminué, il n'y a pas identité de conclusion entre les deux méthodes.

II- DISCUSSION

La définition de la réponse moléculaire profonde de la leucémie myéloïde est claire (12) la technique pour avoir les éléments de définition est la réelle reverse transcriptase- amplification quantitative en chaîne par polymérase ou real time RTqPCR ou mieux par la RTqPCR numérique (62, 64, 70,71).C'est dans un contexte ou chaque laboratoire ou groupe de laboratoires a une attitude qui lui convient en présence d'une leucémie myéloïde chronique en réponse moléculaire profonde, que le panel d'experts du groupe EUTOS (60) a fait sa proposition que nous avons mis en œuvre. Nous n'avons pas vu dans la littérature médicale une publication rapportant la mise en application de cette proposition.

La réponse moléculaire, de la leucémie myéloïde chronique sous anti-tyrosine kinase en réponse moléculaire profonde c'est-à-dire en dessous de 0,01% sur l'échelle internationale, est quantifiable en RT-PCR à cinquante cycles. C'est la conclusion à laquelle nous avons abouti en appliquant cette proposition.

Le constat qui ressort de ce travail est le suivant :

- En augmentant le nombre de réplicats, le résultat de l'examen est meilleur et plus précis. En conséquence la prise de décision thérapeutique est plus judicieuse.

- il n'est pas possible d'avoir les mêmes résultats avec des réplicats différents, même si c'est le même plasmide qui est utilisé dans les tests ;

- il n'est pas possible d'avoir des résultats identiques avec des plasmides différents, même si le nombre de réplicats est le même sauf si leur facteur de conversion est le même.

Plus le nombre de réplicats augmente et plus augmente la quantité de réactifs à utiliser, donc la charge de travail et le prix du test augmente.

La grande partie des laboratoires d'analyse dans le monde utilise comme gène de contrôle ou de référence le gène ABL1, d'autres en Australie et aux États-Unis utilisent le gène BCR et une minorité en Europe utilise le gène GUSB (60). L'établissement du facteur de conversion est une tâche laborieusement, coûteuse et n'est pas accessible à tous les laboratoires. Le groupe EUTOS propose que tous les laboratoires évaluant la réponse moléculaire profonde de la LMC, utilise le plasmide ERM-AD623, il renferme ces trois gènes de contrôle. L'utilisation de ce plasmide éviterait d'avoir recours au facteur de conversion, permettrait de faire des comparaisons inter-laboratoires en établissant des correspondances entre les gènes de référence, et de faire des études multicentriques prospectives plus aisément. Seulement nos résultats montrent qu'il faut un calcul normalisé pour avoir des résultats approximativement identiques entre des plasmides avec facteur de conversion et le plasmide ERM-AD623. L'utilisation du plasmide ERM-AD623 ne résout donc pas l'utilisation du facteur de conversion. L'avantage du plasmide ERM-AD623 est qu'il permet d'amplifier ABL1, GUSB, BCR, BCR-ABL1 (p210) mais pas BCR-ABL1p190 et 230.

L'écueil à l'utilisation du plasmide ERM-AD623 ne sera pas seulement pour une raison scientifique, mais aussi économique et de souveraineté. En effet les fabricants des plasmides sont une source de travail et de revenu d'argent. Ce sont peut-être ces raisons qui ont conduits l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à ne pas produire le premier panel génétique de référence pour la quantification de BCR-ABL1, mais à le confier à des fabricants nationaux (68).

Le préalable pour une comparaison des résultats inter-laboratoires, c'est de définir le type de prélèvement : sanguin ou médullaire ; les tubes de prélèvement : EDTA, Héparine etc. ; la méthode d'extraction des ARNm (69) : manuelle ou automatique ; la manière de doser et de conserver les ARNm.

Le nombre de copies d'ABL1 permet de discriminer les réponses moléculaires surtout celles de niveau cinq avec BCR-ABL1 indétectable. En réponse moléculaire profonde, quel est l'impact du nombre de copies d'ABL1 sur la survie sans évènements et la survie globale d'une leucémie myéloïde chronique traitée par des anti-tyrosines kinases et en réponse moléculaire profonde ? Des études prospectives ou surtout rétrospectives pourront répondre à cette question.

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

La polymerase chain reaction(PCR) en temps réel ou l'amplification quantitative en chaine par polymérase en temps réel à cinquante cycles permet de quantifier la réponse moléculaire de la leucémie myéloïde chronique traitée par des anti-tyrosines kinase, en réponse moléculaire profonde. Le résultat quantifié facilite la prise avec plus de conviction la décision sur la suite thérapeutique concernant le patient : suspendre ou poursuivre le traitement

L'augmentation du nombre de réplicats est meilleure mais le facteur limitant est l'augmentation du prix de l'examen. Au minimum deux réplicats sont nécessaires en réponse moléculaire profonde. L'utilisation du plasmide ERM-AD623 qui devrait permettre de s'affranchir de l'établissement du facteur de conversion n'est pas vérifié et mets en jeu des raisons économiques et de souveraineté. Pour les protocoles multicentriques, l'utilisation d'un type de plasmide comparable au plasmide ERM-AD623 et des mêmes protocoles depuis le prélèvement jusqu'au résultat final des PCR permettra de comparer les résultats. Nous avons déjà commencé à appliquer la PCR à Cinquante cycles et avec deux réplicats pour la leucémie myéloïde chronique en réponse moléculaire profonde. Nous allons l'étendre aux autres néoplasies myéloïdes chroniques et leucémies aiguës, lymphomes en réponse moléculaire profonde traités uniquement par chimiothérapie ou bien après transplantation. La correspondance entre le gène de contrôle ABL1 et GUSB a été déjà établit par le groupe EUTOS, des travaux ultérieurs devront établir la correspondance entre ABL1 et BCR d'une part et entre BCR et GUSB. Si ce travail est fait, un panel d'experts statuera sur le type de plasmide à utiliser pour un usage multicentrique.

REFERENCES

1-Bennett J. H.

Case of hypertrophy of spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood.

Edinburgh Med surg. J64:413, 1845.

2-Virchow R.

Weisses Blut und Milztumoren.

Med Ztg15:156, 1863.

3-Piller G.J.

Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950.

Br J Haematol. 2001; 112(2):282-92.

4-Tefferi, A.

"The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek."

Leukemia 22(1): 3-13.).

5-Tefferi A.

Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances

Am J Hematol,2016;91(1):50-8

6-Leguay T., Mahon F.X.

Leucémie myéloïde chronique

EMC Hématologie 13-011 B10

7-Hoffmann VS, Bacarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D, Costeas P, Mayer J, Indrak K, Everaus H, Koskenvesa P, Guilhot J, Schubert-Fritschle G, Castagnetti F, Di Raimondo F, Lejniece S, Griskevicius L, Thielen N, Sacha T, Hellmann A, Turkina AG, Zaritskey A, Bogdanovic A, Sninska Z, Zupan I, Steegmann JL, Simonsson B, Clark RE, Covelli A, Guidi G, Hehlmann R.

The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries.

Leukemia. 2015 Jun; 29(6):1336-43.

8-Mendizabal AM , Younes N, Levine PH

Geographic and income variations in age at diagnosis and incidence of chronic myeloid leukemia.

Int J Hematol. 2016 Jan;103(1):70-8. doi: 10.1007/s12185-015-1893-y. Epub 2015 Nov 7.

9- Fall S., Ndiaye F.S.D., Dior O.D., Sall A.F., Sloma I., Touré-Fall A., Y. Keita

Leucémie myéloïde chronique des sujets jeunes : expérience dans une unité d'hématologie clinique au Sénégal

Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique Vol 3, (4), 2015, pp 170–174)

10- Sawadogo S; Hien M. F. ; Béogo R. ; Dao B.

Aspects épidémiologiques des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) dans le service d'hématologie du centre hospitalier universitaire Yalgado Ouédraogo (Chuyo).

Annales de l'Université de Ouagadougou – Série D, Vol. 010, déc. 201

11-Segbena A.Y., Kueviakoe I.M.D., Agbetiafa K., Padaro E., Layibo Y., Dorkenoo A., Agbo Y.M., Bories D.

Leucémie myéloïde chronique et Imatinib, expérience du CHU Campus de Lomé au Togo

Med sante Trop. 2012 ; 22(3) :307-11

12-Mahon FX, Etienne G.

Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy?

Clin Cancer Res. 2014 Jan 15;20(2):310-22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1988. Epub 2013 Oct 28

13-Bertacchini J, Ketabchi N, Mediani L, Capitani S, Marmioli S, Saki N.

Inhibition of Ras-mediated signaling pathways in CML stem cells.

Cell Oncol. 2015; 38(6):407-18.

14-Zhu X, Zhao H, Lin Z, Zhang G.

Functional studies of miR-130a on the inhibitory pathways of apoptosis in patients with chronic myeloid leukemia.

Cancer Gene Ther. 2015; 22(12):573-80.

15-Zhu B, Zhang J, Chen J, Li C, Wang X.

Molecular biological characteristics of the recruitment of hematopoietic stem cells from bone marrow niche in chronic myeloid leukemia.

Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(10):12595-607. eCollection 2015.

16-Sun WT, Xiang W, Ng BL, Asari K, Bunte RM, Casey PJ, Wang M, Chuah C.

Inhibition of isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase augments BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibition-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia.

Exp Hematol. 2015 Dec 17. pii: S0301-472X(15)00799-7. doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.002. [Epub ahead of print]

17-Bazi A, Keramati MR, Gholamin M

Role of Oxidative Stress in Modulating Unfolded Protein Response Activity in Chronic Myeloid Leukemia Cell Line.

Iran Biomed J. 2016;20(1):63-7. Epub 2015 Oct 3.

18-Molli PR, Pradhan MB, Ingle AD, Naik NR.

Preclinical model for identification of therapeutic targets for CML offers clues for handling imatinib resistance.

Biomed Pharmacother. 2015 Jul;73:160-70. doi: 10.1016/j.biopha.2015.06.004. Epub 2015 Jun 19.

19-Huret J. L., Turhan A. G. In

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

20-Cross N.C.P.

Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program

Best Practice and research clinical Haematology 22(2009)355-365

21-Sawadogo S., Hien F., Drabo Y. J.

Analyse clinique, hématologique, cytogénétique de quatre variants complexes cytogénétiques de leucémie myéloïde chronique

Annales de l'Université de Ouagadougou – Série D, Vol. 010, déc. 2011.

22-Kokate P, Dalvi R, Mandava S.

A complex three-way translocation with deletion of the TP53 gene in a blast crisis chronic myeloid leukemia patient.

J Cancer Res Ther. 2015; 11(4):1037. doi: 10.4103/0973-1482.144372.

23- Valencia A., Cervera J., Such E., Barranga E., Bolufer P., Fuster O., Collado R., Martinez J., and Sanz M.A..

Complex Variant t (9, 22) chromosome translocation in five cases of chronic myeloid leukemia

Advances in Hematology Volume 2009 (2009), article ID 187125, 4 pages
doi:10.1155/2009/187125.

24-Kubota Y.

Letter to the editor:

Chronic myeloid Leukemia with a novel four-way t (6; 13; 9; 22) (p21; q32; q34; q 11.2) successfully treated with Imatinib mesylate.

Cancer Genetics and Cytogenetics 201(2010) 135-136.

25-Peter H. Fitzgerald

Complex Ph translocations in chronic myeloid leukemia

Cancer genet cytogenet ; 1991; 55:129-131.

26-Morris CM., Rosman I., Susan A. Archer S. A., Cochrane J. M., Fitzgerald P.

A cytogenetic and molecular analysis of five Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid Leukemia

Cancer Genet Cytogenet 1988;35:179-197.

27-De Braekeleer M.

Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid Leukemia.

Cytogenet Cell Genet 1987;44:215-22.

28-Virgili A., Brazma D., Reid A. G, Howard-Reeves J., Valgañón M., Chanalaris A., et al

Fish mapping of Philadelphia negative bcr/abl1 positive CML *Molecular*

Cytogenetics 2008, 1:14.

29-Virgili A, Brazma D., Reid A.G., Howard-Reeves J., Valgañón M.,¹ Chanalaris A. , De Melo V.A.S, Marin D., Apperley J.F., Grace C., and Nacheva E.P.

FISH mapping of Philadelphia negative *BCR/ABL1* positive CML

Mol Cytogenet. 2008; 1: 14.)

30-Hochhaus A., Reiter A., Skladny H., Melo J.V., Sick C., Berger U., Guo J.Q., Arlinghaus R.B., Hehlmann B., Goldman J.M., and Cross N.C.

A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia

Blood: 1996; 88 (6):2236-2240)

31-Branford S, Rudzki Z, Hughes TP.

A novel BCR-ABL transcript (e8a2) with the insertion of an inverted sequence of ABL intron 1b in a patient with Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia.

Br J Haematol. 2000 Jun; 109(3):635-7,

32-Mughal T. I., Goldman J. M.

Chronic myeloid leukemia

Encyclopedia of life sciences 2002 ,John Willey and sons.

33-Samali A., Gorman A.M., Cotter T.G.

Role of Bcr-Abl Kinase in Resistance to Apoptosis

Advances in Pharmacology Vol 41, 1997, pp 533–552

34- Leibundgut E.O, Jotterand M., Rigamonti V., Parlier V., Mühlematter D., Tobler A., and Solenthaler M.

A novel BCR-ABL transcript e2a2 in a chronic myelogenous leukaemia patient with a duplicated Ph-chromosome and monosomy 7

British Journal of Haematology, 1999, 106: 1041-1044

35-Shuai K., Halpern J., ten Hoeve J., Rao X., Sawyers C.L.

Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia.

Oncogene. 1996 Jul 18;13(2):247-54.

36-Penserga E T P and Skorski T

Fusion tyrosine Kinases: a result and cause of genomic instability

Oncogene (2007) **26**, 11–20.,

37-Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek C L and Liu C

Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies

Leukemia (2003) **17**, 1211–1262.

38-Salesse S., Verfaillie C.M.

BCR/ABL-mediated Increased Expression of Multiple Known and Novel Genes That May Contribute to the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukemia

Mol Cancer Ther (2003) 2; 173)

39-Thijsen SFT. Schuurhuis G.J., Van Oostveen J.W. and Ossenkoppele GJ.

Chronic myeloid leukemia from basics to bedside

Leukemia (1999) 13, 1646–1674

40- Gonon-Demoulian R.,Goldman J. M., Nicolini F. E.

Historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer

Bulletin du Cancer Volume 101, Issue 1, January 2014, 56–67.

41-Baccarani M., Saglio G., Goldman J, Andreas Hochhaus, Simonsson B.,Appelbaum F., Apperley J., Cervantes F., Cortes J., Deininger M., Gratwohl A., Guilhot F., Horowitz M., Hughes T., Kantarjian H., Larson R., Niederwieser D., Silver D., and Hehlmann R.

European LeukemiaNet. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia : recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.

Blood 2006 ; 108(6) : 1809-1820.

42-Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R; European LeukemiaNet

Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet.

J. Clin Oncol, 2009 ; 27(35) : 6041-6051.

43-Jabbour E, Kantarjian H.

Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring
Am J Hematol. 2016; 91(2):252-65.and management

44-Elliott M.A.,Tefferi A.

Chronic neutrophilic leukemia 2016: update on diagnosis, molecular genetics, prognosis and management.

AmJ

45- Angriman F¹, Gutierrez Acevedo MN, Rossi MS, Gimenez Conca AD, Otero V, Arbelbide JA, Michelángelo H.

Promyelocytic Blastic Crisis in Chronic Myeloid Leukemia During Imatinib Treatment.

Turk J Haematol. 2015 Jun;32(2):193-4)

46-Leguay T., Mahon F.X.

Leucémie myéloïde chronique
EMC Hématologie 13-011 B10).

47-Eskazan A. E., Soysal T.

Radotinib in the treatment of chronic phase chronic myeloid leukemia patients.

Haematologica. 2015 Jan; 100(1) : e39.

48-Jain P., Kantarjian H,Jabbour E., Gonzalez G.N., Borthakur G, Pemmaraju N., Daver N., Gachimova E., Ferrajoli A., Kornblau S.,Ravandi F,O'Brien S,Cortes J.

Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: a phase 2 study

LancetHaematol.2015; 2(9):376-383.

49-Ling D., Pike C.J., and Salvaterra P.M.

Deconvolution of the confounding variations for reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction by separate analysis of biological replicate data

Anal Biochem. 2012; 427(1): 21–25.)

50-Bansal A., Radich J.

Is cure for chronic myeloid leukemia possible in the tyrosine kinase inhibitors era

Curr Opin Hematol .2016; 23(2):115-20

51-Larson R.A.

Is there a best TKI for chronic phase CML?

Blood 2015 19; 126(21):2370-5

52-Gambacorti-Passerini C, Aroldi A, Cordani N., Piazza R.

Chronic myeloid leukemia: second-line drugs of choice.

Am J Hematol. 2016; 91(1):67-75

53-Philippe Rousselot, Franck Nicolini

Le mieux est-il l'ennemi du bien ?

Hématologie 2010 16(6).

54-Baccarani M., Deininger M.W., Gianantonio R.,Hochhans A.,Soverini S., Apperley J.F.,Cervantes F.,Clark R.E.,Cortes J.E.,Guilhot F.,Hjorth-Hansen H.,Hughes T.P.,Kantarjian H.M.,Kim D.W.,LarsonR.A.,Lipton J.H.,Mahon F.X.,Martineli G.,Mayer J.,Müller M.C.,Niederwieser D.,Pane F.,Radich J.P.,Rousselot P.,Saglio G.,Saußebe S.,Schiffer C.,Silver R.,Simonsson B.,Stegmann J.L.,Goldman J.M.,Hehlmann R.

European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013.

Blood 122: 872-884.

55-John A.M., Thomas N.S.B., Mufti G.J., Padua R.A.

Targeted therapies in myeloid leukemia

Seminars in Cancer Biology Vol. 14, (1), 2004, pp 41–62

56-Alikan M. Ellery P. Forbes M. Gerrard G, Kasperaviciute D., Sosinsky A.

Mueller M,Whale A.S., Milojkovic D.,Apperley J,Huggett,Foroni L,Reid A.G.

Next-Generation sequencing-Assisted DNA-Based Digital PCR for a personalized Approach to the detection and quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia Patients.

J Mol Diagn .2016; 18(2):176-189

57-Prost S., Relouzat F., Spentchian M., Ouzegdouh Y., Saliba J., Massonnet G.

Beressi JP., Verhoeyen E., Ragueneau V., Maneglier B., Castaigne S.,

Chomienne C., Chrétien S., Rousselot P., Leboulch P.

Erosion of chronic myeloid leukemia stem cell pool by PPAR γ agonists

Nature 2015, 525, 380–383

58-Branford S., Fletcher L., Cross N. C. P., Müller M. C., Hochlans A., Kim D.

W.,Jerald P.,Saglio G.,Pane F.,Kamel-Reid S.,Lynn Wang Y.,Press R.D.,Lynch

K.,Rudzki Z.,Goldman J.M., Hughes T.

Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials.

Blood 2008 112: 3330-3338.

59-Mauté C., Nibourel O., Réa D., Coiteux V., Gradel N., Prudhomme C., Cayuela JM , GBMHM

Calibration of BCR-ABL1 mRNA quantification methods using genetic reference materials is valid strategy to report results on the international scale.

Clinical Biochemistry 47(2014)1333-1336.

60-Cross NCP, White HE, Colomer D., Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E. Lange T.,Lion T.,Machova Polakova K.,Dulucq S.,Martinelli G.,Oppliger Leibundgut E., PallisgaardN.,Barbany G.,Sacha T.,Talmaci R., Izzo B.,Saglio G., Pane F.,Müller M.C., Hochhaus A.

Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia.

Leukemia (2015) 29,999-1003.

61-Baccarani M., Saglio S., Goldman J., Hochhaus A., Simonsson B., Appelbaum F., Apperley J., Cervantes F., Cortes J., Deininger M., Gratwohl A., Guilhot F., Horowitz M., Hughes T., Kantarjian H., Larson R., Niederwieser D., Silver R., and Hehlmann R.

Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet

Blood. 2006 Sep 15; 108(6):1809-20.

62-Latham S.,Bartley PA,Budgen B,Ross DM,Hughes E,Branford S, White D,HughesTP,Morley A.A.

BCR-ABL1 expression ,RT-qPCR and treatment decisions in chronic myeloid leukemia.

J Clin Pathol. 2016 feb 2. Pii :jclinpath-2015-203538.

63-Delabesse E., Asnafi V., Macintyre E.

Application à l'hématologie maligne des techniques de biologie moléculaire

Transfusion Clinique et Biologique 10 (2003) 335–352.

64-Ling D., Pike C.J., and Salvaterra P.M.

Deconvolution of the confounding variations for reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction by separate analysis of biological replicate data

Anal Biochem. 2012; 427(1): 21–25.)

65-Beillard E., Pallisgaard N., Van der Veijden V. H. J., Bi W., Dee R, Van der schoot E. ,Delabesse E., Macintyre E.,Gottardi E.,Saglio G.,Watzinger F.,Lion T., Van Dongen JJM.,Hokland P.,Gabert J.

Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)-a Europe Against cancer program.
Leukemia (2003) 17, 2474-2486.

66-White H., Deprez L., Corbisier P., Hall V., Lin F., Mazoua S., Trapmann S., Aggerholm A., Andrikovics H., Akiki S., Babany G., Boeckx N., Bench A., Catherwood M., Cayuela J.M., Chudleigh S., Clench T., Colomer D., Daraio F., Dulucq S., Farrugia J., Fletcher L., Foroni L., Ganderton R., Gerrard G., Gineikiene E., Hayette S., El Housni H., Izzo B., Jansson M., Johnels P., Jurcek T., Kairisto V., Kim D.W., Lange T., Lion T., Polakova K.M., Martinelli G., McCarron S., Merle P.A., Milner B., Mitterbauer-Hohendanner G., Nagar M., Nickless G., Nomdedéu J., Nymoén D.A., Leibundgut E.O., Ozbek U., Pajic T., Pfeifer H., Preudhomme C., Raudsepp K., Romeo G., Sacha T., Talmaci R., Touloumenidou T., Van der velden V.H.J., Waits P., Wang L., Wilkinson E., Wilson G., Wren D., Zadro R., Ziermann J., Zoi K., Müller M C, Hochhaus A., Schimmel H., Cross N.C.P., Emons H.

A certified plasmid reference material for the standardization of *BCR-ABL1* mRNA quantification by real-time quantitative PCR Open.

Leukemia (2015) 29, 369–376.

67-ERM-AD623

Certificate of analysis Joint research centre.

INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENTS.

68-White H. E., Matejtschuk P., Rigsby P., Gabert J. Lin F., Wang Y. L., Branford S., Müller M.C., Beaufils N., Beillard E., Colomer D., Dvorakova D., Ehrencrona H., Hyun-Gyung G., ElHousni H., Jones D., Kairisto V., Kamel-Reid S., Dong-Wong K., Langabeer S., Ma E.S.K., Press R.D., Giuliana R., Wang L., Zoi K., Hughes T., Saglio G., Hochhaus A., Goldman J.M., Metcalfe P., Cross N.C.P.

Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA.

Blood 2010 ;116(22):111-117.

69-Bastard J. P., Chambert S., Ceppa F., Coude M., Grapez E., Loric S., et al

Les méthodes d'extraction et de purification des ARN.

Annales de Biologie Clinique. 2002;60(5):513-23.

70-Van der Velden V H J , Hochhaus A, Cazzaniga G , Szczepanski T, Gabert J and van Dongen J. J. M.

Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects

Leukemia 2003, 17: 1013–1034. doi:10.1038/sj.leu.2402922

71-Schüler F., Dölken G.

Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR

Clinica Chimica Acta Vol 363, Issues 1–2, 2006, pp147–156

Annexe Publications

1-Sawadogo S, Hien FM, Ouédraogo MS, Drabo YJ.
Evolution of chronic myeloid leukemia on nilotinib after failure of imatinib;
Pan Afr Med J. 2014; 18:142. doi: 10.11604/pamj.2014.18.142.3308. eCollection 2014. PMID: 25419280.

2-Sawadogo S, Hien FM, Béogo R, Toguyeni A, Ouédraogo GA.
Particular evolution of complex cytogenetic variants of chronic myeloid leukemia treated with imatinib.
Pan Afr Med J. 2013;15:132. doi: 10.11604/pamj.2013.15.132.2207. eCollection 2013. PMID: 24319522.

3-SAWADOGO S., HIEN F., DRABO Y.J.
Analyse clinique, hématologique, cytogénétique de quatre variants complexes cytogénétiques de leucémie myéloïde chronique ;
Annales de l'Université de Ouagadougou, 2011 – Série D, Vol. 010.

4-SAWADOGO S; HIEN M.F; BÉOGO R; DAO B.

Aspects épidémiologiques des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) dans le service d'hématologie du centre hospitalier universitaire yalgado Ouédraogo (CHUYO) ;

Annales de l'Université de Ouagadougou, 2011 – Série D, Vol. 010.