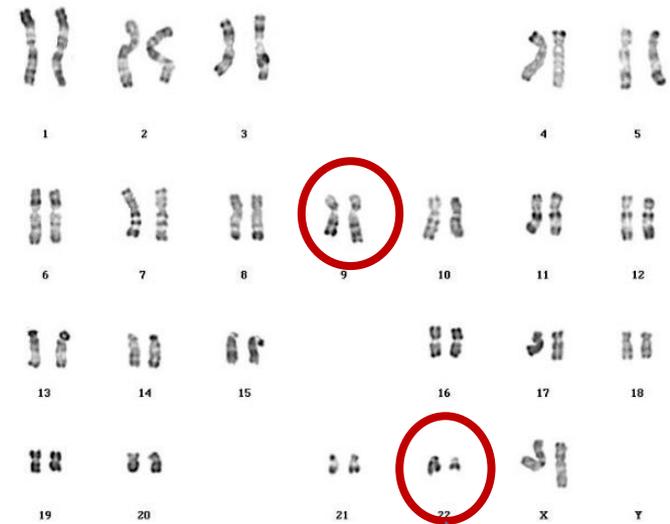
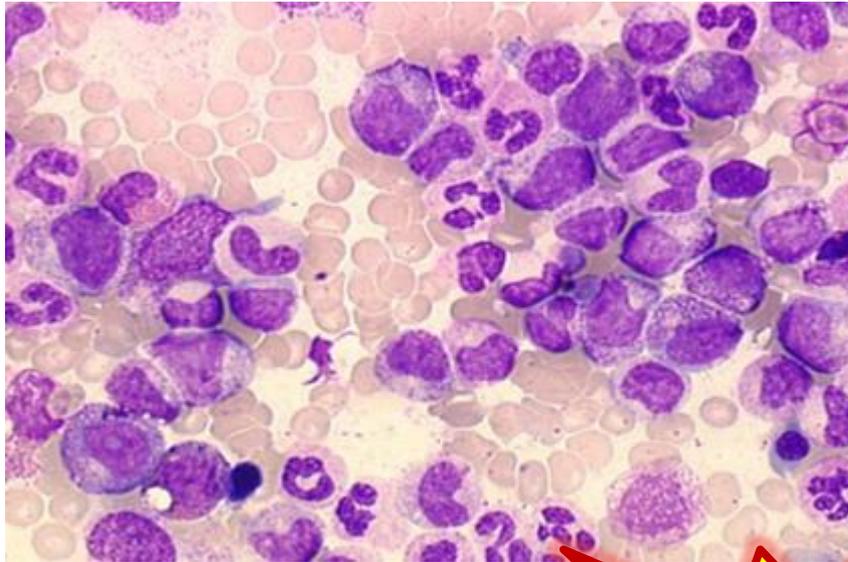


Evaluation d'une méthode  
Automatisée de Quantification du  
Transcrit BCR-ABL dans la LMC:  
Cepheid Xpert Monitor Assay™

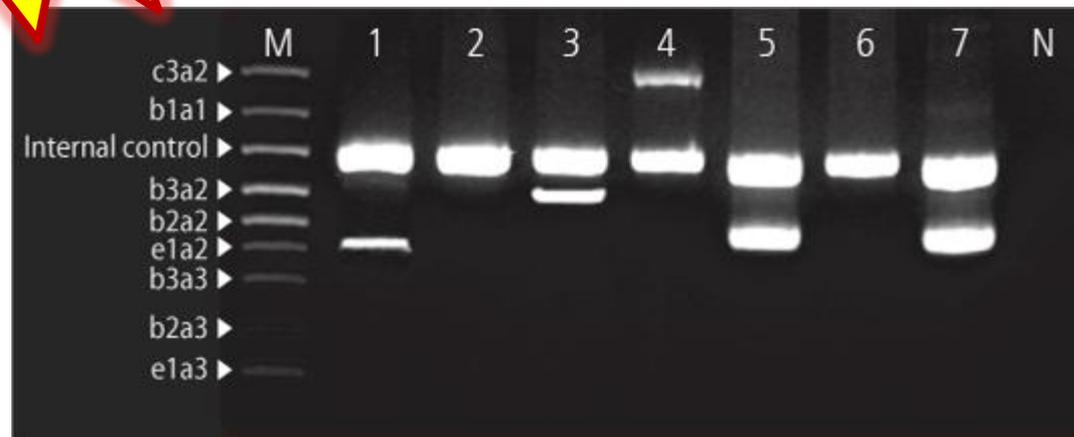
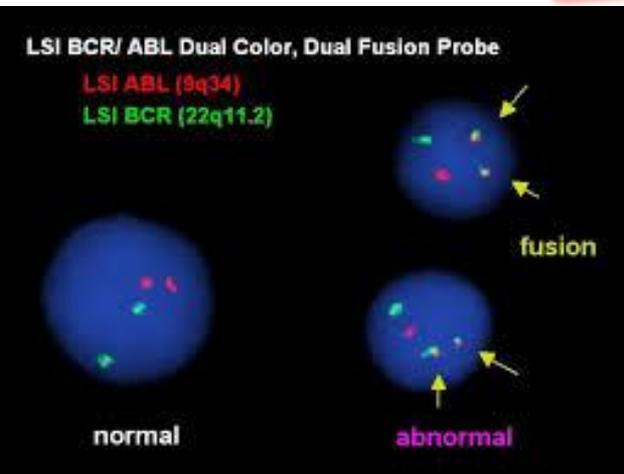
F. Harieche, N.Toukal, N.Abdennebi, F.Boukhemia,  
W.Assouak, R.Belhimeur, F.Zerhouni, R.M.Hamladji,  
R.Ahmed-Nacer

# Leucémie Myéloïde Chronique: LMC

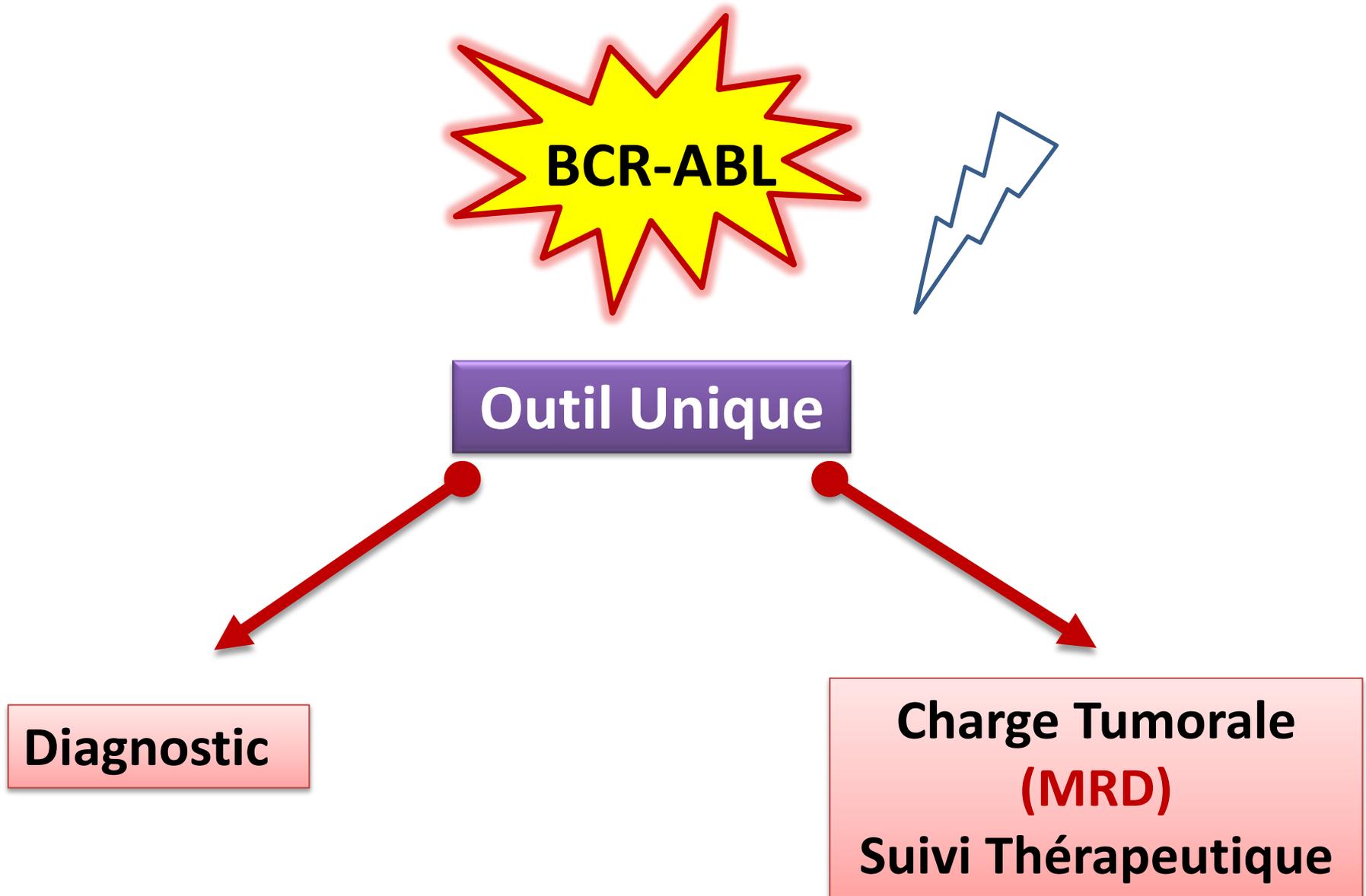


**BCR-ABL**

**PH1**

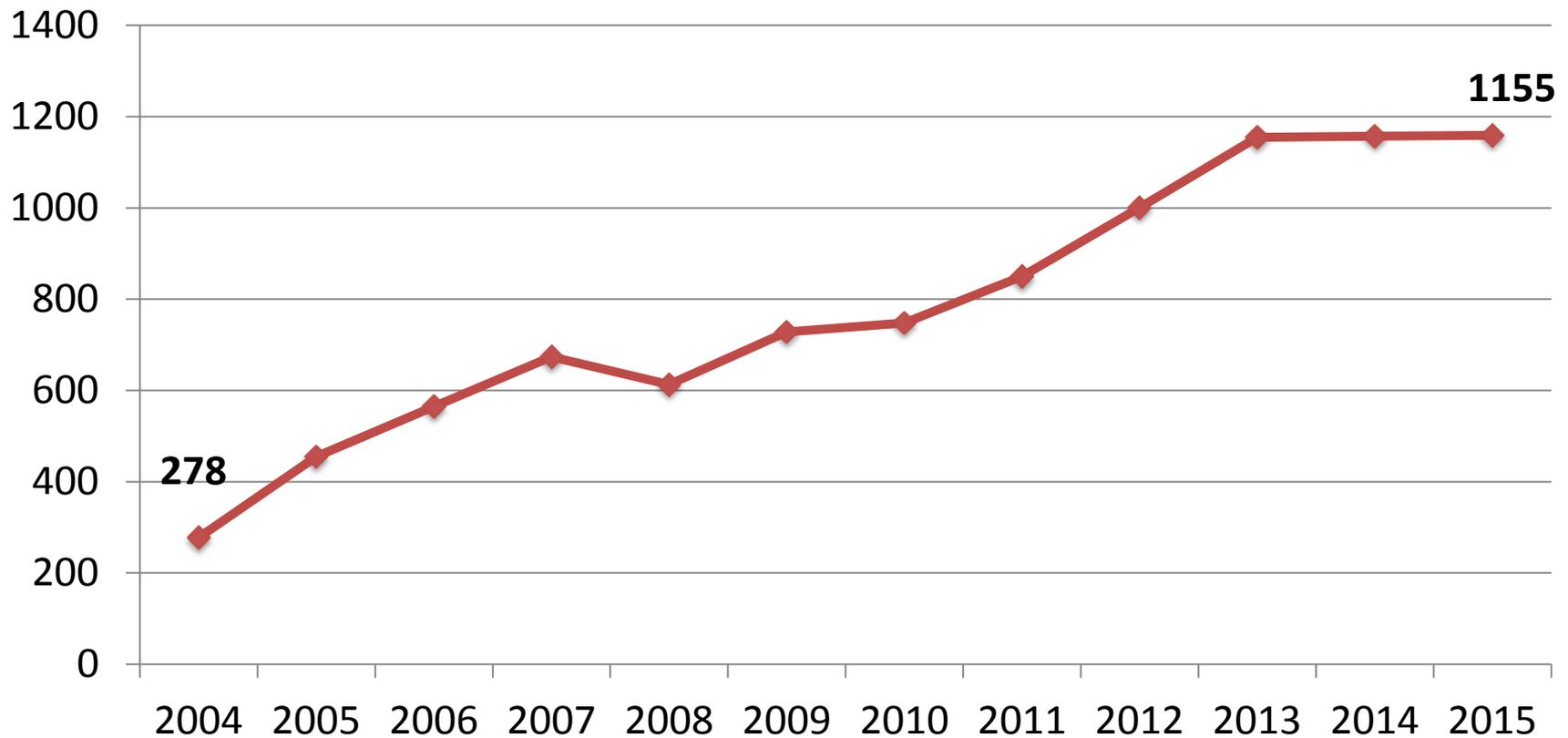


# Signature moléculaire de la LMC



# Demandes de Quantifications BCR-ABL CPMC

## BCR-ABL



# Monitoring moléculaire LMC (ITK)

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



Techniques **sensibles...!**

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

# Xpert BCR-ABL Monitor™ (Cepheid)



***Cartouche (IS) OMS***

- Simplification,
- Automatisation
- Standardisation

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

# Objectifs

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

Répartition des niveaux de réponse

Concordance des niveaux de réponse.

# Patients

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

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

# Echantillons biologiques

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



**EDTA**



**Citrate 3Na**

**Héparine : Ct décalés de 2 – 2.5**



RT-qPCR (EAC),



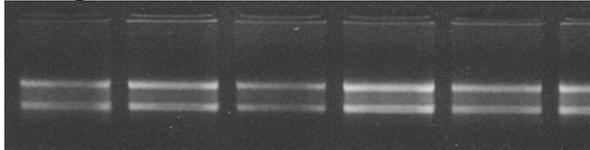
le système GenXpert: BCR-ABL (Gx)

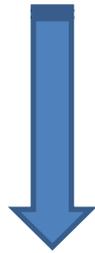
❖ **Analyse des réception, dans les 6 heures.**

❖ **Stables 24h à +4°C**

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

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

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

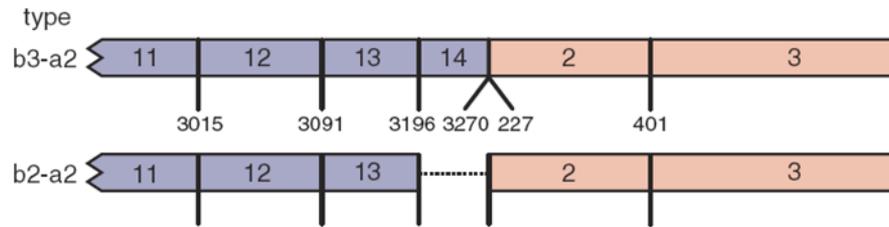


- Phase RT: cDNA
- PCR Quantitative en temps réel (Principe TaqMan)

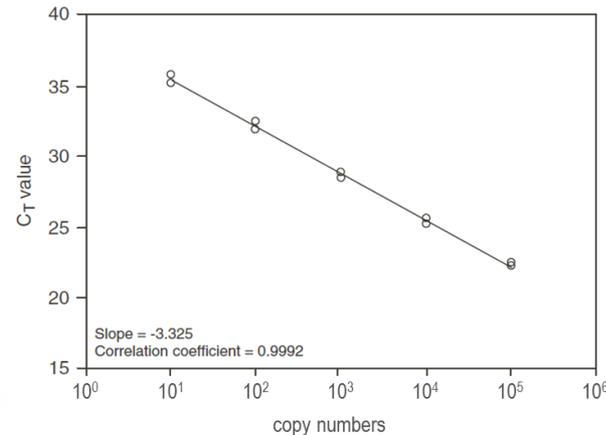
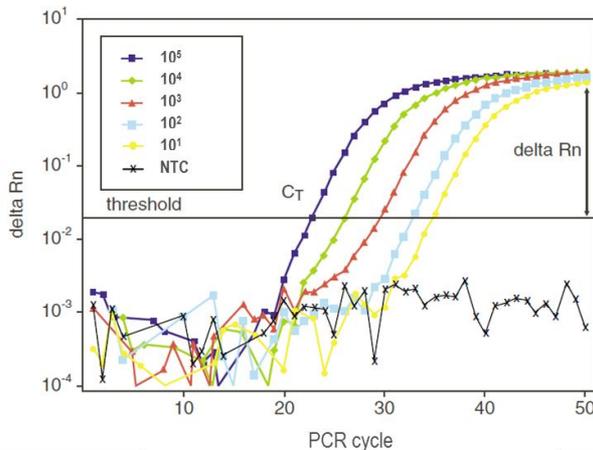
*Gene ABL: Control d'amplification in vitro*

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

M-bcr. *BCR-ABL* p210



*ABL* (9q34)

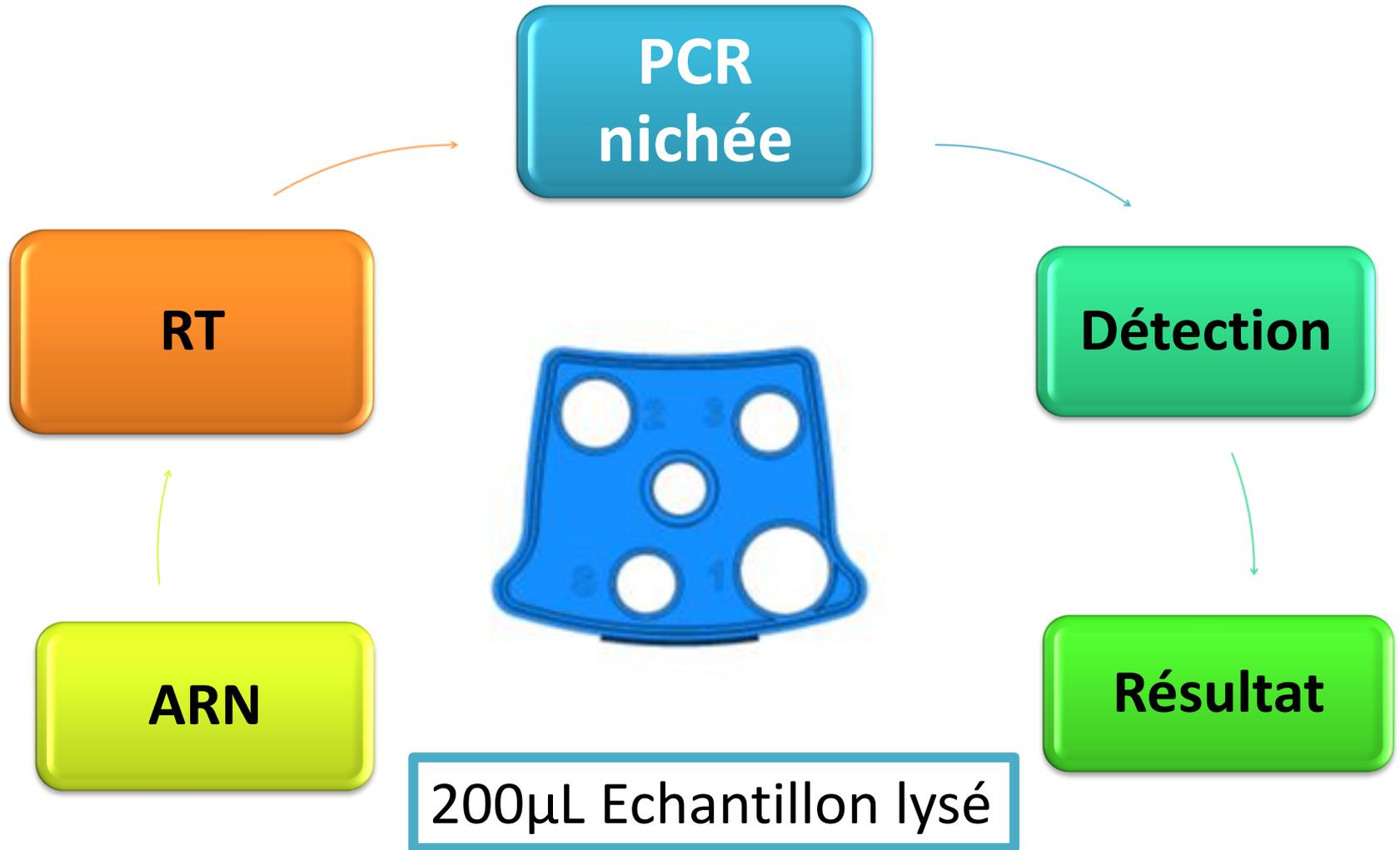


$$\frac{\text{BCR-ABL copy number}}{\text{Control Gene copy number}} \%$$

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

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

# Méthode Gx

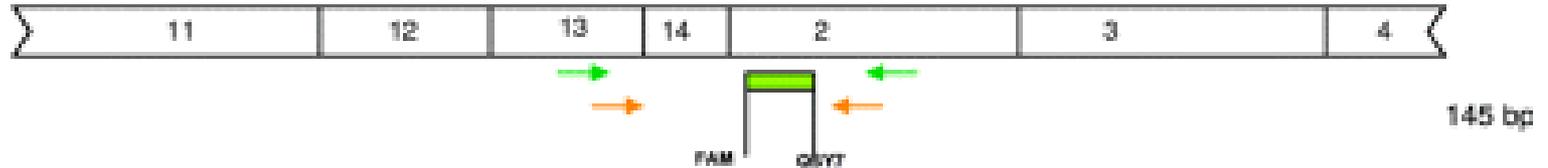


**2h:** ABL Contrôle Endogène et Normalisation des résultats.

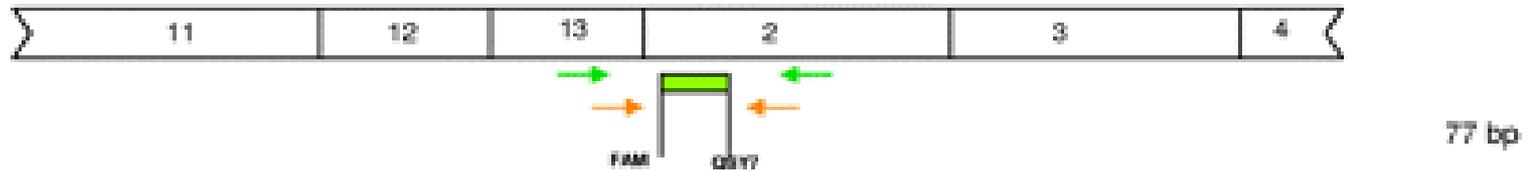
# Design (amorces et sondes)

## BCR-ABL

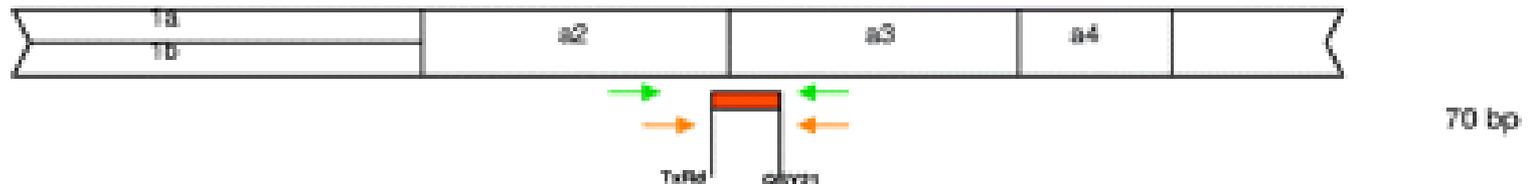
b3a2



b2a2



## ABL

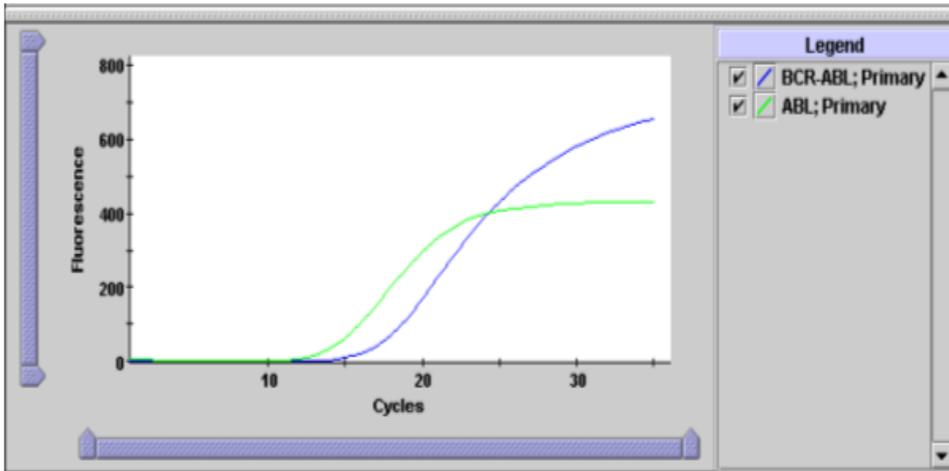


**Amorces externes: synthèse cDNA + 15 cycles de PCR.**

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

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

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



$$E\Delta Ct = 1.95$$

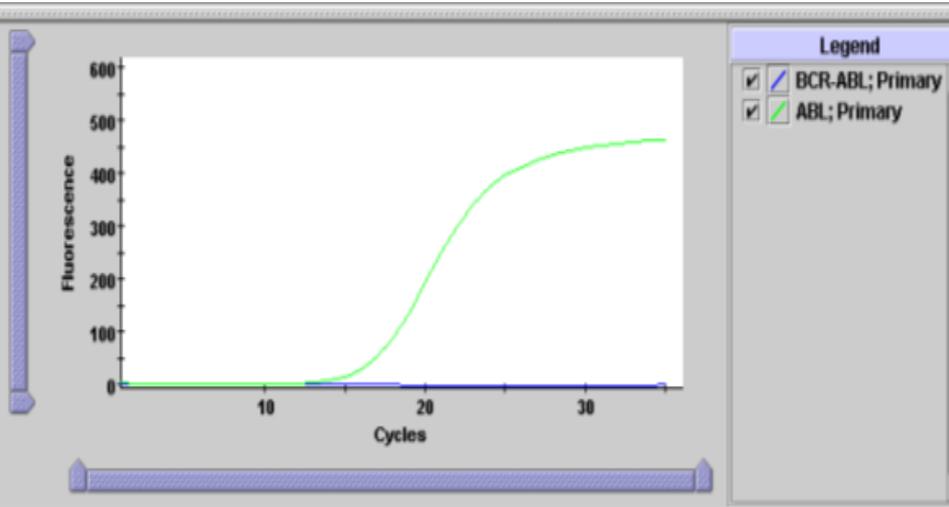
$$Ct ABL = 15$$

$$Ct BCR-ABL = 23$$

$$\Delta Ct = -8$$

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

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



$$E\Delta Ct = 2.0$$

$$Ct ABL = 12$$

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

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

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

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

# Résultats

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

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

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



Comparables pour 32 pts

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

## Résultats positifs/ Négatifs

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

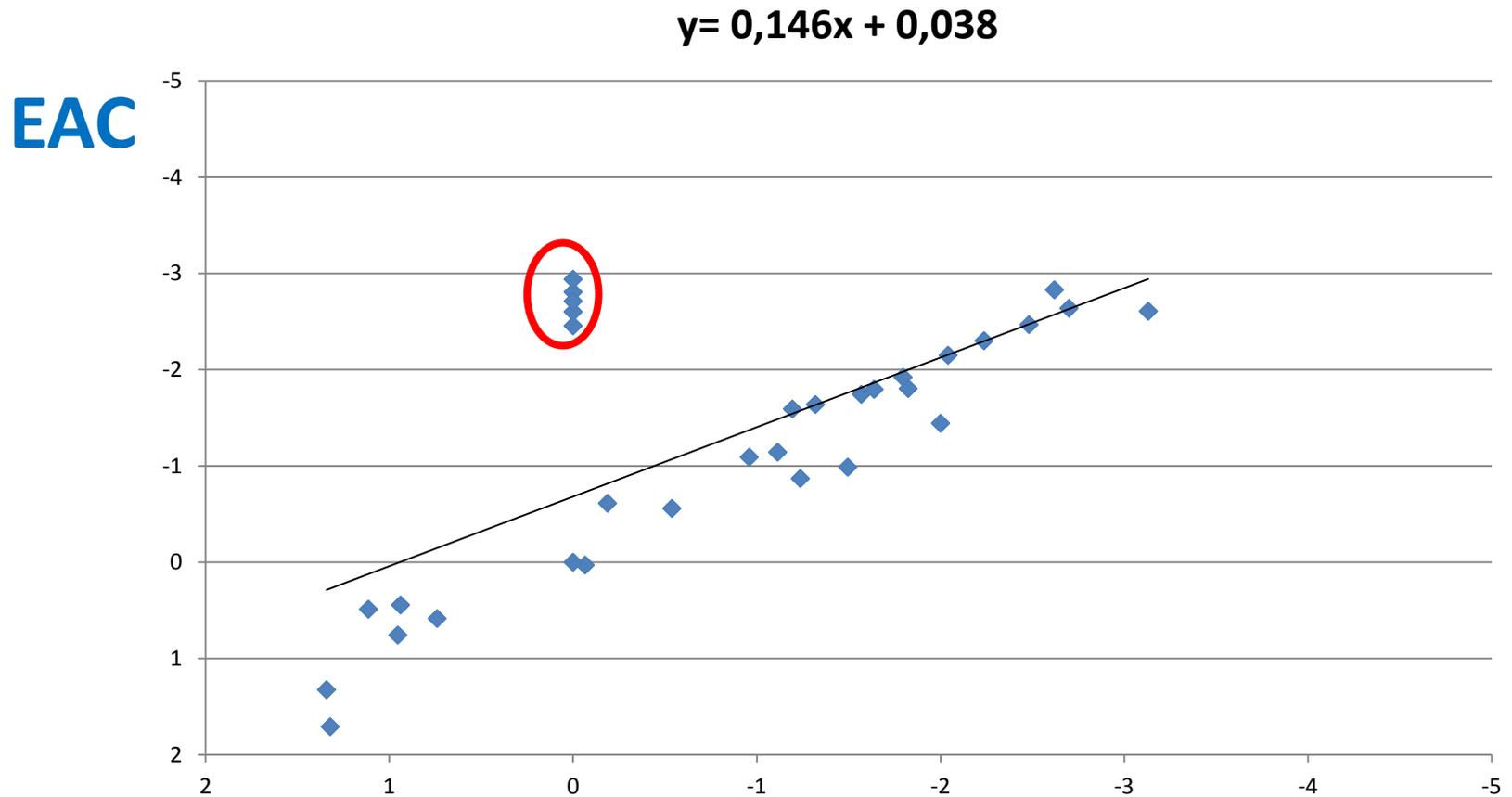
# Evaluation de la Concordance

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

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

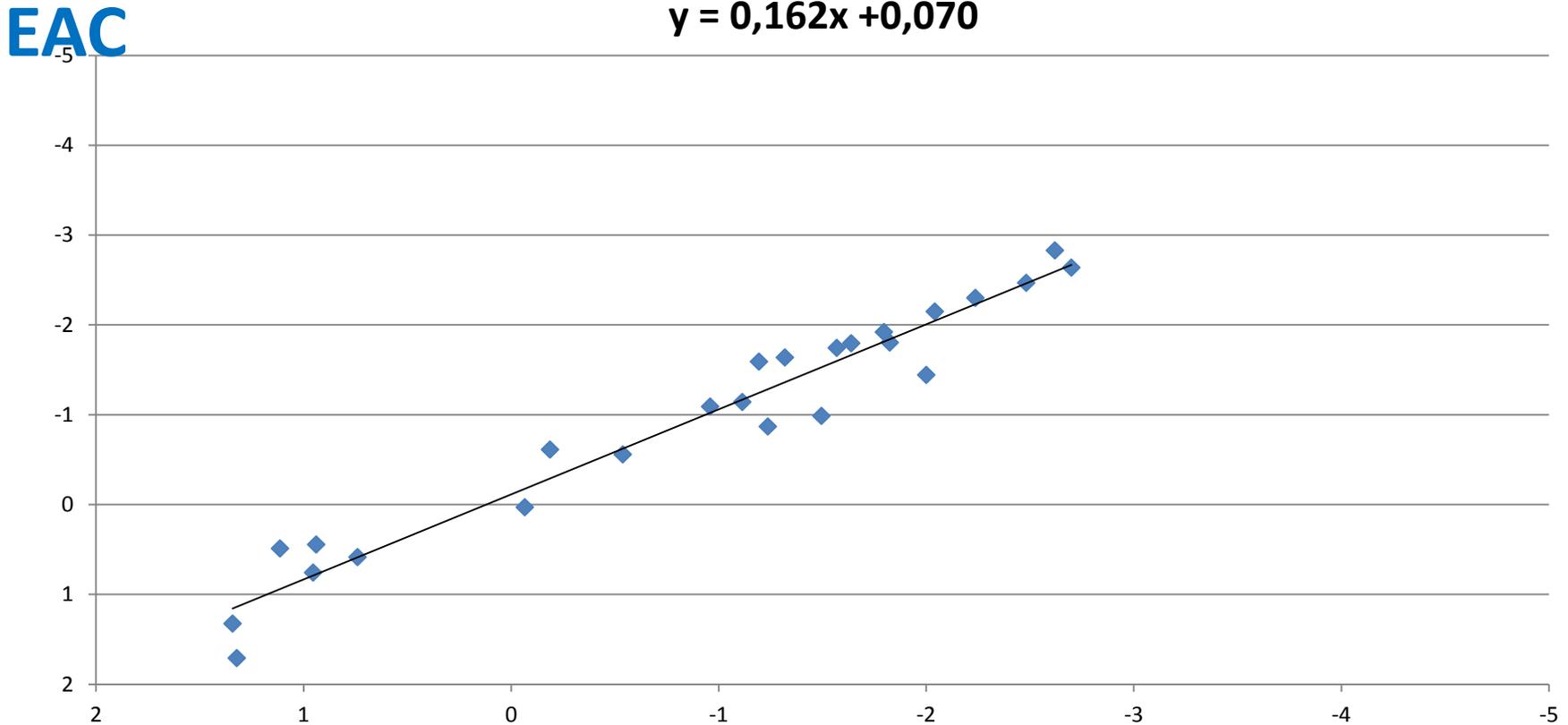
# Corrélation EAC vs Gx

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



# Corrélation EAC vs Gx

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



# Discussion

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

# Sensibilité: Limite de Détection:LOD

## ➡ Quantité d'ARN:

- mL sang (EAC).....
- $\mu$ L sang (Gx).

## ➡ Calcul ratio BCR-ABL/ABL

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

## Méthode Gx

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

## Avantages

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

## Limites

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

# Conclusion

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