Mise en place de la détection de la mutation JAK2 V617 en PCR digitale

Manon Duprat

▶ **To cite this version:**

Manon Duprat. Mise en place de la détection de la mutation JAK2 V617 en PCR digitale. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03216930

HAL Id: dumas-03216930

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03216930

Submitted on 4 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de l'archive ouverte DUMAS (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2021

MISE EN PLACE DE LA DETECTION DE LA MUTATION *JAK2* V617 EN PCR DIGITALE

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Manon DUPRAT

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 27/04/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M.MOSSUZ Pascal

Membres :

Mme.CAMPOS Lydia

Mme.FLANDRIN-GRESTA Pascale (directrice de thèse)

Mme.TONDEUR Sylvie

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2020 / 2021

Doyen de la Faculté - **Pr. Michel SEVE**

Vice-Doyen et Directrice des Etudes - **Mme Christine DEMEILLIERS**

Vice-Doyen Recherche – **Pr. Walid RACHIDI**

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
CDD	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUCH	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI - UMI 3265 EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emérite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
AHU	CHEVALIER	SIMON	TIMC IMAG
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale

MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
CDD	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, ThEMAS
PU	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042

PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	WARTHER	DAVID	DPM
Professeur Emérite	WOUESSIDJEWE	DENIS	-

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury :

Professeur Pascal MOSSUZ, Président de thèse

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury et d'évaluer ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Professeur Lydia CAMPOS

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour ces trois semestres passés dans votre service : ils ont été très riches en enseignements. Je suis ravie de pouvoir approfondir mes connaissances le semestre prochain au sein de votre laboratoire.

Docteur Pascale FLANDRIN-GRESTA, Directrice de thèse

Je vous remercie de m'avoir donné la chance de pouvoir mettre en place cette nouvelle technique et de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biologie moléculaire. Un grand merci pour tous les conseils que vous m'avez apportés ainsi que pour le temps accordé à m'enseigner les bases de cette discipline si intéressante. J'espère pouvoir travailler avec vous sur de nombreux nouveaux projets lors du prochain semestre.

Docteur Sylvie TONDEUR

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je garde un très bon souvenir de mon premier stage en hématologie pendant lequel vos conseils m'ont beaucoup apporté.

A mes parents,
Papa, **maman**, merci pour votre soutien infaillible durant toutes ces années. Vous avez cru en moi pendant toutes les étapes de ces longues études. Merci d'avoir su m'aider à sortir de ma bulle au moment opportun, ce qui m'a permis de m'épanouir et de trouver ma voie. Votre bienveillance, votre gentillesse et votre amour sont les meilleurs soutiens que je puisse avoir. Je ne peux espérer avoir de meilleurs parents que vous. Je vous remercie pour toute l'aide que vous nous apportez pour la garde de notre petite fille. Je suis sûre qu'elle gardera en souvenir de superbes moments passés avec ses formidables grands parents.
Maman, merci pour le temps passé à la relecture de ma thèse. Je reconnais que ce travail n'a pas dû être des plus agréables mais j'espère que tu accepteras de relire mon mémoire l'année prochaine !

A **mes grands-parents**
Vous n'êtes plus parmi nous mais vous resterez à jamais dans mes pensées.

A **Marie-Christine** et **Patrick**
Merci pour votre soutien et vos encouragements tout au long de mes études. Je te remercie Patrick pour l'aide précieuse que tu m'as apportée en statistiques, la réussite de ma première année de médecine est en partie grâce à toi. De plus, en rédigeant ce manuscrit, je ne peux m'empêcher de penser à toi qui a connu avant moi cette mutation.

A mes cousins **Maxime**, **Fanny** et **Victor** pour ces bons moments passés à Saint Fargeol et à Combloux.

A ma **marraine**
Merci d'avoir toujours été présente dans ma vie. Maintenant que tu t'es rapprochée de chez nous, j'espère que l'on pourra passer plein de bons moments ensemble.

A **Elodie**,
Merci pour ta bonne humeur, ton optimisme et ton sourire à toute épreuve. Vivement une nouvelle virée dans le sud pour te retrouver. Sans oublier **Charles-Hugo**, mon filleul, je n'en reviens pas que tu vas déjà avoir 18 ans.

A ma belle-famille, **Isabelle**, **Luc**, merci pour votre soutien et votre patience lors des nombreuses révisions pendant lesquelles j'ai envahi votre table de cuisine. Maintenant ce ne sont plus mes cours mais les jouets d'Albane qui recouvrent votre sol, merci pour ces merveilleux moments passés avec elle.

Pauline, **Evan**, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Vous êtes sur le point de vivre la plus merveilleuse des aventures, votre petit Jules sera à coup sûr le plus beau des petits garçons.

A **Marine**,
Sans toi je n'en serais pas là. Merci d'avoir été mon binôme pendant ces longues études qui touchent bientôt à leur fin. Je suis nostalgique en pensant à nos 5 années de fac. Je suis heureuse que tu puisses avoir une relation privilégiée avec Albane, merci d'avoir accepté d'être sa marraine.

A mes copines pharmaciennes,
Lisa, notre petit globetrotter, j'espère que tu finiras par trouver un pied à terre pas trop loin de chez nous pour que l'on puisse se voir plus souvent !
Sibyle, la meilleure des meilleurs. Je te souhaite le meilleur et bon courage dans le monde de la bactério.
Manon, après quelques péripéties j'espère que tu as enfin trouvé ton bonheur en niveau professionnel et personnel !
Merci pour tout et vivement que l'on puisse repartir découvrir de nouveaux endroits entre filles.

A nos amis
Romain, **Maïwen**, **Seb**, **Alex**, **Camille** et sans oublier **Eloïse**, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Il faut qu'on profite d'être encore une majorité d'adultes car dans peu de temps on va être envahis de plein de petites personnes qui vont transformer nos soirées en après-midis Barbie et Playmobil.

<u>A mes amis internes,</u>

Aux « anciens » :
Rémi, merci pour ta bonne humeur, ton humour et ta positivité. J'ai été très heureuse de partager les trois premiers semestres de mon internat avec toi. Bon courage pour ta nouvelle vie à Poitiers.
Mélanie, merci pour ton accueil chaleureux au laboratoire, ta gentillesse et ta bienveillance.
Lise, on aura préparé nos thèses en même temps avec nos moments de doute et nos ras le bol mais cette étape touche bientôt à sa fin et j'ai été bien contente de partager tout ça avec toi.
Joss, et **Alex** pour votre humour qui peut paraitre un peu déplacé au départ mais on s'habitue avec le temps ☺, **Johan** pour toutes tes connaissances en microbio, **Chloé D** pour m'avoir écoutée sur tous mes doutes existentiels, **Yara** pour tous tes

bons conseils et ta gentillesse, **Issam** et **Anna** on aura commencé ensemble mais on finira tous en décalé, **Vincent** et **Dom,** vous n'êtes pas restés très longtemps mais qu'est-ce qu'on s'est bien marré. Merci à tous pour ces débuts d'internat qui n'auraient pas pu être meilleurs.

Aux nouveaux
Anne-Laure et **Manon V**, merci de m'avoir supportée durant ces longues heures de voiture. Anne-Laure j'ai été très heureuse de partager le rôle d'interne référente avec toi !
Oulfa, **Chloé T**, **Claire**, **Mokhtar**, **Ziad**, **Fabien**, **Adrian**, **Sara**, **Daria** et **Estelle**, je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite de votre internat.

A l'équipe du laboratoire du CHU de Saint Etienne

A l'équipe du laboratoire d'hématologie, merci à **Anne-Camille**, **Coline**, **Lauren** pour le partage de vos connaissances, vos bons conseils et votre soutien lors de mes semestres en hématologie. **Pauline**, je voudrais te dire un grand merci pour tout ce que tu as fait pour m'aider, je t'en suis vraiment reconnaissante.
A **Françoise**, **Eliane**, **Catherine** et **Elisabeth** qui ont dû me supporter pendant mes nombreuses manips, merci à vous.
A tous les techniciens d'hématologie, c'est toujours un plaisir de travailler avec vous.

A **Anne**, **Stéphane** et les techniciennes d'immunologie qui ont été d'un grand soutien pendant ce dernier semestre. J'en garderais un très bon souvenir.

A tous les autres biologistes du laboratoire et plus particulièrement à **Mr Pozzetto** pour ses encouragements tout au long de mes semestres d'interne.

A **Julien**, mon chéri, merci de m'épauler depuis maintenant plus de 11 ans. Merci d'avoir accepté de me soutenir pendant ces longues études. Ces années passées avec toi ont été riches en découvertes et en émotions et je suis sûre que les années à venir ne seront que meilleures. Je te remercie d'être le super papa que tu es avec notre fille. Je t'aime.

A ma fille, **Albane**, tu es un concentré de bonheur qui est entré dans notre vie. Tu es venue agrandir notre famille et la renforcer. Je serai toujours présente pour toi et je te soutiendrai et te guiderai dans les choix que tu feras. Je t'aime

TABLE DES MATERES

TABLE DES MATERES 9

TABLE des ILLUSTRATIONS : Tableaux 14

TABLE des ILLUSTRATIONS : Figures 15

LISTE DES ABREVIATIONS 17

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION 19

1 Les syndromes myéloprolifératifs 19

1.1 Classification 19

1.2 Histoire 20

1.3 Epidémiologie des NMP Ph négatives 21

1.4 Mutations retrouvées dans les NMP 22

1.5 La mutation V617F 25

1.6 Diagnostic des NMP 30

1.6.1 La polyglobulie de Vaquez 30

1.6.2 La thrombocytémie essentielle 32

1.6.3 La myélofibrose primitive 33

1.7 Complications des NMP Ph négatives 33

1.8 *JAK2* V617F et thromboses 34

1.9 Pronostic 36

1.10 Traitements des NMP 38

2 Les techniques de PCR 40

2.1 La PCR quantitative en temps réel (qPCR) 41

2.2 La PCR digitale (dPCR) 43

2.2.1 Histoire et principe 43
2.2.2 Différentes techniques de compartimentation 44
2.2.3 Avantages et inconvénients 45
2.2.4 Utilisation de la PCR digitale pour la détection de *JAK2* V617F 46
3 La qualité au laboratoire 47
3.1 L'Organisation internationale de normalisation (ISO) 47
3.2 La norme ISO 15189 48
3.3 Association française de normalisation (AFNOR) 48
3.4 Comité français d'accréditation (COFRAC) 49
3.5 Demande d'accréditation 49
3.6 Surveillance de l'accréditation 50
3.7 Dossier de vérification/validation de méthode 50

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL : MISE EN PLACE DE LA RECHERCHE ET QUANTIFICATION DE LA MUTATION JAK2 V617F EN PCR DIGITALE 55

1 Objectifs 55
2 Etat des lieux de la prescription de la recherche de la mutation *JAK2* V617F au CHU de Saint Etienne 55
3 Matériels et méthodes 58
3.1 Les Automates et réactifs 58
3.1.1 Les lignées cellulaires 58
3.1.1.1 La lignée SET-2 58
3.1.1.2 La lignée U-937 58
3.1.2 Le mix de PCR 58
3.1.2.1 Les amorces 58

3.1.2.2 Le mix 59
3.1.3 Les automates 59
3.1.3.1 Le QXDx AutoDG (BioRad®) 59
3.1.3.2 Le QXDx 200 (BioRad®) 60
3.2 Mode opératoire 61
3.2.1 Résumé étapes opératoires 61
3.2.2 Extraction d'ADN 62
3.2.2.1 Sang total 62
3.2.2.2 Culots de cellules mononuclées obtenus à partir de sang ou de moelle osseuse 63
3.2.2.3 Culots cytogénétiques 63
3.2.3 Dosage de l'ADN 63
3.2.4 Préparation de la plaque de PCR 63
3.2.4.1 Généralités 63
3.2.4.2 Optimisation de la technique 65
3.2.5 Génération des gouttelettes 66
3.2.6 PCR 66
3.2.7 Lecture de fluorescence 67
3.3 Patients 67
4 Résultats 68
4.1 Résultats rendus par le QXDx 200 68
4.2 Optimisation de la technique 69
4.2.1 Tests quantités d'amorces 69
4.2.2 Test des quantités d'ADN 71
4.2.3 Test de la température d'hybridation 72
4.3 Dossier de validation de méthode 74

4.3.1 Répétabilité 74
4.3.2 Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire 75
4.3.3 Variabilité inter-opérateurs 76
4.3.4 Justesse 77
4.3.5 Exactitude 77
4.3.6 Sensibilité et spécificité analytique 80
4.3.7 Incertitudes 80
4.3.8 Etendue de mesure 82
4.3.8.1 La limite de détection (LOD) 82
4.3.8.2 La limite de quantification (LLOQ) 83
4.3.8.3 La limite supérieure de linéarité (ULOQ) 83
4.3.9 Comparaison de méthode 84
4.3.10 Interférences 87
4.3.11 Contamination 87
4.3.12 Robustesse et fiabilité des réactifs 89
4.3.13 Intervalles de référence 90
4.4 Patients avec faible nombre de copies en qPCR 90
4.5 Patients médecine thérapeutique 92

DISCUSSION 93

CONCLUSIONS 100

BIBLIOGRAPHIE 102

ANNEXES 112

Annexe 1 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus en PCR digitale pour patients avec un faible nombre de copies en PCR quantitative 113

Annexe 2 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus en PCR digitale pour patients de médecine thérapeutique 114

Annexe 3 : Patients de médecine thérapeutique avec évènement thrombotique et bilan de thrombophilie négatif 115

Annexe 4 : Dossier de validation de méthode 116

Annexe 5 : Mode opératoire – Recherche de la mutation *JAK2* V617F par PCR digitale 175

Annexe 6 : Fiche technique PCR Digitale Biorad® 186

Serment de Galien 189

TABLE des ILLUSTRATIONS : Tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la PV selon l'OMS 2016 (1) 31

Tableau 2 : Critères diagnostiques de la TE selon l'OMS 2016 (1) 32

Tableau 3 : Critères diagnostiques de la MFP selon l'OMS 2016 (1) 33

Tableau 4 : Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (103) 52

Tableau 5 : Plan de plaque pour le test quantités d'amorces et d'ADN 65

Tableau 6 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus avec 35 ng d'ADN 72

Tableau 7 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus avec 50 ng d'ADN 72

Tableau 8 : Résultats des tests de répétabilité 75

Tableau 9 : Résultats des tests de fidélité intermédiaire 76

Tableau 10 : Résultats des tests d'exactitude 79

Tableau 11 : Données de sensibilité et spécificité (VP = vrai positif, FP = faux positif, FN = faux négatif, VN = vrai négatif, VPP = valeur prédictive positive, VPN = valeur prédictive négative) 80

Tableau 12 : Données d'incertitude de mesure (UCIQ = écart type des CIQ, UEEQ = écart type des EEQ) 81

Tableau 13 : Fréquences alléliques obtenues pour le test de contamination inter-échantillon. 89

Tableau 14 : Synthèse des résultats rendus en fonction des ratios alléliques obtenus en dPCR 96

TABLE des ILLUSTRATIONS : Figures

Figure 1 : Distribution des mutations *JAK2*, *MPL* et *CALR* dans les NMP Philadelphie négatives (17). 23

Figure 2 : Représentation du développement des NMP (25) 25

Figure 3 : Représentation de la transduction du signal avec la mutation *JAK2* V617F (25)..... 26

Figure 4 : Représentation du gène *JAK2* 27

Figure 5 : Représentation des ratios alléliques en fonction des NMP (35). (sMF : myélofibroses secondaires post-PV ou post-TE)..... 29

Figure 6 : Principe de fonctionnement des sondes TaqMan® (81)..... 42

Figure 7 : Comparaison qPCR et dPCR pour la détection d'une cible rare (90). 46

Figure 8 : Cycle de vie d'une accréditation (98) 50

Figure 9 : Nombre de recherches de la mutation *JAK2* V617F et pourcentage de positifs sur les 5 dernières années au CHU de Saint Etienne 56

Figure 10 : Nombre d'échantillons positifs en fonction de l'âge des patients 57

Figure 11 : Répartition des recherches de la mutation *JAK2* V617F par service en 2019 au CHU de Saint Etienne..... 57

Figure 12 : Le QXDx AutoDG..... 60

Figure 13 : Le QXDx 200..... 61

Figure 14 : Résumé des étapes opératoires..... 62

Figure 15 : Nuages de points pour un puit après lecture de la fluorescence par le QXDx 200..... 69

Figure 16 : Résultats des tests des quantités d'amorces et d'ADN 70

Figure 17 : Nuages de points lors du test quantité d'amorce et d'ADN. 70

Figure 18 : Ratios alléliques obtenus avec 1 µL d'amorce 71

Figure 19 : Ratios alléliques en fonction de la température d'hybridation 73

Figure 20 : Nuages de points en fonction de la température d'hybridation 73

Figure 21 : Méthode du z-score pour le résultat des EEQ..... 78

Figure 22 : Résultats obtenus lors de la réalisation des tests d'étendue de mesure . 84

Figure 23 : Différences obtenues lors de la comparaison de méthodes 86

Figure 24 : Droite de régression obtenue lors de la comparaison de méthodes 86

Figure 25 : Plan de plaque du test de contamination..... 88

Figure 26 : Comparaison des résultats obtenus en dPCR et qPCR pour les patients avec 3 à 10 copies V617F en qPCR 92

Figure 27 : Comparaison des résultats d'exactitude entre la dPCR et la qPCR sur les trois dernières campagnes d'EEQ 95

Figure 28 : Nuages de points d'un patient avec une faible charge allélique pour la mutation *JAK2* V617F en dPCR..... 96

Figure 29 : Mutations décrites de part et d'autre de la position V617F du gène *JAK2* (mutations vertes : ne modifient pas la séquence d'acides aminés, mutations oranges : mutations faux-sens) 97

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

BOM : Biopsie ostéo-médullaire

CHIP : Clonal hematopoiesis of indeterminate potential

COFRAC : Comité Français d'accréditation

CRP : Protéine C-réactive

ddPCR : droplet digital PCR

dPCR : Digital PCR

EPO : Erythropoïétine

EPOR : Récepteur à l'érythropoïétine

G-CSF : Granulocyte conoly-stimulating factor

G-CSFR : Récepteur du G-CSF

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HB : hémoglobine

HCLA : Hématopoïèse clonale liée à l'âge

hsCRP : high-sensitivity CRP

HT : Hématocrite

ICLN : Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth

IEC : Commission électrotechnique internationale

IGF-1 : Insuline growth factor 1

IL : Interleukine

ISO : International Organization for Standardization

JAK : Janus kinase

LAL : Leucémie aigue lymphoide

LAM : Leucémie aigüe myéloïde

LDH : Lactate déshydrogénase

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LLOQ : Lower limit of quantification (limite de quantification)

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique

MFP : Myélofibrose primitive

NMP : Néoplasie myélorpolifération

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase chain reaction

PTX3 : Pentraxine 3

PV : Polyglobulie de vaquez

qPCR : PCR quantitative

RPM : Rotations par minute

SMP : Syndrome myéloprolifératif

STAT : Signal transducers and activators of transcription

TE : Thrombocytémie essentielle

TFPI : Tissue factor pathway inhibitor

ULOQ : Upper limit of quantification (limite de linéarité)

WT : Wild type

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

1 Les syndromes myéloprolifératifs

1.1 Classification

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) ou néoplasies myéloprolifératives (NMP), constituent un groupe de 7 entités bien différenciées depuis la nouvelle classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) 2016 (1) :

- Leucémie myéloïde chronique (LMC)
- Polyglobulie de Vaquez (PV)
- Thrombocytémie essentielle (TE)
- Myélofibrose primitive (MFP)
- Leucémie chronique à éosinophiles
- Leucémie chronique à neutrophiles
- Syndromes myéloprolifératifs chroniques inclassables.

La PV, la TE et la MFP constituent un groupe distinct appelé plus couramment les NMP classiques « *BCR-ABL* négatifs » ou « Philadelphie négatifs (Ph1 Neg) », qui les sépare de la LMC. Contrairement à cette dernière qui possède le chromosome Philadelphie, ces trois pathologies n'ont pas d'anomalie génétique récurrente.

Cette nouvelle classification est une révision de la classification OMS 2008 avec intégration de données morphologiques, phénotypiques, génétiques et moléculaires. Elle prend en compte également des évaluations cliniques et pronostiques. C'est suite à cette classification OMS 2008 que les NMP ont été considérées comme des cancers (1).

Les NMP sont des hémopathies malignes chroniques associées à des anomalies génétiques acquises qui confèrent aux cellules souches hématopoïétiques un avantage de prolifération et de survie. On retrouve dans ces pathologies une hypersensibilité des progéniteurs hématopoïétiques aux cytokines (Interleukine 3 (IL-3), Insuline Growth Factor 1 (IGF-1) ou encore granulocyte-macrophae colony-stimulating factor (GM-CSF)) et un échappement aux mécanismes de régulation (2).

La TE entraine une production anormale de plaquettes dans le sang et la moelle osseuse tandis que dans la PV, on retrouve une augmentation anormale des hématies dans le sang et la moelle osseuse avec parfois un taux élevé de leucocytes et de plaquettes. La MFP est quant à elle une forme plus agressive avec une fibrose de la moelle osseuse et une expansion de la lignée mégacaryocytaire.

1.2 Histoire

La LMC a été la première NMP à être découverte en 1845 par John Hughes Bennett (1812–1875) qui rapporte un cas d'hypertrophie de la rate et du foie dans lequel le décès a eu lieu par suppuration du sang. Ce n'est que 115 ans plus tard que Peter Nowell (1928-2016) et David Hungerford (1927-1993) ont mis en évidence l'anomalie cytogénétique spécifique de la LMC : le chromosome Philadelphie, résultant d'une translocation acquise t(9;22) (q34;q11). C'est la première anomalie génétique décrite spécifique d'une maladie (3).

C'est ensuite à la fin du XIXème siècle que la myélofibrose primitive et la polyglobulie vraie ont été mises en évidence. La première MFP a été décrite par Gustav Heuck (1854–1940) chez deux jeunes patients qui présentaient une fibrose médullaire et une hématopoïèse extra-médullaire. La PV a quant à elle été décrite par Louis Henri Vaquez (1860–1936) chez un homme de 40 ans avec une cyanose chronique, une dyspnée et des palpitations qu'il associa d'abord à une cardiopathie puis qui, suite à l'autopsie sans anomalie du cœur, fit l'hypothèse d'une

augmentation des globules rouges résultant d'une hyperactivité hématopoïétique (4).

La thrombocytémie essentielle a été décrite en 1934 par Emil Epstein (1875–1951) et Alfred Goedel. Leur patient présentait une forte thrombocytose, une érythrocytose et des saignements cutanéomuqueux fréquents (4).
Le concept de NMP a été introduit en 1951 par William Dameshek (1900-1969) qui a observé dans ces pathologies des caractéristiques cliniques et biologiques communes comme la splénomégalie, l'hyperplasie myéloïde ou un risque augmenté de thromboses. (4)

C'est seulement en février 2006 que 4 équipes dont celle de William Vainchenker ont décrit pour la première fois la mutation V617F de *JAK2*, 40 ans après la découverte de la translocation t(9;22) dans la LMC. (5)
Par la suite, d'autres mutations ont été découvertes dans ce groupe de NMP Philadelphie négatif :

- Juillet 2006 : Les mutations W515L ou W515K du gène *MPL* qui code pour le récepteur de la thrombopoïétine (6)
- 2007 : Les mutations de l'exon 12 du gène *JAK2* (7)
- 2013 : Les mutations du gène de la calréticuline (*CALR*) (8)

Ces mutations ont permis de diagnostiquer un plus grand nombre de NMP non LMC. Toutefois, environ 10 à 15 % des PV, TE ou MFP ne présentent aucune mutation sur ces trois gènes, on parle alors de NMP triples négatives.

1.3 Epidémiologie des NMP Ph négatives

Les NMP sont des pathologies rares, avec des taux d'incidence en France qui sont de 0.9/100000/an pour la PV (9), 1.5/100000/an pour la TE et 0.4/100000/an pour la MFP (10). Ce qui équivaut respectivement à environ 300, 1000 et 200 nouveaux cas par an en France.

Les NMP sont retrouvées en moyenne 1.3 fois plus chez les hommes que chez les femmes, à l'exception de la TE qui a une légère prédominance féminine.
L'âge médian de survenue est en moyenne de 70 ans, ce qui en fait des pathologies du sujet âgé (11,12).
Concernant la survie, la PV et la TE ont des taux de survie globale à 5 ans similaires, aux alentours de 95 %. On retrouve par contre un pronostic à long terme meilleur pour la PV avec une survie globale de 75 % à 15 ans contre 63 % pour la TE (10).
La MFP à un pronostic bien plus péjoratif, on retrouve en effet une survie globale de 55 % à 5 ans et seulement de 4 % à 15 ans en France (9).

1.4 Mutations retrouvées dans les NMP

Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans les néoplasies myéloprolifératives sont donc au nombre de trois :

- La mutation *JAK2* V617F retrouvée chez plus de 96 % des patients atteints de PV, 58 % des TE et 53 % des MFP (Figure 1)
- Les mutations dans l'exon 9 de *CALR* sont retrouvées respectivement dans environ 30 % et 25 % des MPF et TE (13–15) . Les deux principales mutations de *CALR* sont une délétion de 52 paires de bases (pb) qui est la mutation de type 1 et une insertion de 5pb, la mutation de type 2. La calréticuline est une protéine multifonctionnelle de liaison au calcium Ca^{2+} localisée dans le réticulum endoplasmique (14).
- Les mutations dans l'exon 10 de *MPL* sont retrouvées en plus faible proportion : 7 % dans les MFP et 4 % dans les TE. Ce sont des mutations gain de fonction du récepteur à la thrombopoïétine. Elles sont associées à une plus forte thrombocytose et une anémie plus sévère chez les patients porteurs.

Ces mutations sont dites « motrices » ou « drivers » car elles reproduisent un phénotype de NMP lorsqu'elles sont introduites dans des modèles murins (16).

Elles sont responsables de la myéloprolifération anormale observée dans ces pathologies.

En plus de ces trois mutations retrouvées dans les NMP Ph-, il existe aussi des mutations gain de fonction au niveau de l'exon 12 du gène *JAK2*. Celles-ci sont rares, retrouvées dans seulement 2 % des PV exemptes de la mutation V617F (7). Les patients porteurs d'une mutation de l'exon 12 sont généralement plus jeunes au moment du diagnostic mais présentent un pronostic similaire à celui de la mutation *JAK2* V617F (15).

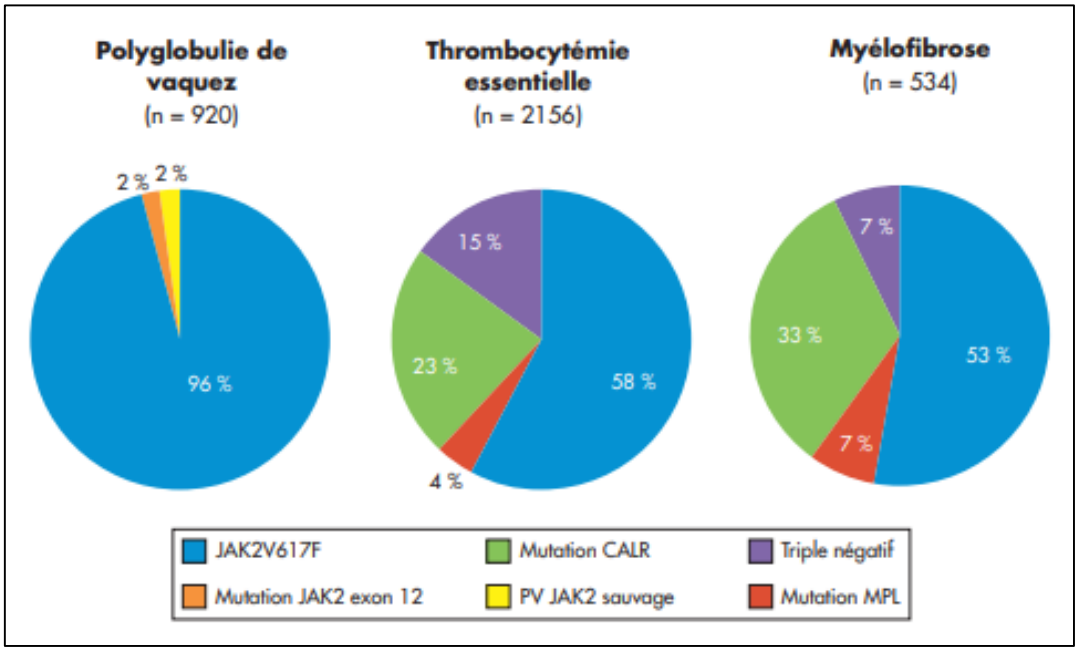


Figure 1 : Distribution des mutations *JAK2*, *MPL* et *CALR* dans les NMP Philadelphie négatives (17).

Les trois mutations principales conduisent à une activation anormale de la voie JAK/STAT. Cette voie JAK/STAT est entre autres responsable de la prolifération érythroïde, mégacaryocytaire et granuleuse via les récepteurs à l'érythropoïétine (EPOR), à la thrombopoïétine (MPL) et au G-CSF (G-CSFR).

La plupart du temps, on ne retrouve que l'une de ces mutations par patient ; elles ont dans un premier temps été décrites comme mutuellement exclusives (17)

mais ces dernières années, plusieurs cas de patients avec deux mutations coexistantes ont été décrits, la plupart chez des patients atteints de TE (18–20). De plus, il a été démontré que lorsque des patients se retrouvaient avec deux mutations « driver » dont *JAK2* V617F, la charge allélique de cette dernière était inférieure à 5 % (20–22).

Les NMP Ph- sont aussi caractérisées par la présence facultative de mutations somatiques associées de gènes régulateurs d'épigénétique comme *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*, *EZH2*, *DNMT3A* ou *TERT*, des régulateurs d'épissage (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) ou des facteurs transcriptionnels comme *TP53* ou *RUNX1* (23). Ces mutations associées peuvent jouer un rôle important dans la progression de la maladie soit en myélofibrose secondaire soit en hémopathie maligne aigue. Par exemple, les mutations d'*ASXL1* confèrent un risque important d'acutisation en leucémie aigüe myéloïde (24).

L'hématopoïèse clonale est possiblement la première étape du développement d'une NMP ou autre hémopathie (figure 2), on parle de CHIP : « clonal hematopoiesis of indeterminate potential » ou HCLA : « Hématopoïèse clonale liée à l'âge ». Les principales mutations impliquées dans cette étape sont celles de *TET2*, *DNMT3A* et *EZH2*. Ces deux dernières ont également été décrites chez des patients en transformation myélofibrotique.

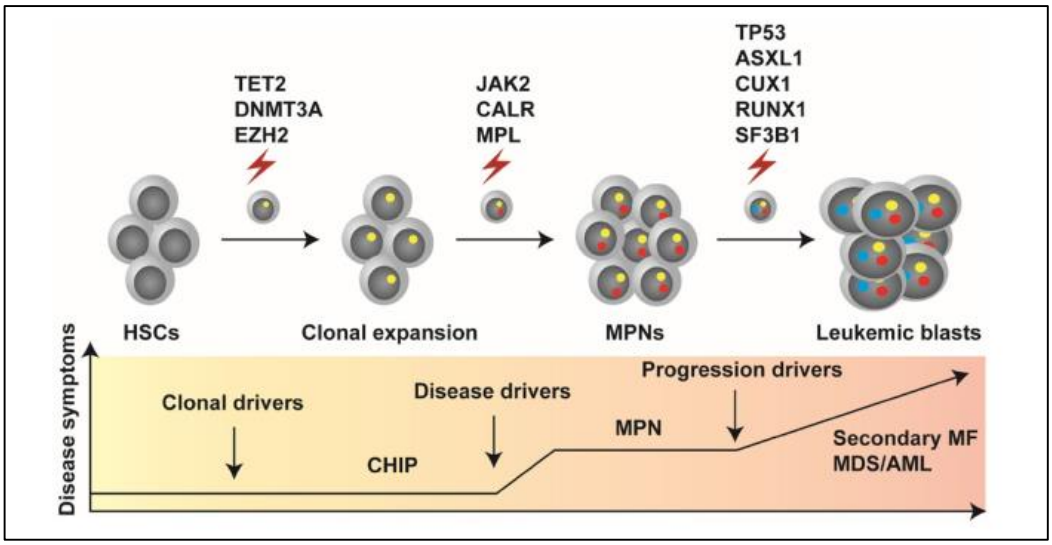


Figure 2 : Représentation du développement des NMP *(25)*

.

La plupart des anomalies moléculaires retrouvées dans les NMP correspondent à une activation d'une protéine kinase entrainant une indépendance et/ou une hypersensibilité aux facteurs de croissance.

1.5 La mutation V617F

JAK2 est une tyrosine kinase cytoplasmique qui joue un rôle dans la transduction du message de plusieurs facteurs de croissance hématopoïétiques (26) et donc dans la survie et la prolifération cellulaire. Elle fait partie de la famille des Janus Kinase avec JAK1, JAK3 et TYK2. Elle est constitutivement associée aux récepteurs de cytokines de type 1 comme les récepteurs de l'EPO (EPOR), de la thrombopoïétine (MPL), du G-CSF (G-CSFR) qui permettent respectivement l'expansion des lignées érythroïde, mégacaryocytaire et granulocytaire.

Dans les conditions physiologiques, après l'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif, les tyrosines kinases JAK sont phosphorylées ce qui entraine la phosphorylation et l'activation des STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) aboutissant à leur dimérisation. Ensuite, les STATs se déplacent dans le noyau pour réguler la transcription des gènes d'intérêt. En plus de cette action via les STATs, la signalisation en aval de JAK est également permise grâce aux voies de MAPK et PI3K (27).

Le rôle de JAK2 dans l'hématopoïèse myéloïde, et en particulier dans l'érythropoïèse, est fondamental puisque les embryons invalidés pour JAK2 meurent in utero par l'absence d'érythropoïèse définitive (5,28).

La mutation de *JAK2* entraine une activation constitutive de la protéine et donc un engagement aberrant des voies de signalisation en aval notamment les voies JAK-STAT, PI3K/Akt/mTOR et ERK1/2 MAPK. In vivo, la présence de la mutation *JAK2* V617F dans les progéniteurs hématopoïétiques induit une croissance indépendante de l'EPO (29). Il a été mis en évidence une importance plus particulière de STAT5 dans les NMP *JAK2* V617F car lors de l'ablation génétique de STAT5 chez les souris *JAK2* V617F mutées, celles-ci perdent leur phénotype de la maladie (30) (Figure 3).

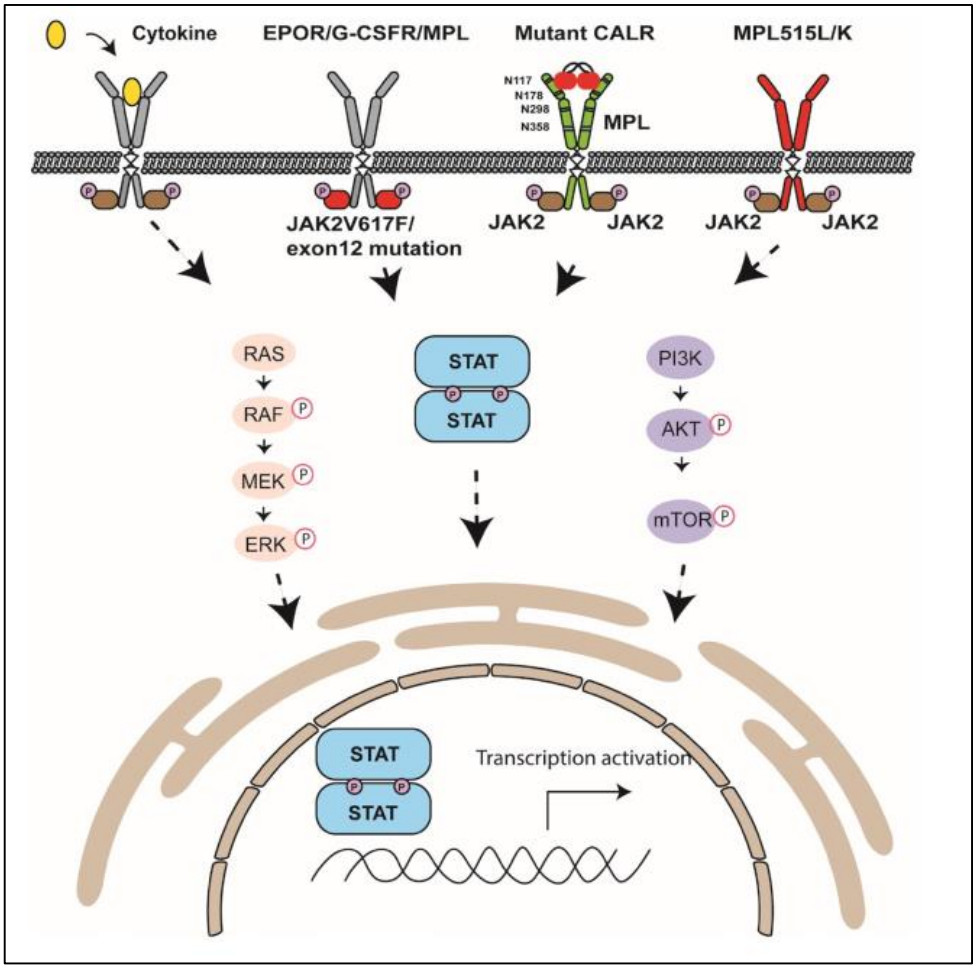


Figure 3 : Représentation de la transduction du signal avec la mutation *JAK2* V617F (25).

Le gène de la protéine kinase *JAK2* se trouve sur le chromosome 9 et la mutation V617F se trouve sur l'exon 14. Cette mutation aboutit au changement d'un G par un T à la position 1849. Au niveau protéique, on retrouve donc une phénylalanine à la place d'une valine au codon 617. On retrouve cette mutation dans le domaine JAK homologue 2 (JH2) qui ne possède pas d'activité enzymatique mais qui régule négativement la fonction catalytique du domaine JH1 (31) : cette mutation bloque donc l'effet inhibiteur du domaine JH2 sur JH1. C'est une mutation acquise retrouvée dans les cellules myéloïdes des patients (Figure 4).

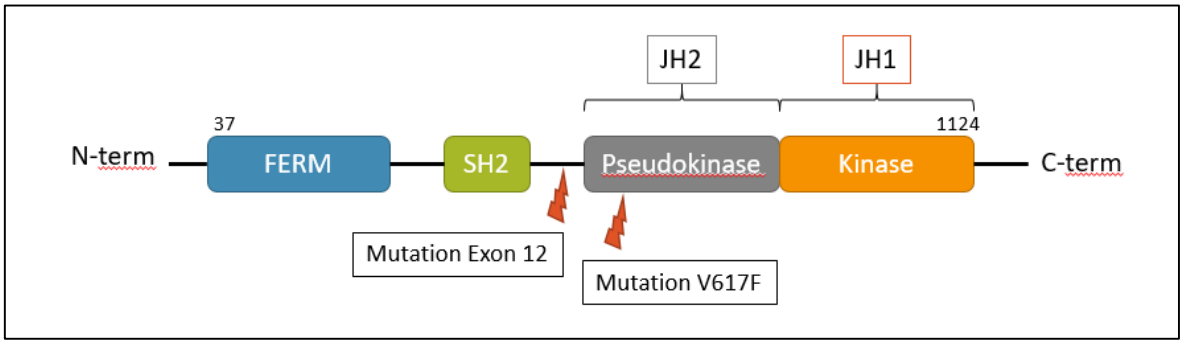


Figure 4 : Représentation du gène *JAK2*

La mutation V617F n'est pas spécifique d'une pathologie, elle est retrouvée dans

- 97 % des polyglobulies de Vaquez
- 55 % des thrombocytémies essentielles
- 54 % des myélofibroses primitives (26).

Mais on retrouve également cette mutation dans d'autres hémopathies en proportion moindre. En effet, elle a été décrite dans 7.8 % des leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC), dans 4.2 % des syndromes myélodysplasiques (32) ou encore dans 1 à 2 % des leucémies aigues myéloïdes (LAM) avec une association *BCR-ABL*/*JAK2* V617F. Par contre, elle n'a jamais été décrite dans des pathologies lymphoïdes comme les leucémies aigues lymphoïdes (LAL) ou les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) ni dans les myélomes.
La mutation *JAK2* V617F peut être détectable dans de rares cas chez des volontaires sains sans symptômes clinique de NMP et sans anomalies de numération de formule

sanguine, mais seulement à des taux très faibles (0.035%) qui sont bien en dessous du seuil de positivité clinique de 1 % (33,34). Chez ces volontaires sains, il a été démontré une augmentation de la prévalence de la mutation V617F avec l'âge (34). Une charge mutationnelle très faible est le signe d'une hématopoïèse clonale, elle est associée à un risque accru de développer un cancer hématologique et de mortalité toutes causes confondues.

La charge mutationnelle est différente en fonction des pathologies, forte dans la polyglobulie de Vaquez et dans la myélofibrose primitive en raison de la disomie uniparentale acquise mais moins élevée dans la thrombocytémie essentielle (34–38) (Figure 5). Cela va de pair avec le fait que chez les patients PV et MFP, il est fréquent que la mutation progresse du stade hétérozygote au stade homozygote par recombinaison mitotique de la partie distale du chromosome 9, ce qui est rare chez les patients TE qui gardent un statut hétérozygote (39,40). La charge mutationnelle a donc un rôle dans le phénotype de la maladie (41). Ceci a été montré sur des modèles murins qui, lorsque l'allèle mutée est moins présente que la WT, présentent une thrombocytose mais peu d'érythrocytose et de leucocytose et donc un phénotype de TE. En parallèle, chez les souris avec une prépondérance de l'allèle V617F, on retrouve une érythrocytose et une leucocytose plus prononcées (42) comme retrouvées dans la PV.

Une charge mutationnelle élevée est associée à un risque élevé de développement de thromboses (31,43) ainsi qu'à une transformation myélofibrotique (44) chez les patients atteints de PV et TE. Au contraire, il a été remarqué une survie globale plus faible chez les patients avec une faible charge mutationnelle (<50 %) et atteints de MFP, surement due à une augmentation de l'acutisation en leucémie aigüe avec une acquisition de mutations additionnelles (45,46).

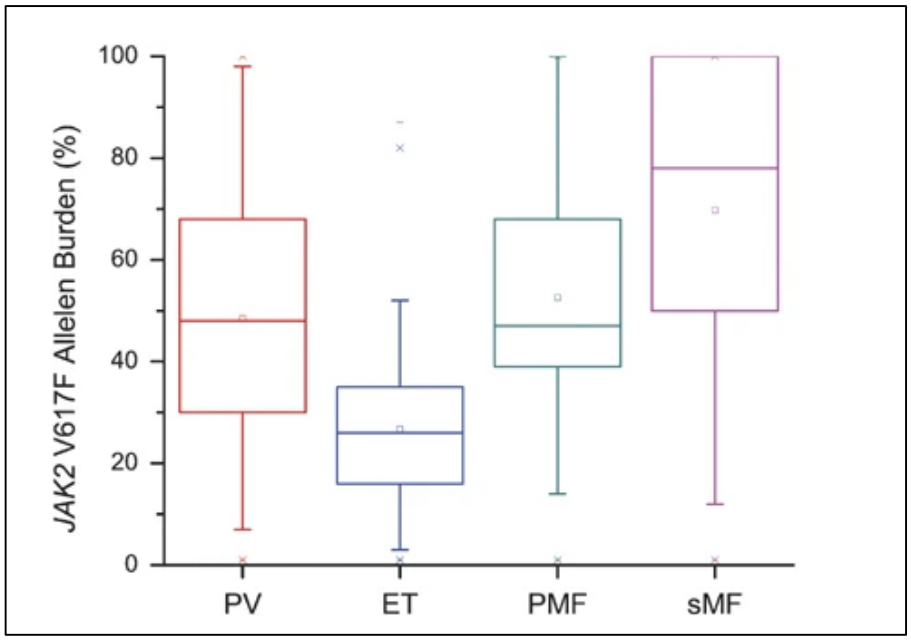


Figure 5 : Représentation des ratios alléliques en fonction des NMP (35).
(sMF : myélofibroses secondaires post-PV ou post-TE).

Les patients homozygotes pour la mutation V617F de *JAK2* présentent une incidence plus élevée de splénomégalie ainsi qu'une rate plus grosse, de prurit et ont plus fréquemment besoin d'un traitement cytoréducteur par rapport aux patients hétérozygotes (41,47).

En plus d'être très utile pour le diagnostic des NMP, la recherche de la mutation *JAK2* V617F peut également être pertinente chez les patients traités pour regarder la réponse au traitement et suivre la maladie résiduelle (33). Une étude a d'ailleurs fait le lien entre une charge mutationnelle de plus de 50 % chez les patients atteints de MFP et une meilleure réponse aux inhibiteurs de JAK2 (48).
Nous avons vu que les patients homozygotes ont globalement une clinique plus symptomatique que les hétérozygotes, la quantification de la mutation *JAK2* V617F pourrait donc permettre de transmettre des informations cliniques importantes.
Une dernière information pourrait nous être apportée par le suivi des ratios alléliques de la mutation *JAK2* V617F ; en effet, plusieurs études ont montré une corrélation entre la diminution de ces ratios dans le sang et dans la moelle osseuse et une bonne réponse hématologique lors d'un traitement. Par exemple, Jones *et al*.

(49) ont mis en évidence une diminution de deux à trois fois du ratio allélique chez des patients PV en rémission hématologique en cours de traitement par IFNalpha ou Imatinib.

1.6 Diagnostic des NMP

Le diagnostic de NMP repose sur la nouvelle classification OMS 2016 (1) qui précise l'importance de réaliser une biopsie ostéo-médullaire (BOM) pour quantifier la fibrose médullaire.

La recherche de la mutation V617F de *JAK2* est un élément clé dans le diagnostic des syndromes myéloprolifératifs ; en effet, elle rentre dans les critères diagnostiques majeurs définis par l'OMS pour la PV, le TE et la MFP depuis la classification OMS 2008 (50). Dans les recommandations européennes, la mutation *JAK2* V617F doit être la première à être recherchée, puis dans un second temps, en cas de négativité de cette première, les mutations de *MPL* et *CALR* devront être investiguées (23).

1.6.1 La polyglobulie de Vaquez

Pour le diagnostic de PV, une BOM n'est pas nécessaire chez les patients présentant une hémoglobine >18.5 g/dL (hommes) ou >16.5 g/dL (femmes) et ayant une mutation *JAK2* V617F et un taux d'EPO subnormal.

Pour les autres patients, la présence de trois critères majeurs ou des deux premiers critères majeurs et du critère mineur posera le diagnostic (Tableau 1).

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la PV selon l'OMS 2016 (1)

Critères majeurs
Hb > 16.5 g/dl (homme) ou Hb > 16 g/dl (femme) ou Ht > 49 % (homme) ou Ht > 48 % (femme) ou augmentation de la masse sanguine totale (>25 %)
Biopsie médullaire avec hyper-cellularité et prolifération excessive des trois lignées myéloïdes et prolifération mégacaryocytaire polymorphe
Présence de la mutation *JAK2* V617F ou *JAK2* exon 12
Critère mineur
Taux sanguin d'EPO subnormal

Plus de 85 % des patients atteints de PV ont un taux d'EPO subnormal (51). Une érythocytose avec un taux sérique d'EPO subnormal associé à l'absence de *JAK2* V617F doit donc faire rechercher une mutation de l'exon 12 de *JAK2* afin de ne pas passer à côté des 2 % de PV présentant la mutation de l'exon 12 mais pas la V617F.

Il existe d'autres causes d'érythrocytoses vraies comme :

- Les polyglobulies congénitales primitives (mutation du gène du récepteur à l'EPO).
- Les polyglobulies congénitales secondaires (déficit en 2,3-DPG mutase ou une hyperproduction autonome d'EPO).
- Les polyglobulies acquises secondaires à une hypoxie ou à certaines tumeurs induisant une sécrétion inappropriée d'EPO.

Il faut également éliminer les causes de fausses polyglobulies comme l'obésité, l'alcoolisme, le syndrome de Gaisbock ou encore la thalassémie hétérozygote.

1.6.2 La thrombocytémie essentielle

Le diagnostic d'une TE nécessite la présence des quatre critères majeurs ou des trois premiers critères majeurs et du critère mineur (Tableau 2).

Tableau 2 : Critères diagnostiques de la TE selon l'OMS 2016 (1)

Critères majeurs
Plaquettes > 450 G/L
BOM avec prolifération de la lignée mégacaryocytaire avec mégacaryocytes hyperlobés.et de grande taille
Absence de critères diagnostiques de LMC *BCR-ABL+*, PV, MFP, syndrome myélodysplasique ou autre néoplasie myéloïde
Présence de mutation de *JAK2*, *MPL* ou *CALR*
Critère mineur
Présence d'un marqueur de clonalité ou absence d'étiologie de thrombocytose réactionnelle

1.6.3 La myélofibrose primitive

Le diagnostic de la MFP requiert les trois critères majeurs et un des critères mineurs sur deux prélèvements différents (Tableau 3).

Tableau 3 : Critères diagnostiques de la MFP selon l'OMS 2016 (1)

Critères majeurs
BOM avec prolifération mégacaryocytaire avec atypies et fibrose réticulinique et/ou de collagène de grade 2 ou 3
Absence de critères diagnostiques de LMC *BCR-ABL+*, PV, TE, syndrome myélodysplasique ou autre néoplasie myéloïde
Présence de mutation de *JAK2*, *MPL* ou *CALR* ou en l'absence de ces 3 mutations, présence d'un marqueur de clonalité (*ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1*..) ou absence de myélofibrose réactionnelle.
Critères mineurs
Anémie non liée à une comorbidité
Leucocytose > 11 G/L
Augmentation des LDH
Erythomyélémie
Splénomégalie palpable

1.7 Complications des NMP Ph négatives

Les complications avec impact sur la survie des patients les plus fréquentes des NMP sont les thromboses, les hémorragies, la transformation leucémique et la transformation myélofibrotique (52), cette dernière étant plus fréquente chez les patients homozygotes pour la mutation *JAK2* V617F (39,47). Nous détaillerons le risque de thrombose plus précisément dans un autre paragraphe.

En plus des occlusions des gros vaisseaux, les patients peuvent présenter des symptômes microcirculatoires comme les maux de tête, les vertiges, les troubles visuels, des paresthésies distales ou encore une érythromégalie.
Chez les patients atteints de MFP, il est fréquent de retrouver une hématopoïèse extramédullaire notamment dans la rate et dans le foie mais ce phénomène est également retrouvé dans des formes de PV et TE en transformation myélofibrotique.
Les NMP Philadelphie négatifs ont des risques différents de s'acutiser en leucémie aigüe (LA). On retrouve un taux plutôt faible pour les PV et les TE qui ont respectivement 4 % et 1 % de risque d'acutiser alors que 20 % des patients atteints de MFP ont un risque de développer une LA. La transformation d'une NMP en leucémie aigüe est généralement de très mauvais pronostic. Il est fréquent de retrouver certaines mutations additionnelles lors de cette acutisation comme *TP53*, *NRAS* (31) ou *ASXL1* (24).

1.8 *JAK2* V617F et thromboses

La thrombose est le facteur de risque le plus important affectant la survie sans évènements et la survie globale des patients atteins de NMP (53) ; en effet, les thromboses représentent 35 à 70 % du taux de mortalité total des NMP (52). Une étude récente a montré que l'incidence globale de la thrombose chez les patients atteints de NMP avec mutation *JAK2* V617F était de 5,82/100 patients-années, ce qui était plus élevé que chez les patients atteints de NMP présentant d'autres mutations. Ceci confirme l'importance de la mutation *JAK2* V617F dans la formation de la thrombose.
Concernant la localisation des thromboses, il a été montré que les thromboses artérielles ont une incidence 2 à 3 fois plus élevée que les thromboses veineuses chez les patients atteints de PV et ET (54). Elles représentent 60 à 70 % des évènements cardiovasculaires qui comprennent également les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les ischémies transitoires et les infarctus du myocarde (55).

Les thromboses veineuses se présentent sous la forme de thromboses veineuses profondes des extrémités, d'embolies pulmonaires, de thromboses de la veine porte ou encore de thromboses des veines hépatiques responsables du syndrome de Budd-Chiari (56).
Certains facteurs de risques ont été associés à une plus grande probabilité de développer des thromboses comme l'âge supérieur à 60 ans, un antécédent de thrombose, un hématocrite élevé (57) ou encore un ratio allélique de *JAK2* V617F supérieur à 50 % (15). En effet, les patients atteints de PV et présentant un ratio allélique *JAK2* V617F supérieur à 50 % développent 4.6 fois plus de thromboses que ceux ayant un ratio plus faible (52). Ceci montre l'importance de réduire le ratio allélique des patients malades pour diminuer le risque de thrombose.
Aussi, il a été démontré que les patients atteint de TE et présentant une homozygotie pour la mutation *JAK2* V617F ont presque 4 fois plus de risque de développer une thrombose que les patients hétérozygotes (35,39).

Concernant la physiopathologie de ces thromboses, plusieurs facteurs entrent en jeu telles que des anomalies rhéologiques dues à l'augmentation de la masse des hématies ou des anomalies de la fonction plaquettaire ou des cellules endothéliales (58). Il a également été démontré qu'un hématocrite élevé est associé à un risque plus important de thromboses, c'est pour cela qu'il est important de maintenir un hématocrite en dessous de 45 % chez l'homme et 42 % chez la femme (59). Le fait de contrôler cette hyper-cellularité permettrait de réduire les risques thromboemboliques (27).
Au contraire, plusieurs études ont montré que la thrombocytose n'est pas directement corrélée au risque thrombotique mais plutôt à un risque hémorragique (31).

Plusieurs cibles pourraient être affectées par la mutation *JAK2* V617F et donc expliquer l'augmentation des thromboses :

- Les plaquettes : on a remarqué une augmentation du facteur tissulaire dans les plaquettes des patients atteints de TE et *JAK2* mutés. Il a également été

démontré une augmentation du taux de circulation de plaquettes immatures, expliquée par une hypersensibilité des mégacaryocytes à la thrombopoïétine (60) ainsi que des temps de génération de thrombine plus longs chez les patients mutés. Ces deux derniers paramètres reviennent à la normale après un traitement par hydroxyurée. Ces connaissances nous permettent de confirmer l'existence d'une hypercoagulabilité plaquette-dépendante chez les patients porteurs de la mutation (61,62).

- Les leucocytes : chez les patients porteurs de la mutation, on remarque une augmentation de polynucléaires neutrophiles activés présentant une surexpression de molécules d'adhésion à leur surface comme la béta2-intégrine CD11b ainsi que des taux plus élevés de myélopéroxydase, CD14 et élastase.
- Les facteurs de la coagulation : les patients *JAK2* mutés présentent une résistance à la protéine C activée ainsi que des taux de prothrombine, protéine S libre et TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) diminués par rapport aux patients Wild-Type (WT). Toutes ces anomalies sont associées à un risque accru de thrombose (63).
- Les marqueurs de l'inflammation : la plus forte corrélation retrouvée avec les thromboses concerne deux marqueurs de l'inflammation, la hsCRP (high sensitivity CRP) qui est augmentée chez les patients porteurs de la mutation et la PTX3 (Pentraxine 3) qui est quant à elle diminuée chez les patients mutés (31).

1.9 Pronostic

Les patients atteints de PV sont classés dans deux groupes : faible risque et haut risque en fonction de leur âge, de leurs antécédents de thrombose et de leurs facteurs de risque génétiques cardiovasculaires (23). Chez les patients atteints de PV, le taux de mortalité augmente avec l'âge (64). Un caryotype anormal chez un patient atteint de PV est un facteur de risque pour la survie globale et pour la transformation leucémique (14).

Pour la TE, le Score IPSET-Thrombosis prend en compte la présence ou non de la mutation *JAK2* V617F, les facteurs de risque cardiovasculaires (hypertension, artérielle, diabète de type 2 et tabagisme actif), l'âge et les antécédents de thrombose. Ce score permet de classer les patients en 4 groupes en fonction du risque annuel de thrombose (exemple : groupe de haut risque : 3.56 % de risque de thrombose/an) (65). Il est par contre à noter que le statut mutationnel *JAK2*/*MPL*/*CALR* n'affecte pas la survie chez les patients TE (14).

Les scores IPSS ou D-IPSS doivent être utilisés au moment du diagnostic chez les patients atteints de MFP. Deux nouveaux scores pronostic ont été développés, le MIPSS70 (Mutation-enhanced IPPS) pour les patients MFP en âge de recevoir une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques qui prend en compte la présence de mutations additionnelles en plus des trois drivers (66) et le score GIPSS (genetically-inspired prognostic scoring system) basé sur l'âge et les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires (67).

La présence de mutations additionnelles de *TET2*, *ASXL1, SRSF2*, *SF3B2*, *IDH1/2* et *EZH2* aggrave le pronostic des patients (15). L'apport du NGS (Next Generation Sequence) pourrait être très intéressant : il permettrait de détecter toutes ces mutations dans un même *run* et aurait un intérêt diagnostique, pronostique et théranostique (46) car la présence de ces mutations supplémentaires ne sont pas rares, plus de 50 % des patients atteints de PV ou TE présentent au moins une mutation additionnelle en plus de *JAK2*/*MPL*/*CALR* (14).
Suite à ces découvertes, un nouveau modèle international de pronostic a été proposé récemment pour la PV et la TE, les MIPSS-PV et MIPSS-TE. Dans ces nouveaux scores sont inclus des mutations additionnelles ayant une incidence péjorative sur la survie globale des patients comme *SF3B1* et *SRSF2* dans la TE ou *SRSF2* dans la PV (68).

Il a également été démontré que le sexe masculin est un facteur de risque indépendant pour la survie globale dans la TE mais pas dans la PV (69).

1.10 Traitements des NMP

Un simple traitement symptomatique est recommandé pour les TE ainsi que les PV de faible risque. Il en est de même pour les patients atteints de MFP, classés dans le groupe faible risque et n'ayant pas de signes clinique ni biologiques comme une anémie, une leucocytose ou une thombocytose. Une fois ces critères dépassés, plusieurs traitements sont disponibles comme les inhibiteurs de *JAK2*, l'interféron-alpha ou encore l'hydroxyurée.

Concernant la prise en charge du risque thrombotique, plusieurs études affirment un effet bénéfique d'un traitement par acide acétylsalicylique (Aspirine®) à faible dose deux fois par jour pour les patients PV et TE (14).

Pour tous les patients atteints de PV, les recommandations européennes insistent sur les saignées pour maintenir un taux d'hématocrite < 45 %, associé à un traitement biquotidien par acide acétylsalicylique à faible dose.

Un traitement par hydroxyurée, busulfan ou interféron alpha (IFNα) est recommandé chez les patients classés dans le groupe à haut risque, chez les patients ayant une splénomégalie symptomatique ou progressive ou encore chez les patients ayant une forte leucocytose. Pour les patients jeunes, on préfèrera l'IFNα à l'hydroxyurée alors que le busulfan est plutôt réservé aux patients âgés. Depuis début 2019, le Ropeginterferon alpha-2b Besremi® peut être utilisé dans le traitement de la PV chez des patients sans splénomégalie.

Un traitement par hydroxyurée permettrait une diminution de l'incidence des thromboses et de la transformation leucémique ; il a en effet montré sa supériorité par rapport à d'autres traitements cytoréducteurs comme la pipobroman ou le busulfan qui induisent un risque de transformation leucémique (70).

L’interféron-alpha pégylé est un traitement prometteur pour les patients atteints de NMP ; en effet, il permet une bonne réponse hématologique et moléculaire avec également une bonne tolérance (71). Une réduction du ratio allélique est particulièrement remarquée avec cette molécule chez les patients porteurs de la mutation *JAK2* V617F. Il a également été montré une efficacité sur la charge mutationnelle *CALR* avec cependant de plus fortes doses utilisées (25). Il a toutefois été mis en évidence des résistances au traitement par interféron-α chez des patients présentant une mutation de *TET2* (72,73). Chez les patients NMP, l’interféron-α ciblerait préférentiellement les cellules malignes et les priverait de leur capacité de prolifération ce qui permettrait au cellules WT de prendre l’avantage (74).

Pour la prise en charge des patients avec TE classés dans le groupe à haut risque il est recommandé de les traiter en première ligne avec de l’hydroxuyrée ou de l’IFNα. L’anagrélide Xagrid® possède l’AMM pour le traitement de seconde ligne des TE depuis 2004 (75).

Un traitement par interféron alpha sous forme pégylée ou par hydroxyurée permet une forte diminution du ratio allélique (41). Il a également été démontré une corrélation entre la charge mutationnelle et la réponse au traitement et inversement avec la dose journalière (76).

Plusieurs inhibiteurs de JAK ont été développés depuis la découverte de la mutation V617F mais seul le Ruxolitinib, qui est un inhibiteur de JAK1 et JAK2, possède une AMM pour le traitement des MFP et peut être utilisé en deuxième ligne chez les patients atteints de PV et résistants ou intolérants à l’hydoxyurée (77). Malgré ces recommandations, peu de patients sous traitement par ruxolitinib obtiennent une rémission moléculaire complète (25).

La splénectomie est recommandée chez les patients présentant une splénomégalie progressive et symptomatique réfractaire aux traitements médicamenteux.

2 Les techniques de PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est basée sur le principe d'amplification d'ADN à l'aide d'amorces spécifiques d'un gène d'intérêt. Elle comporte trois étapes :

- la dénaturation à température élevée (au moins 90°C) pour séparer les deux brins d'ADN en provoquant la cassure des liaisons hydrogène entre les bases complémentaires. A la fin de cette phase, on obtient des molécules d'ADN simple brin.
- l'hybridation (entre 50 et 60°C en moyenne) pour permettre aux amorces choisies de s'hybrider au niveau des séquences complémentaires sur les brins dénaturés.
- l'élongation, étape durant laquelle l'ADN polymérase synthétise les nouveaux brins d'ADN en ajoutant les désoxyribonucéotides complémentaires à la séquence cible dans le sens 5'-3'.

Plus il y a de cycles, plus le nombre de copies final sera élevé ; on obtient en effet une quantité égale à 2^n avec n qui correspond au nombre de cycles.
Le produit d'amplification peut être révélé soit en point final (principe de détection de la PCR digitale) soit en temps réel (principe de détection de la PCR quantitative).

Avant de réaliser cette étape de PCR, il est nécessaire de réaliser une extraction d'ADN à partir de l'échantillon primaire.

Pour détecter la mutation *JAK2* V617F, plusieurs techniques ont été développées comme le séquençage de Sanger, le pyroséquençage ou encore l'analyse de la courbe de fusion à haute résolution. Mais elles ont montré une

sensibilité souvent limitée et n'étaient pas toutes quantitatives ou encore rendaient des résultats incohérents en fonction de la qualité des échantillons (78).

2.1 La PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Le principe de la PCRq est de détecter l'apparition ou la disparition d'une fluorescence au cours de l'amplification par PCR. En PCR quantitative, la quantification se fait grâce à une gamme de calibration ; on compare le nombre de cycles nécessaires à la détection de la fluorescence pour l'échantillon par rapport au calibrateur.

Au fur et à mesure de son utilisation, la spécificité et l'efficacité de la qPCR ont été améliorées grâce au contrôle rapide de la variation de température mais cette technique présente néanmoins de nombreux inconvénients : les premiers cycles de PCR ne sont pas forcément exponentiels, les faibles concentrations initiales de molécules d'acides nucléiques peuvent ne pas être amplifiées à des niveaux détectables, les différences d'expression inférieurs à 2 fois ne sont pas détectables dans les extrémités du domaine analytique et l'efficacité de l'amplification dans un échantillon peut être différente de celui des échantillons de référence. (79)

Actuellement, la PCRq est la technique la plus utilisée pour la quantification de la mutation *JAK2* V617F (80).

Actuellement au laboratoire de biologie moléculaire du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Saint Etienne, nous utilisons pour la détection et la quantification de la mutation *JAK2* V617F, le kit *JAK2* Mutaquant® (QUIAGEN, Marseille, France) sur l'automate ABI 7900 (ThermoFisher). Ce kit utilise les sondes Taqman®, sondes à hydrolyse, qui possèdent à leurs extrémités 5' une molécule fluorescente et en 3' un quencher qui inhibe la fluorescence lorsqu'il est placé assez proche.

Le principe est d'utiliser la propriété exonucléasique de la Taq polymérase qui va, au cours de l'élongation, hydrolyser la sonde ce qui va séparer le fluorochrome du quencher et donc permettre une émission de fluorescence (81) (Figure 6).

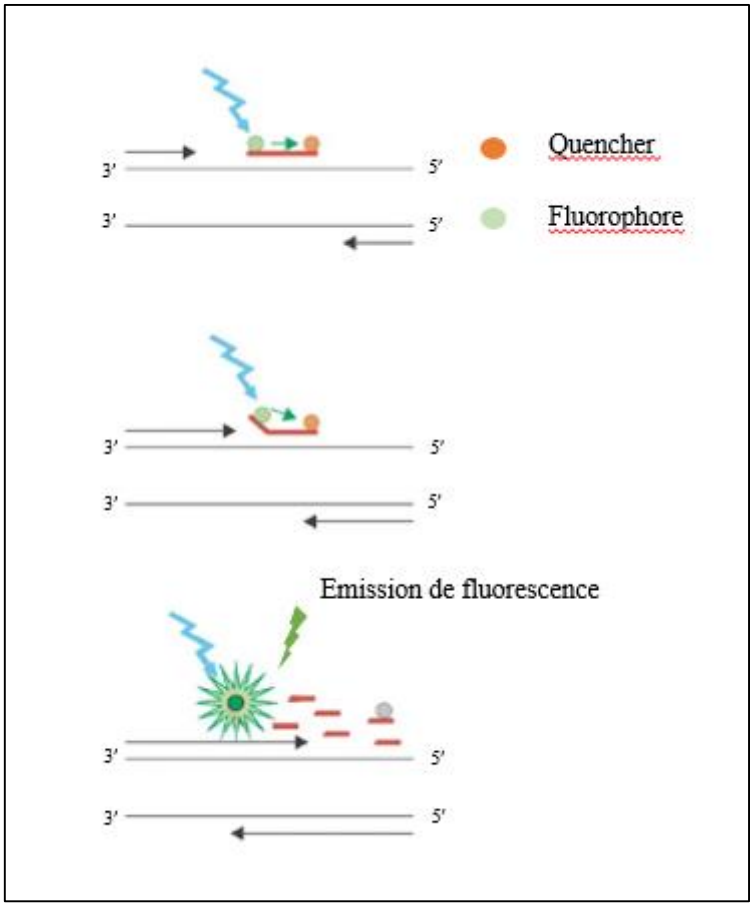


Figure 6 : Principe de fonctionnement des sondes TaqMan® (81)

Pour cette technique, la révélation du produit de PCR se fait en « temps réel », elle se fait donc en même temps que l'amplification.

Inconvénients :

- Nécessité d'utiliser des plasmides de concentrations connues à chaque technique pour avoir des courbes standards.
- Deux réactions indépendantes sont nécessaires, l'une pour quantifier l'allèle mutée, l'autre pour quantifier l'allèle WT.

2.2 La PCR digitale (dPCR)

2.2.1 Histoire et principe

Le terme PCR digitale a été utilisé pour la première fois par Vogelstein B et Kinzler KW dans un article publié en 1999 dans lequel les auteurs ont dilué l'ADN dans une plaque de 384 puits de manière à obtenir une à deux copies maximum du gène d'intérêt par puit. Ils ont ensuite réalisé la PCR et analysé la présence de séquences mutées ou WT avec des sondes fluorescentes. Chaque puit n'ayant qu'une séquence d'ADN, la couleur du puit correspond donc soit à la sonde mutée soit à la sonde WT soit à aucune couleur s'il n'y a pas de produit de PCR (82). Ce n'était pas la première fois que cette technique était décrite ; en effet, on retrouve plusieurs publications à partir de 1992 utilisant l'approche de dilution limite de l'ADN (83,84).

C'est une technique de PCR de troisième génération qui consiste à répartir le volume réactionnel d'une PCR dans un très grand nombre de compartiments. Les acides nucléiques sont répartis de façon aléatoire dans les compartiments de façon à ce que chaque compartiment ne contienne que quelques copies (0 à 2 ou 3) d'ADN au maximum. La réaction de PCR se fait alors sur des ADN cibles individualisés compartimentés. La détection du produit de PCR se fait en point final avec une détection de fluorescence. Chaque compartiment sera donc soit positif soit négatif, c'est pour cela que l'on parle de PCR numérique.

Comme pour la PCR classique, la PCR digitale peut être utilisée de manière qualitative ou quantitative. En comptant d'une part le nombre de compartiments positifs dans lesquels la cible d'intérêt a été détectée et d'autre part le nombre de compartiments négatifs, il est possible de déterminer le nombre de copies totales d'une molécule d'ADN dans l'échantillon de départ (85) (Figure 7).

La conversion du nombre de gouttelettes positives ou négatives en nombre de copies se fait grâce à la loi de Poisson qui est la loi statistique qui régit les évènements rares. Elle décrit la probabilité qu'un compartiment contienne

k molécules d'ADN en fonction du nombre de compartiments et du nombre total de molécules d'ADN selon la formule :

$$P(k;\lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

Dans laquelle :

- k = nombre de molécules d'ADN dans un compartiment
- λ = nombre total de molécule d'ADN (m) divisé par le nombre total de compartiments (M) ($\lambda = \frac{m}{M}$) (86).

La PCR digitale a montré un bénéfice dans plusieurs pathologies comme dans le mélanome avec la détection de BRAF V600E (87), dans le cancer du sein pour rechercher le statut HER2 (88) ou encore pour la quantification de EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules (89).

2.2.2 Différentes techniques de compartimentation

Les différents compartiments disponibles sur le marché actuel sont de deux types :

- Les microchambres sur puce : système avec support solide. 4 fournisseurs proposent cette technologie : Fluidigm, Formulatrix, Stilla et ThermoFisher. Ces micro-chambres sont avantageuses car elle pemettent d'automatiser le processus du début avec l'ajout de l'échantillon à l'analyse de la réaction mais le nombre de compartiments est limité à quelques milliers (85).
- Les micro-gouttelettes : système de micro-fluidique de gouttelettes aqueuses en suspension dans un fluide non aqueux, on parle alors de ddPCR : « droplet digital PCR ». Seulement 2 fournisseurs commercialisent cette plateforme : RainDance et Bio-Rad. Au laboratoire du CHU de Saint Etienne, nous utilisons le système proposé par Bio-Rad qui est commercialisé depuis 2012 en Europe.

  Contrairement aux supports solides, cette technologie permet d'obtenir un très grand nombre de compartiments, 20000 environ pour le système de

Biorad et donc une meilleure sensibilité car celle-ci dépend du nombre de compartiments et de la quantité de molécules analysables (90).

2.2.3 Avantages et inconvénients

La dPCR possède de nombreux avantages :

- Elle permet la détection d'un variant en faible proportion par rapport à un autre ; en effet, grâce à la répartition dans les compartiments, on va isoler la cible rare et donc limiter la compétition avec la cible majoritaire pour pouvoir la repérer plus facilement, même si dans l'échantillon initial on avait un excès de copies sauvages : meilleure sensibilité.
- Il n'est pas nécessaire d'établir une courbe standard et donc pas nécessaire d'ajouter des plasmides dans les techniques.
- La dPCR permet la mesure des quantités absolues d'ADN muté indépendamment de la qualité de l'échantillon.
- La dPCR est plus rentable que la qPCR car une seule réaction est nécessaire pour l'allèle mutée et l'allèle WT. On parle de technique mutliplex car dans la même réaction, nous mettons deux sondes couplées à deux fluorochromes différents qui vont cibler deux gènes différents.
- Possibilité de rendre des résultats en urgence.

Un des inconvénients de cette technique est la difficulté à obtenir un parfait équilibre entre la probabilité d'avoir plusieurs copies d'ADN dans un compartiment et la proportion de compartiments inoccupés. Il faut en effet une concentration en ADN optimale pour obtenir ce compromis.

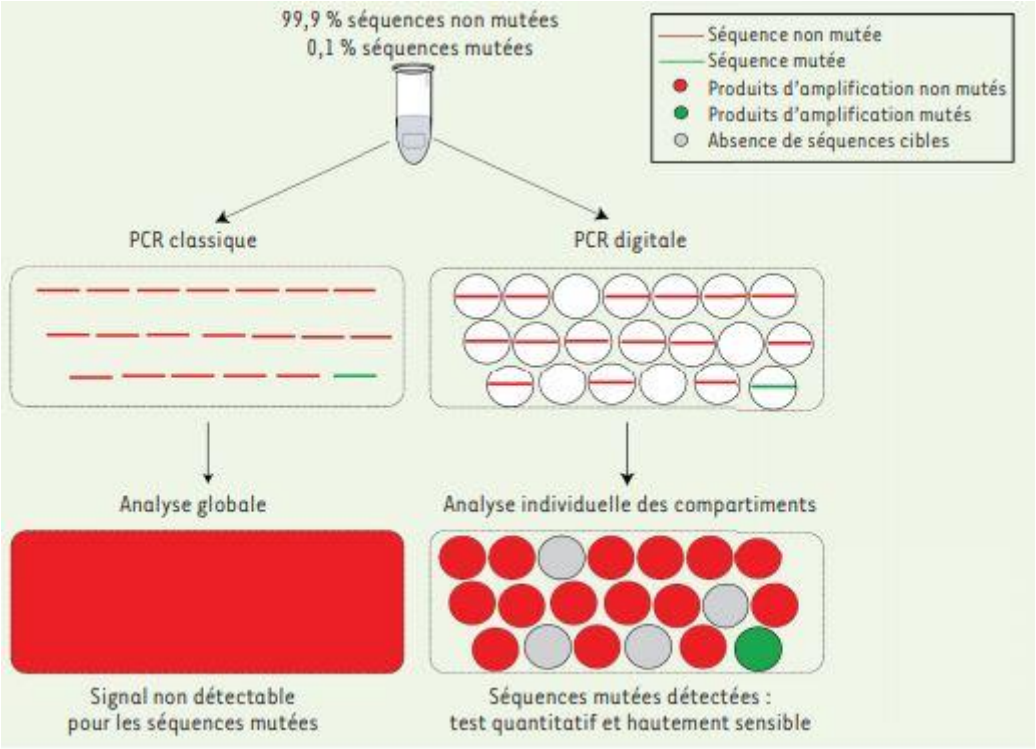


Figure 7 : Comparaison qPCR et dPCR pour la détection d'une cible rare (91).

2.2.4 Utilisation de la PCR digitale pour la détection de *JAK2* V617F

C'est en 2014 que le premier article comparant la qPCR et la qPCR pour la détection de *JAK2* V617F fut publié (92). Cette équipe autrichienne a comparé la qPCR avec la qPCR en microchambres de ThermoFisher. Après avoir testé 30 échantillons positifs et 13 échantillons négatifs, elle conclue à une très bonne sensibilité avec une détection d'échantillons ayant un ratio allélique bien en dessous de 1 % qui est le seuil d'intérêt clinique.

Une autre étude a mis en évidence le fait que la dPCR permettrait de détecter de très faibles ratios alléliques qui seraient rendus faux-négatifs par pyroséquençage comme pour les patients en post-greffe de cellules souches hématopoïétique susceptibles de présenter de faibles charges mutationnelles *JAK2* V617F, ce qui pourrait donc servir de marqueur pronostic (78,93,94).

L'apport de la dPCR dans le suivi de la maladie résiduelle (MRD) a été évalué suite aux recommandations du IWG-MRT (Group-Myeloproliferative neoplasms

Research and Treatment) et du réseau European LeukemiaNet qui font de la rémission moléculaire un des critères de réponse au traitement des myélofibroses (95).

3 La qualité au laboratoire

3.1 L'Organisation internationale de normalisation (ISO)

L'ISO est une organisation internationale non gouvernementale, indépendante (96) qui existe depuis 1946. Elle est actuellement basée en Suisse et dirigée par Eddy NJOROGE. Elle rassemble et cordonne le réseau des instituts nationaux de normalisation de 165 pays selon le principe d'un membre par pays. La France est représentée par l'Association française de normalisation (AFNOR).

L'ISO a déjà élaboré plus de 23598 Normes internationales dont la norme 15189 intitulée : « Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence ». Concernant le classement de cette norme, nous la retrouvons dans la catégorie 03 : « Services. Organisation de l'entreprise. Gestion et Qualité. Administration. Transport. Sociologie » puis dans la sous-partie 03.120 : « Qualité » et enfin dans le domaine 03.120.10 : « Management et assurance de la qualité ».

Une autre norme qui nous intéresse a été rédigée par l'ISO en collaboration avec la commission électrotechnique internationale (IEC), c'est la norme ISO/CEI 17025 qui aborde les exigences concernant les laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Ce sont des comités techniques qui conçoivent les normes et les réexaminent tous les cinq ans.

L'ISO élabore des normes internationales mais n'exerce pas d'activité de certification.

La certification est une assurance écrite donnée par une tierce partie qu'un produit, service ou système est conforme à des exigences spécifiques.

L’accréditation est une reconnaissance par un organisme indépendant, en général un organisme d’accréditation, qu’un organisme de certification est compétent pour procéder à la certification. L’organisme de certification dit « accrédité » a fait l’objet d’une vérification pour garantir sa conformité à des normes internationales. (96)

3.2 La norme ISO 15189

La première version de la norme ISO 15189 a été publiée en 2003 ; il y a ensuite eu une révision en 2007 et nous suivons actuellement la norme ISO 15189:2012 qui est en place depuis novembre 2012. Une quatrième édition est en cours d’élaboration : elle se nomme actuellement ISO/CD 15189.2 et sa publication est prévue pour le 16 juillet 2022.

C’est le comité technique ISO/TC 212 : « Laboratoires de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro » qui travaille sur la norme ISO 15189.

Cette norme spécifie les exigences de qualité et de compétence applicables aux laboratoires de biologie médicale ; elle n’est pas destinée à des fins de certification des laboratoires.

Elle est composée de deux parties, une concernant les exigences relatives au management et une autre relative aux exigences techniques.

3.3 Association française de normalisation (AFNOR)

Créée en 1926, l’AFNOR a pour mission d’animer et de coordonner le processus d’élaboration des normes et de promouvoir leur application en France. En tant que principal membre francophone de l’ISO, l’AFNOR a la responsabilité d’établir la version française des normes ISO.

3.4 Comité français d'accréditation (COFRAC)

Le COFRAC est le seul organisme d'accréditation en France. Créé en 1994, il est composé de quatre sections dont la section santé humaine qui gère l'accréditation des laboratoires de biologie médicale La démarche d'accréditation est devenue obligatoire pour les laboratoires de biologie médicale depuis 2010.
Il faut savoir que les laboratoires de biologie médicales auraient dus avoir 100 % de leurs analyses accréditées au 1er novembre 2020 mais que cette échéance a été repoussée au 1er mai 2021 à cause du contexte sanitaire actuel et que dorénavant, l'obligation porte sur l'ouverture de toutes les portées d'accréditation avec l'accréditation d'un examen représentatif par portée.

3.5 Demande d'accréditation

Lorsqu'un laboratoire décide de faire une demande d'accréditation pour une analyse, il doit fournir une demande écrite regroupant deux documents officiels qui permettent de rassembler toutes les informations administratives et techniques nécessaires pour traiter la demande. Ces deux documents sont

- Le SH FORM 05 (97) qui est le formulaire de demande d'accréditation selon la norme ISO 15189.
- Le SH FORM 03 (98) qui permet au COFRAC d'identifier le niveau de prise en compte des exigences d'accréditation dans le fonctionnement du demandeur.

La demande est ensuite évaluée par un examen de recevabilité opérationnelle. Si le dossier est accepté, il y a ensuite une évaluation sur site.
A la suite de ces deux examens, le COFRAC peut décider ou non de délivrer l'accréditation pour une durée maximale de 4 ans (99).

3.6 Surveillance de l'accréditation

Une première évaluation de surveillance sur site est réalisée dans les 12 mois maximums après l'obtention de l'accréditation, puis tous les 15 mois au plus lors du premier cycle d'accréditation qui dure 4 ans. Pour les cycles suivants qui sont d'une durée maximale de 5 ans, le laboratoire sera évalué tous les 23 mois au maximum (99) (Figure 8).

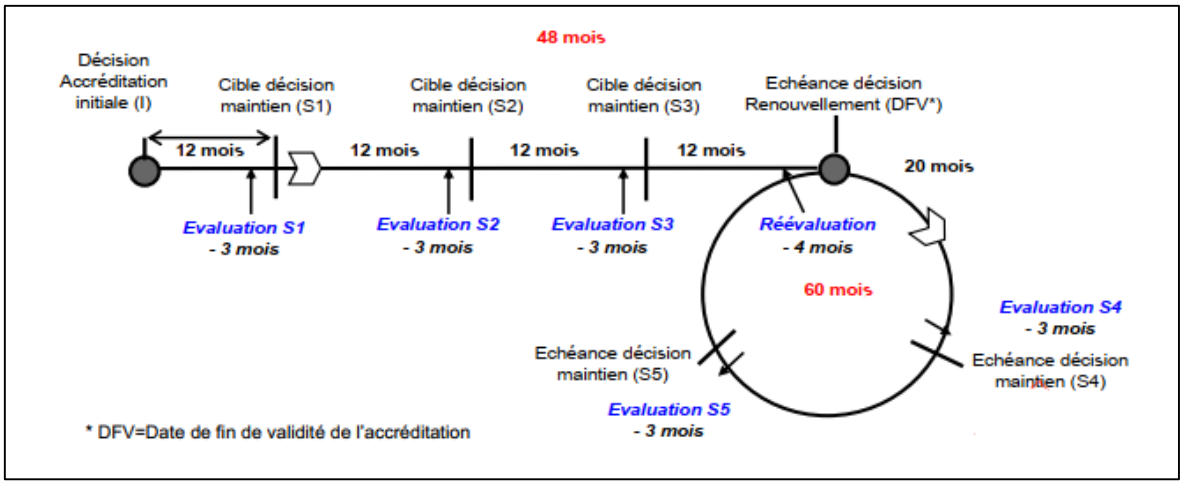


Figure 8 : Cycle de vie d'une accréditation *(99)*

3.7 Dossier de vérification/validation de méthode

Selon la norme ISO 15189, les laboratoires doivent « vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre la performance nécessaire et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés » (100). Le SH REF 02 précise les exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870 et explique également que « chaque examen de biologie médicale réalisé par méthode qualitative ou quantitative doit être vérifié/validé » ainsi que « le laboratoire qui souhaite adapter, à ses besoins, des méthodes reconnues ou développer ses propres méthodes doit procéder à leur validation pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire. Le laboratoire doit dans ce cas revendiquer une portée flexible étendue de type B» (101).

Il existe deux portées différentes :

- Portée A : portée flexible standard : vérification de performances d'un système analytique reconnu lors de sa mise en application dans le laboratoire.
- Portée B : portée flexible étendue : validation de méthodes adaptées ou développées en interne (102).

Le document SH GTA 04 (103) est le guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) de méthodes en biologie médicale ; il explique les exigences des paragraphes 5.4 de la norme NF EN ISO/IEC 17025 et 5.3 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15189 concernant la vérification/validation des méthodes en biologie médicale. Un dossier de vérification/validation de méthode doit comporter une description de la méthode à évaluer, une étude de la maitrise des risques, une évaluation des performances de la technique et une déclaration d'aptitude signée.

Pour venir en aide aux laboratoires dans cette démarche d'accréditation, le COFRAC propose une trame à suivre, c'est le SH FORM 43 (104) que nous avons d'ailleurs utilisé pour ce travail.

Les exigences en terme de performances à analyser ne sont pas les mêmes en fonction de la portée et du critère qualitatif ou quantitatif de la méthode à accréditer (tableau 4). Une méthode quantitative en portée B nécessitera plus d'essais qu'une méthode qualitative ou qu'une portée A.

Tableau 4 : Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (103)

CRITERES A EVALUER	Vérification (Portée A)		Validation (Portée B)	
	Méthode quantitative	**Méthode qualitative**	**Méthode quantitative**	**Méthode qualitative**
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir, EBMD) et analyse des discordances	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure **(Limite de quantification et limites de linéarité)**	Bibliographie	/	Essai	/
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, …)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	/	Bibliographie	/	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	/	Bibliographie	/	Essai

Un dossier de vérification/validation de méthode peut concerner un processus simple avec une seule technique ou un processus complexe qui possède plusieurs techniques appelées sous-processus. Dans ce travail, notre technique possède 4 sous-processus :

- L'extraction d'ADN à partir de sang total

- L’extraction d’ADN à partir de culots secs
- L’extraction d’ADN à partir de culots cytogénétiques
- La recherche et la quantification de la mutation *JAK2* V617F en PCR digitale

Chaque processus doit faire l’objet d’une évaluation complète mais ici nous détaillerons seulement le sous processus 4 car les trois premiers ont été validés lors de l’accréditation de l’ancienne méthode de PCR.

La première partie d’un dossier de vérification/validation de méthode s’appelle la maitrise des risques ; elle s’applique à tous les sous-processus du dossier.

D’après la norme NF EN ISO 15189 :
4.14.6 : « Le laboratoire doit évaluer l’impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la sécurité des résultats des examens et doit modifier les processus pour réduire ou éliminer les risques identifiés, et documenter les décisions et actions menées. » (100).

Pour venir en aide aux laboratoires, la SH REF 02 précise : « le laboratoire identifie les phases critiques des processus pré-analytiques, analytiques et post-analytiques pour la fiabilité de ses résultats et la permanence de son activité. Pour chaque phase y compris pour les activités « support », il identifie les risques potentiels et les moyens d’en assurer la maitrise ainsi que le mécanisme de suivi et de revue. » (101).

Le SH FORM 43 propose un tableau basé sur la méthode des 5M qui permet de classer les risques en cinq catégories : Matière (échantillons), Milieu, Matériel (équipements et réactifs), Méthode et Main d’œuvre (personnel).
Pour chaque catégorie, le laboratoire doit identifier les points critiques puis les évaluer sur une échelle de criticité et enfin proposer des moyens de maitrise (104).
L’échelle de criticité est propre à chaque laboratoire ; au CHU de Saint Etienne, elle est fixée de 1 à 3 avec :

1. Risque mineur : aucune incidence sur le résultat patient et sa prise en charge médicale
2. Risque modéré : incidence modérée sur le résultat parient mais aucune sur sa prise en charge médicale
3. Risque majeur : incidence majeure sur le résultat patient et sur sa prise en charge médicale.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL : MISE EN PLACE DE LA RECHERCHE ET QUANTIFICATION DE LA MUTATION JAK2 V617F EN PCR DIGITALE

1 Objectifs

L'objectif de ce travail a été de répondre aux exigences normatives afin de constituer le dossier de validation de méthode pour la recherche et la quantification de la mutation *JAK2* V617F en PCR digitale. Le but étant de présenter l'ensemble de ces résultats au COFRAC en vue d'une accréditation. La première partie de ce travail a été d'optimiser le mode opératoire pour, dans un second temps, réaliser toutes les étapes pour la validation des performances de la nouvelle technique de détection de la mutation *JAK2* V617F en dPCR.

Il a ensuite été nécessaire de créer tous les documents indispensables à la réalisation de cette technique en routine par les techniciens du laboratoire : le mode opératoire et les feuilles de paillasse.

Le dernier objectif a été de vérifier la concordance des résultats rendus avec l'ancienne technique dans un premier temps chez des patients de médecine thérapeutique présentant un ou plusieurs évènements thrombotiques, et dans un second temps chez d'autres patients pour lesquels il avait été trouvé une très faible VAF (variant allele frequency) en PCR quantitative.

2 Etat des lieux de la prescription de la recherche de la mutation *JAK2* V617F au CHU de Saint Etienne

Nous avons utilisé le module statistique du logiciel GLIMS® (MIPS, Diagnostic Intelligence, Belgique) pour extraire les données.

Au cours de l'année 2020, il a été réalisé 351 recherches de la mutation *JAK2* V617F au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Saint Etienne. On a

remarqué une légère diminution des tests par rapport à l'année 2019 durant laquelle on a recherché 390 fois la mutation dont 10 fois sur de la moelle osseuse.
Concernant les résultats de ces recherches, en 2019 nous avions 27.4 % de positivité contre 20.2 % en 2020 (Figure 9).

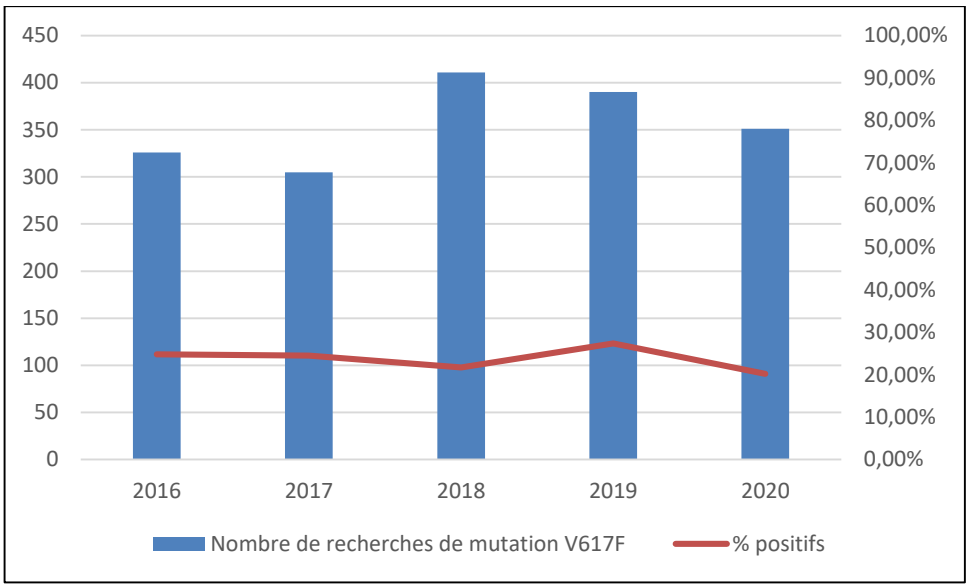


Figure 9 : Nombre de recherches de la mutation JAK2 V617F et pourcentage de positifs sur les 5 dernières années au CHU de Saint Etienne

Il a été observé une augmentation du nombre de recherches positives après 60 ans ce qui est en adéquation avec l'âge moyen au diagnostic des NMP (Figure 10).

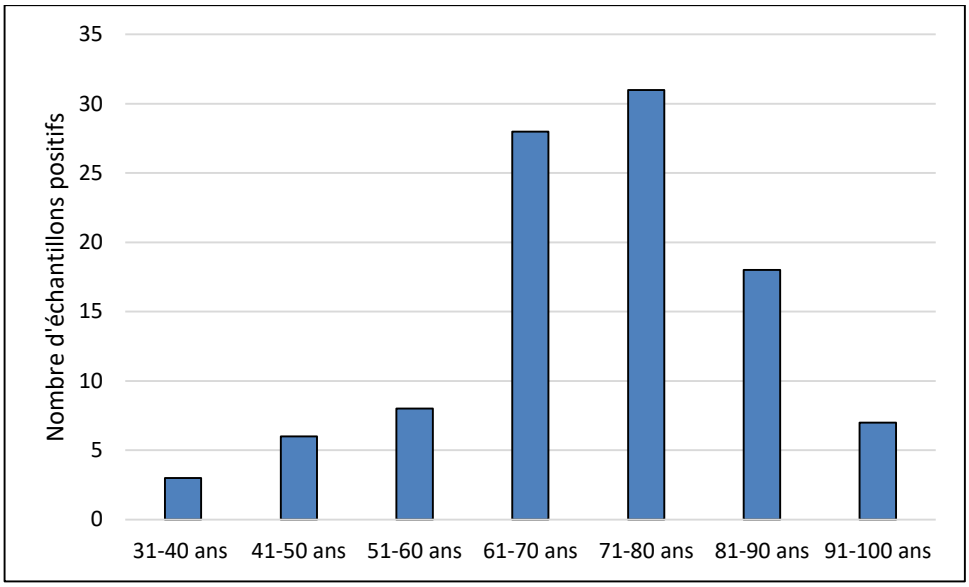


Figure 10 : Nombre d'échantillons positifs en fonction de l'âge des patients

L'Institut de Cancérologie de la Loire Lucien Neuwirth (ICLN) est le principal prescripteur de recherche de mutation *JAK2* V617F avec 46 % des demandes (Figure 11). Les hôpitaux extérieurs comprenant l'hôpital de Firminy, le CH du Forez et le CH de Roanne se placent en seconde position suivis du service de médecine interne et du service de médecine thérapeutique du CHU.

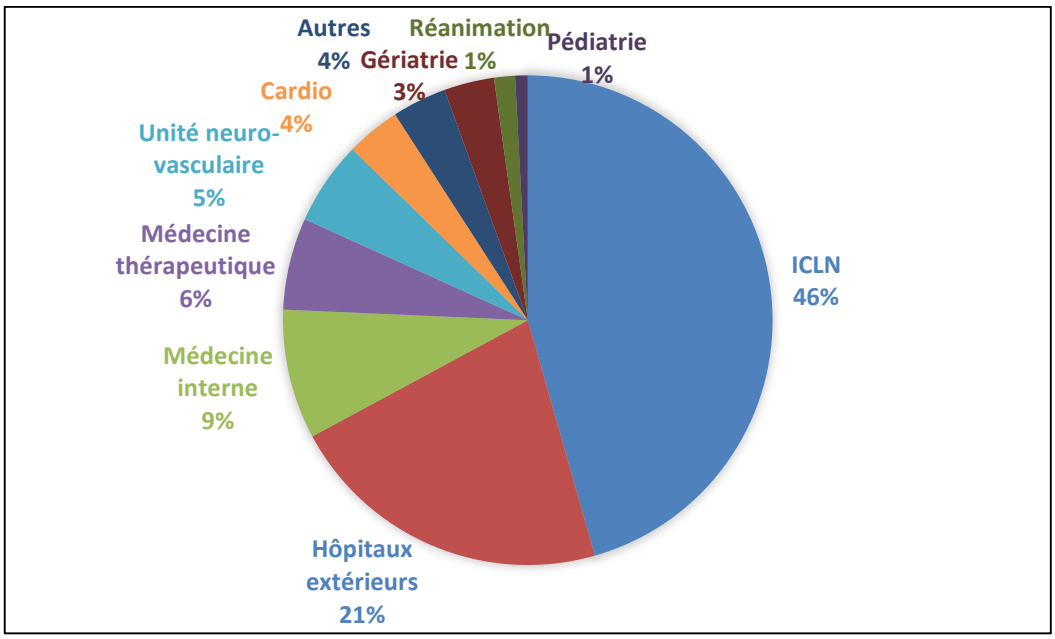


Figure 11 : Répartition des recherches de la mutation *JAK2* V617F par service en 2019 au CHU de Saint Etienne

3 Matériels et méthodes

3.1 Les Automates et réactifs

3.1.1 Les lignées cellulaires

3.1.1.1 La lignée SET-2

La lignée SET-2 est une lignée humaine issue du sang périphérique d'une patiente de 71 ans atteinte de thrombocytémie essentielle acutisée en leucémie mégacaryoblastique. Cette lignée est porteuse de la mutation *JAK2* V617F qui nous intéresse ainsi que de la mutation *DNMT3A* R882H. Nous allons utiliser cette lignée en tant que contrôle de qualité interne positif à deux dilutions différentes : 50 % et 0.1 %.
Cette lignée possède un caryotype très complexe que l'on ne détaillera pas ici.

3.1.1.2 La lignée U-937

La lignée U-937 est une lignée humaine issue d'un épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytaire diffus. Elle ne possède pas la mutation *JAK2* V617F, nous l'avons donc utilisée comme contrôle négatif lors de chaque technique.

3.1.2 Le mix de PCR

3.1.2.1 Les amorces

Les amorces utilisées, sont fabriquées par les laboratoires Biorad®. Les séquences de ces amorces ne sont pas accessibles pas les utilisateurs Elles sont conditionnées par aliquot de 200 µL ce qui permet de réaliser environ 180 tests.
Les amorces se conservent à 4°C jusqu'à la date de péremption.

Les amorces utilisées portent la référence : ddPCR Mut Assay, VAL JAK2 V617F, Hsa (Biorad®).

3.1.2.2 Le mix

Le MIX est conditionné par aliquots de 1mL et se conserve à -20°C pendant 18 mois ou jusqu'à la date de péremption.
Le mix utilisé porte la référence : ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) 500 Rxns (Biorad®). La composition du mix n'est pas accessible par les utilisateurs.

3.1.3 Les automates

3.1.3.1 Le QXDx AutoDG (BioRad®)

L'autoDG est l'automate qui va générer les gouttelettes dont nous avons besoin pour répartir l'ADN dans un grand nombre de compartiments. Une fois la plaque de PCR préparée avec tous les éléments nécessaires à la réaction de PCR (ADN, amorces, MIX), nous déposons cette plaque au niveau de l'emplacement A (Figure 12). Le bras mobile va ensuite prélever les échantillons colonne par colonne grâce aux pointes de pipettes et il va les déposer dans les cartouches DG. C'est à cet endroit et avec l'huile spécifique à la génération des gouttelettes que vont être formées les émulsions. Ces dernières seront ensuite déposées dans la plaque située à l'emplacement B qui est gardée au frais grâce à un bloc de refroidissement pour éviter la dégradation des gouttelettes.
Une fois les pointes de pipettes utilisés, elles sont jetées au niveau de la poubelle.
L'écran de contrôle sert quant à lui à programmer la technique en fonction du nombre de colonnes pleines et du type d'huile utilisée.

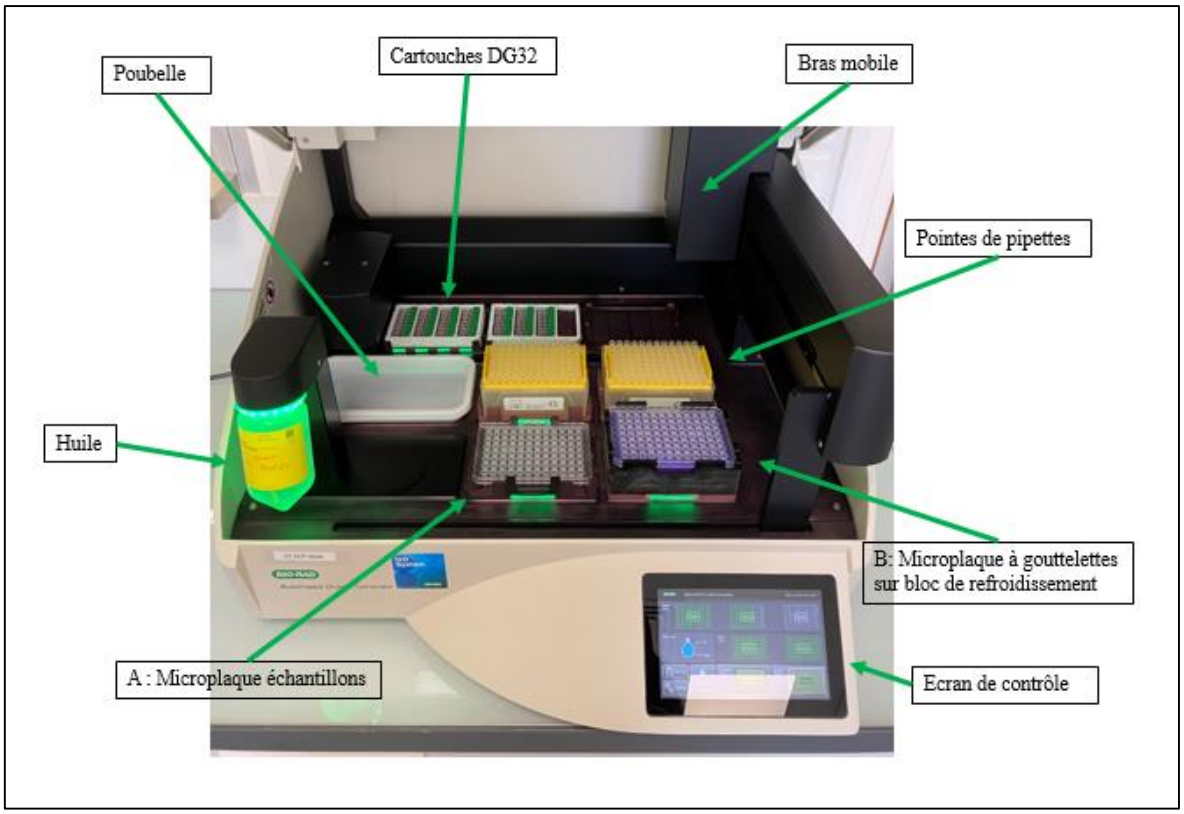


Figure 12 : QXDx AutoDG

3.1.3.2 Le QXDx 200 (BioRad®)

Le QXDx 200 est l'automate qui va permettre la lecture de fluorescence (Figure 13). Il est contrôlé par un ordinateur et le logiciel QuantaSoft (Biorad®) va transformer les données de fluorescence en ratio allélique pour chaque puit de la plaque.

Figure 13 : QXDx 200

3.2 Mode opératoire

3.2.1 Résumé étapes opératoires

Ce mode opératoire comprend 6 étapes opératoires (figure 14) :

- L'extraction d'ADN à partir de sang total, de culots de cellules mononuclées ou de culots de cytogénétique
- La préparation de la plaque de PCR 96 puits
- La génération des gouttelettes automatisée sur l'auto DG de Biorad®
- La PCR sur le thermocycleur Veriti de Life Technologies®
- La lecture de fluorescence sur le QX200 de Biorad®
- L'interprétation des résultats.

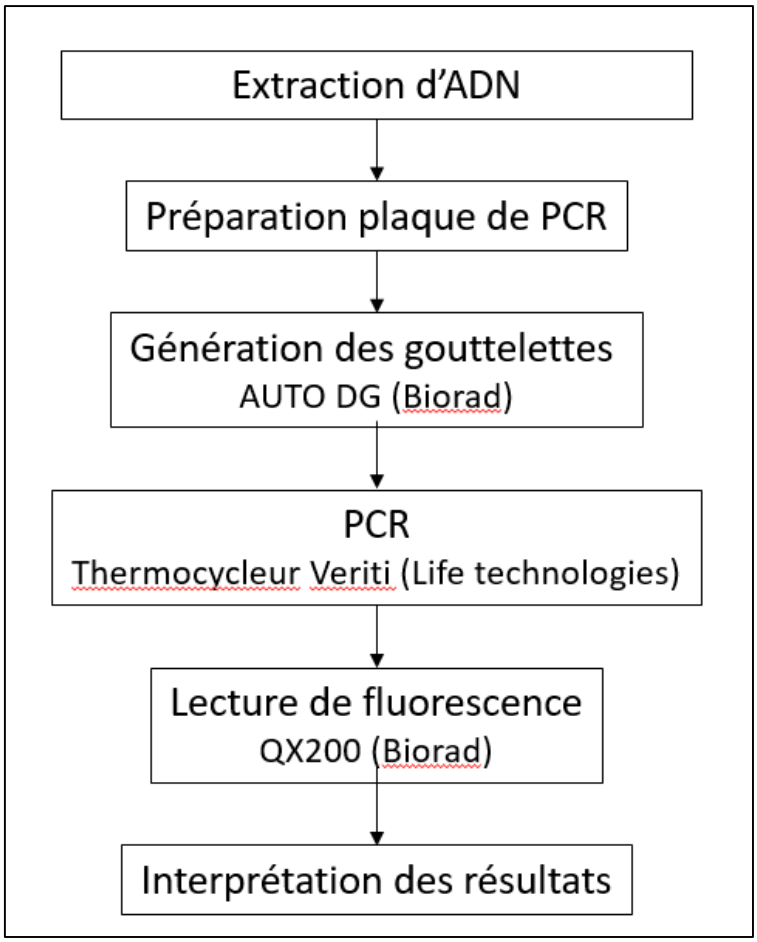


Figure 14 : Résumé des étapes opératoires

3.2.2 Extraction d'ADN

3.2.2.1 Sang total

L'extraction de l'ADN à partir de sang total est automatisée sur l'automate Maxwell RSC de Promega grâce au kit Maxwell RSC DNA Whole Blood kit. L'extraction dure environ 30 minutes et il est possible d'extraire jusqu'à 16 prélèvements simultanément. Pour chaque échantillon, il est nécessaire de préparer une cartouche d'extraction dans laquelle on va ajouter 300 µL de sang total. Les cartouches sont pré-remplies de réactifs et de particules paramagnétiques ; elles sont donc à usage unique.

Les étapes réalisées par l'automate sont la liaison des acides nucléiques aux particules paramagnétiques puis différents lavages et enfin l'élution de l'acide

nucléique libre qui pourra être utilisé immédiatement ou congelé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

3.2.2.2 Culots de cellules mononuclées obtenus à partir de sang ou de moelle osseuse

L'extraction de l'ADN à partir de culots cellulaires congelés se fait avec le kit FlexiGen de Quiagen ; elle dure environ 1 heure. Cette extraction est manuelle et utilise la propriété de précipitation de l'ADN en milieu alcoolique après ajout d'un agent chaotrope (urée, sels de guanidine ou perchlorate de lithium).

3.2.2.3 Culots cytogénétiques

L'extraction d'ADN à partir de culot cytogénétique, dans lequel les cellules sont conservées dans un mélange de méthanol et d'acide acétique, est une extraction manuelle effectuée grâce au kit d'extraction QIAamp DNA MiniKit 50 de chez Qiagen.

3.2.3 Dosage de l'ADN

Après l'extraction d'ADN, il est nécessaire de doser l'ADN obtenu. Ce dosage est effectué sur un spectrophotomètre, le BioSpec-Nano de Shimadzu. L'ADN est ensuite congelé à -20°C pour être conservé dans des conditions optimales.

3.2.4 Préparation de la plaque de PCR

3.2.4.1 Généralités

Une fois l'ADN extrait et dosé, nous pouvons préparer la plaque de PCR. Nous utilisons les ddPCR 96-Well PCR Plates qui ont été développées par BioRad pour les automates cités ci-dessus.

Il est nécessaire de décongeler les ADNs, les amorces et le QXDx ddPCR Supermix à température ambiante. Chaque tube doit être soigneusement mélangé grâce à un vortex pour assurer son homogénéité et vérifier l'absence de précipité, puis centrifugé pendant 30 secondes à 4000 rotations par minutes (rpm) pour recueillir le contenu du fond du tube.

Il faut ensuite préparer le mélange réactionnel de ddPCR en fonction du nombre de réactions nécessaires. Une fois les composants du mélange réactionnel réunis, il faut vortexer ce mélange puis aliquoter le volume nécessaire dans chaque puits de la microplaque. Une fois cette étape réalisée, nous pouvons rajouter l'ADN correspondant aux patients et aux contrôles pour un volume total de 22 µL, selon les recommandations du fournisseur.

Concernant les contrôles, pour chaque plaque réalisée, nous déposons un contrôle positif fort correspondant à la lignée SET à 50 %, un contrôle positif faible représenté par la lignée SET à 0.1 % en duplicate, un contrôle négatif avec la lignée U937 et un puits avec seulement de l'eau.

Lorsque tous les puits patients et contrôles sont prêts, il est nécessaire de remplir chaque puits vide de chaque colonne contenant des échantillons par 22µL de solution tampon.

Il est ensuite nécessaire de sceller notre plaque de PCR grâce au PX1 PCR Plate Sealer pour minimiser l'évaporation du mix réactionnel lors des étapes suivantes, puis de centrifuger brièvement la microplaque pour recueillir le contenu au fond des puits et éliminer les bulles.

3.2.4.2 Optimisation de la technique

L'objectif de l'optimisation de cette étape de préparation de la plaque de PCR est de connaitre les quantités optimales d'amorces et d'ADN à mettre dans chaque puits pour obtenir un signal satisfaisant. La quantité d'amorces devant être la plus faible possible dans un souci d'économie de réactifs. Pour cela nous avons réalisé trois tests.

Pour le premier test, nous avons utilisé un échantillon patient avec un ratio allélique de 21% en PCR quantitative. Nous avons testé 2 quantités d'amorces, 1µL et 2µL et 8 quantités d'ADN différentes, de 5ng à 100ng (tableau 5).

Tableau 5 : Plan de plaque pour le test quantités d'amorces et d'ADN

	1 µL	**2 µL**
A	5 ng	5 ng
B	10 ng	10 ng
C	15 ng	15 ng
D	20 ng	20 ng
E	25 ng	25 ng
F	50 ng	50 ng
G	75 ng	75 ng
H	100 ng	100 ng

Pour le second test, nous avons choisi trois échantillons avec respectivement 41 %, 3.4 % et 0 % de ratio allélique en qPCR. Nous avons passé les échantillons positifs avec 3 quantités différentes d'ADN : 25ng, 35ng et 50ng et l'échantillon négatif a été testé à 25ng et 50ng.

Le dernier test a consisté à tester une dernière fois deux quantités d'ADN, 35ng et 50ng afin de choisir la quantité d'ADN optimale.

Cette fois-ci nous sommes partis de la lignée SET que nous avons diluée au ½ , au 1/200 et au 1/1000 dans la lignée U-937. Cela nous a permis d'obtenir des échantillons SET 50 %, SET 0.5% et SET 0.1 %.
Les lignées SET 50 % et SET 0.1 % seront utilisées comme contrôles de qualité internes lors de toutes les techniques de recherche de mutations JAK2 V617F en dPCR.

3.2.5 Génération des gouttelettes

La génération des gouttelettes se fait grâce au QXDx AutoDG qui va réaliser un système de micro-fluidiques de nano-gouttelettes aqueuses circulant dans de l'huile. C'est une étape assez rapide, en moyenne 4 minutes par colonne. Le temps nécessaire à la production de gouttelettes pour une plaque de 96 puits est donc d'environ 48 minutes.
L'automate produit les gouttelettes colonne par colonne, c'est donc pour cela qu'il ne faut pas laisser de puits vide dans les colonnes entamées.
Il est nécessaire de charger tous les consommables nécessaires au bon fonctionnement du générateur de gouttelettes : les cartouches DG32, les pointes de pipettes, l'huile de production de gouttelettes, la microplaque d'échantillons et la microplaque à gouttelettes déposée sur un bloc de refroidissement.
A la fin de l'opération, les gouttelettes sont visibles à l'œil nu ce qui permet de contrôler leur présence ; la microplaque de gouttelettes doit également être scellée à l'aide d'un film d'étanchéité perçable.

3.2.6 PCR

L'étape de PCR est réalisée sur un thermocycleur Veriti de Life Technologies avec les conditions recommandées par le fournisseur (Annexe 6)

- Une étape d'initialisation (activation de la Taq) à 95°C pendant 10 minutes
- 40 cycles avec une étape de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes et une étape d'hybridation pendant 60 secondes

- 1 cycle à 98 °C pendant 10 minutes.
- 1 cycle à 4°C pendant 30 minutes pour permettre la stabilisation des gouttelettes.

Cette étape dure environ 2h15.

En suivant les recommandations du fournisseur et pour optimiser l'étape de PCR, nous avons procédé à un test pour choisir la température d'hybridation optimale : nous avons testé 6 températures d'hybridation différentes, entre 50 et 60°C.

L'important dans cette étape est de vérifier qu'il n'existe pas d'amplification non spécifique. Pour cela, nous avons donc réalisé une plaque de PCR en remplissant 6 colonnes avec dans chacune 6 puits de U-937, un puits de SET 0.1 % et un puits de SET 50 %.

3.2.7 Lecture de fluorescence

Après la PCR, la plaque de 96 puits est chargée dans le QXDx 200 pour la lecture de la fluorescence des gouttelettes.

Le temps nécessaire à la lecture de la fluorescence pour une plaque de 96 puits est d'environ 2 heures.

Les amorces WT et V617F utilisées sont marquées avec les fluorochromes HEX ou FAM respectivement.

3.3 Patients

Pour étayer ce travail et tester cette nouvelle technique de PCR, nous avons décidé de passer deux séries de patients :

- Une première avec des échantillons avec un très faible nombre de copies *JAK2* mutées en qPCR (entre 3 et 9 copies V617F).
- Une deuxième série qui a consisté à repasser des échantillons provenant de patients du service de médecine thérapeutique avec

antécédent de thrombose dont le bilan de thrombophilie était négatif et la recherche de mutation *JAK2* V617F a été retrouvée négative en qPCR.

4 Résultats

4.1 Résultats rendus par le QXDx 200

A la fin de la lecture de la fluorescence, le QXDx 200 nous présente des graphiques bidimensionnels de la répartition des gouttelettes pour chaque puits (Figure 15). Le nuage vert représente les gouttelettes WT tandis que les points bleus représentent les gouttelettes comportant la mutation *JAK2* V617F. Les gouttelettes oranges possèdent les deux types d'allèles : mutée et WT.

Le seuil de positivité des gouttelettes est représenté par la ligne horizontale rose. Ce seuil est déterminé pour chaque plaque de PCR, entre 2000 et 4000 d'intensité de fluorescence pour le fluorochrome FAM

Les résultats sont également disponibles sous forme de fichier CSV.

D'après la distribution de Poisson, le nombre absolu de copies JAK2 WT et le nombre de copies JAK2 mutées par puits sont calculées grâce au logiciel QuantaSoft (BioRad). Le ratio allélique est ensuite calculé avec la formule : $ratio\ allélique = \frac{Nombre\ de\ copies\ JAK2\ V617F}{Nombre\ de\ copies\ JAK2\ V617F + nombre\ de\ copies\ WT}$ x 100.

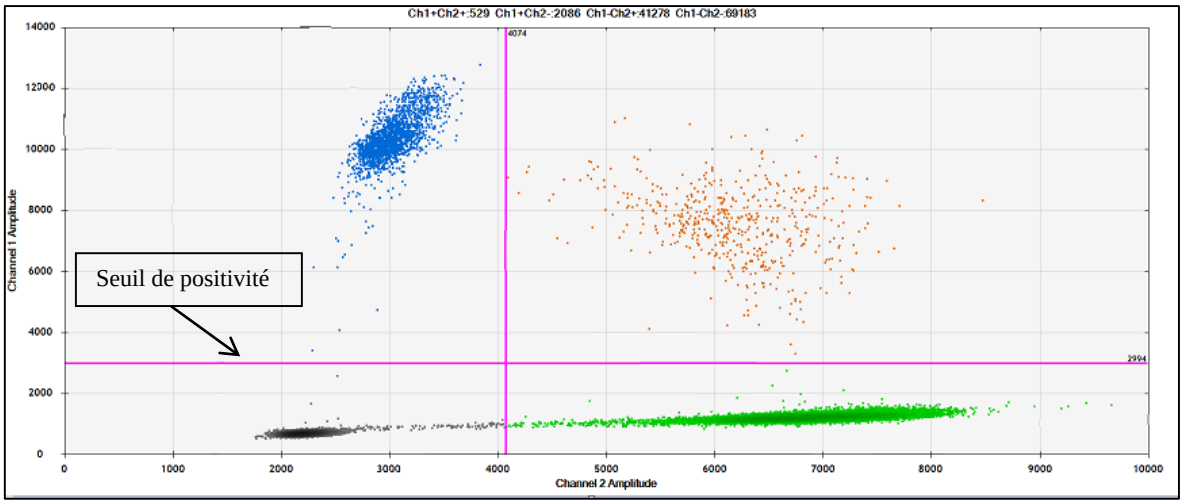


Figure 15 : Nuages de points pour un puit après lecture de la fluorescence par le QXDx 200

Les résultats sont ensuite transférés dans notre système informatique GLIMS sous forme qualitative, positif ou négatif et sous forme quantitative avec le ratio allélique pour qu'ils soient visibles par les prescripteurs.

4.2 Optimisation de la technique

Pour débuter nos tests d'optimisation de technique, nous nous sommes basés sur la publication de *La Rocca* dans laquelle sont utilisés 2 µL d'amorces et 25 ng d'ADN par puits de réaction dans un volume total de 20 µL. (105).

4.2.1 Tests quantités d'amorces

Les résultats du premier test de quantité d'amorce et d'ADN visible dans la figure 16 démontrent une stabilité plus importante des résultats lors de l'utilisation de 2µL d'amorce. On remarque en effet que nous avons un point discordant avec 15ng d'ADN et 1µL d'amorces ; ce point est à 19.4 % alors que la moyenne générale est à 14.6 %.

Concernant la quantité d'ADN, nous n'avons pas observé sur cet essai de différence notable dans les résultats obtenus.

Nous remarquons sur la figure 17 que la fluorescence est moindre lors de l'utilisation de 1 µL d'amorce ; néanmoins la séparation des différents nuages reste satisfaisante.

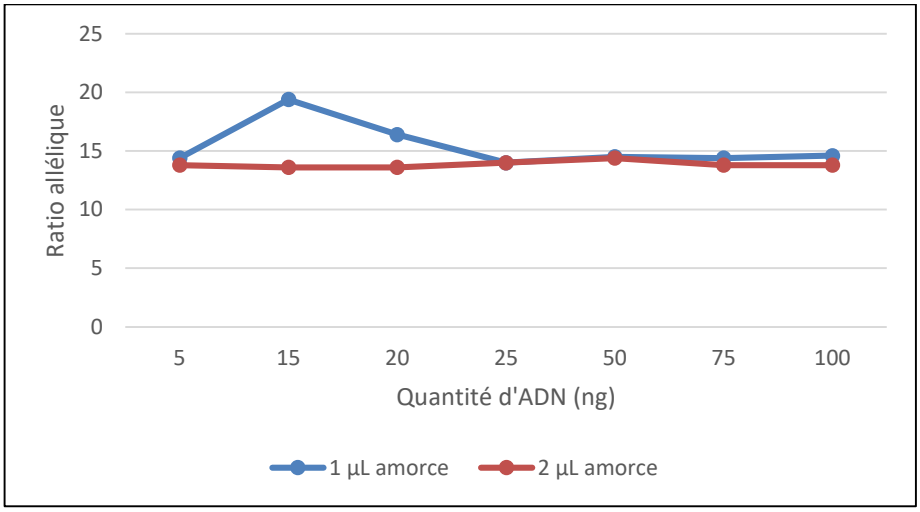


Figure 16 : Résultats des tests des quantités d'amorces et d'ADN

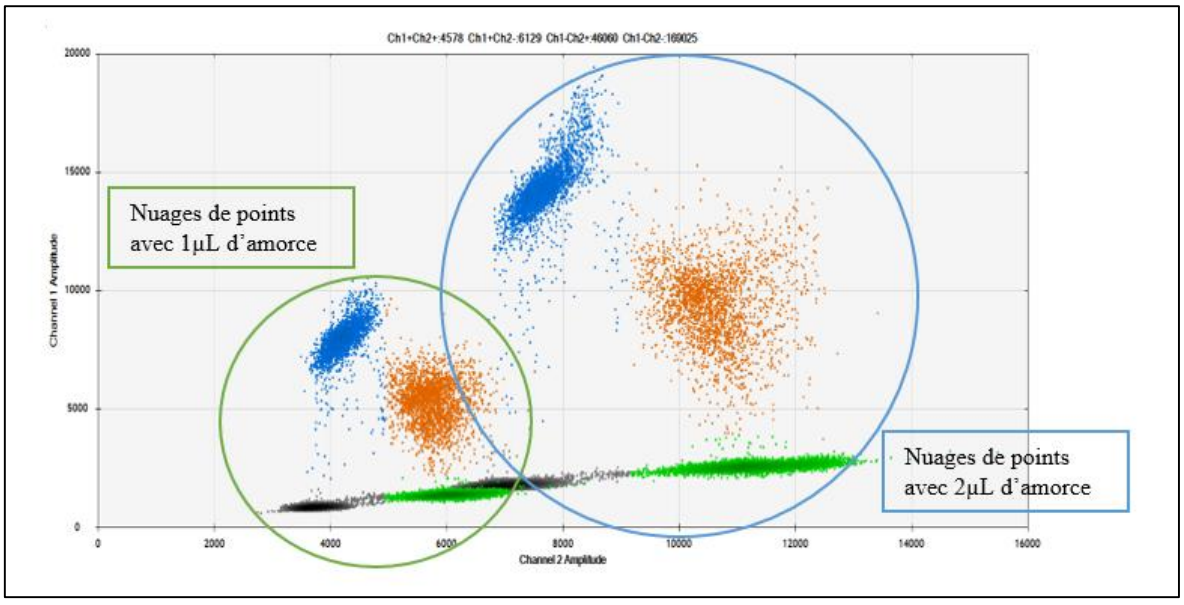


Figure 17 : Nuages de points lors du test quantité d'amorce et d'ADN.

Ne pouvant expliquer le point aberrant avec 15 ng d'ADN et 1 µL d'amorces lors du premier test, nous avons souhaité réaliser une autre technique avec cette quantité d'amorce. Les résultats (Figure 18) montrent qu'avec 1µL d'amorce le test est spécifique ; en effet, il n'y a eu aucune amplification pour l'échantillon négatif.

Nous ne voyons toujours pas de différence significative concernant les quantités d'ADN.

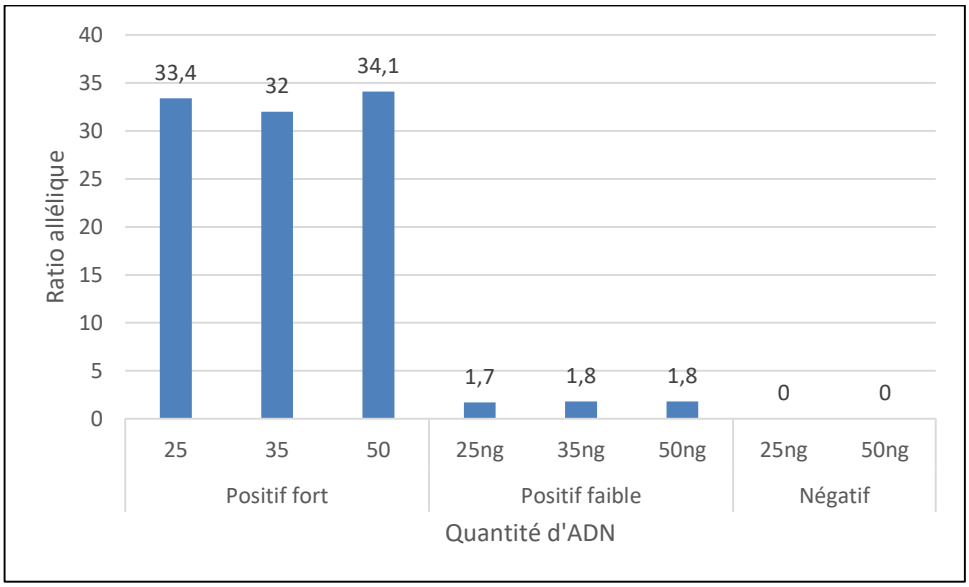


Figure 18 : Ratios alléliques obtenus avec 1 µL d'amorce

4.2.2 Test des quantités d'ADN

Les résultats obtenus lors des derniers tests sur les quantités d'ADN (Tableaux 6 et 7) nous montrent une bonne spécificité. En effet : tous les puits avec la lignée U937 sont bien négatifs.

Néanmoins nous avons mis en évidence une meilleure sensibilité avec l'utilisation de 50ng. En effet, nous constatons qu'avec 35 ng, il n'y a aucune amplification pour la SET 0.1 % dans 2 puits sur 5 (40 %) alors que tous les puits (100 %) avec la SET 0.1 % sont positifs avec 50 ng d'ADN.

Tableau 6 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus avec 35 ng d'ADN

	1		2	
A	SET 50 %	43,4	SET 0,1 %	0
B	SET 50 %	44,3	SET 0,1 %	0,05
C	SET 50 %	42,2	U937	0
D	SET 50 %	44	U937	0
E	SET 50 %	42,3	U937	0
F	SET 0,1 %	0,15	U937	0
G	SET 0,1 %	0,04	U937	0
H	SET 0,1 %	0	U937	0

Tableau 7 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus avec 50 ng d'ADN

50ng	1		2	
A	SET 50 %	43,2	SET 0,1 %	0,037
B	SET 50 %	43,9	SET 0,1 %	0,07
C	SET 50 %	44,2	SET 0,1 %	0,017
D	SET 50 %	43,7	SET 0,1 %	0,017
E	SET 0,5 %	0,42	U937	0
F	SET 0,5 %	0,3	U937	0
G	SET 0,5 %	0,4	U937	0
H	SET 0,5 %	0,47	U937	0

4.2.3 Test de la température d'hybridation

Les résultats des tests de température d'hybridation montrent une très bonne sensibilité aux 6 températures testées ; en effet, il n'y a eu aucune amplification dans les puits contenants la lignée U937. Concernant les résultats des lignées SET 0.1 % et SET 50 % (Figure 19), les résultats sont stables à l'exception d'un ratio allélique un peu bas pour la SET 0.1 % à 50°C qui sort seulement à 0.04 %.

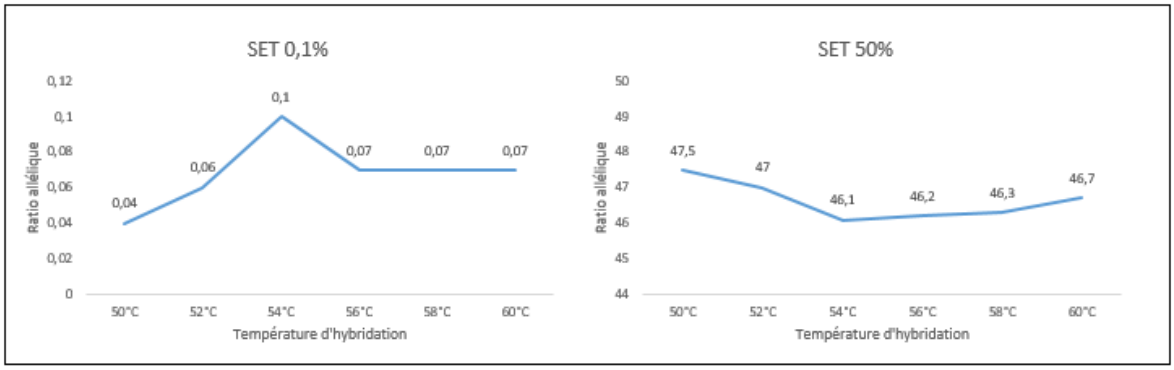


Figure 19 : Ratios alléliques en fonction de la température d'hybridation

Bien que les ratios alléliques ne soient pas différents en fonction des températures d'hybridation, nous avons remarqué une forte diminution de la fluorescence avec l'augmentation de la température (Figure 20). Nous constatons en effet une fluorescence maximale d'environ 14000 en ordonnées et 11000 en abscisses à 50°C, 52°C et 54°C puis une diminution progressive de la fluorescence en augmentant la température jusqu'à arriver à seulement 4000 en ordonnées et 6000 en abscisses à 60°C.

Nous pouvons voir également que les nuages de points sont nettement moins distincts à 60°C (Figure 20).

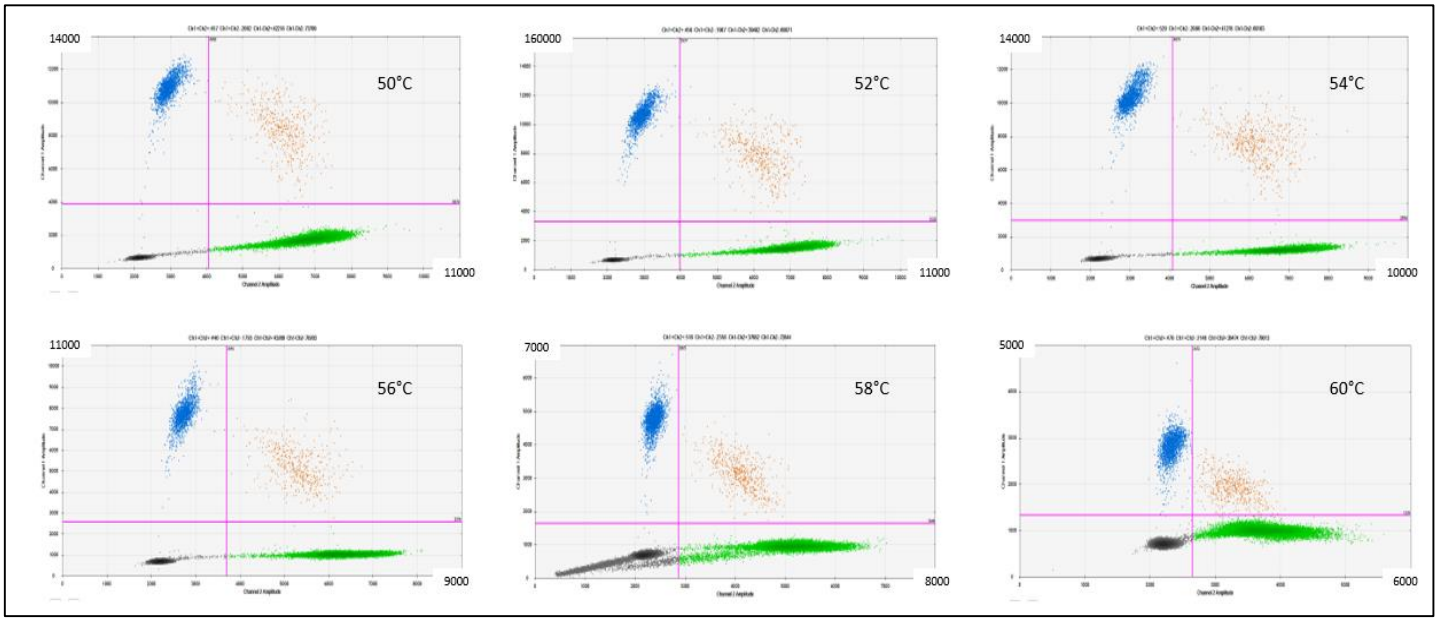


Figure 20 : Nuages de points en fonction de la température d'hybridation

4.3 Dossier de validation de méthode

Nous détaillerons dans ce chapitre tous les items de la validation de méthode d'une portée B concernant le quatrième sous-processus qui porte sur la technique de PCR digitale développée pendant ce travail (Annexe 4)

4.3.1 Répétabilité

D'après le SH GTA 04 :
9.6.1.1 : « L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaitre les performances initiales. » (103)

Le SH GTA 04 précise également que la répétabilité doit être testée pour chaque matrice susceptible d'être analysée et qu'il est recommandé de tester au moins deux niveaux de concentrations dont une si possible proche du seuil décisionnel. Concernant le nombre de valeurs, l'effectif recommandé est de 30 pour avoir une interprétation statistique optimale.

Dans ce travail, nous avons réalisé deux essais de répétabilité sur deux valeurs cibles : 50 % et 0.1 %. Nous sommes partis de la lignée cellulaire SET que nous avons diluée au demi dans de la lignée U937 qui est une lignée négative pour obtenir notre contrôle à 50 %. Nous avons fait de même pour le contrôle à 0.1 % mais en diluant la lignée SET au $1000^{ème}$.
En raison du coût des réactifs, nous avons décidé de passer 5 fois la lignée SET 50 % et 8 fois la lignée SET 0.1 %. La lignée SET 0.1 % a été déposée plus de fois que la SET 50 % du fait de sa valeur proche du seuil de détection.

Les résultats obtenus dans le tableau 8 sont conformes aux exigences du laboratoire et aux recommandations du groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes (GBMHM) qui préconisent un maximum de trois fold-change (106).
Le fold-change est le rapport du niveau moyen d'expression d'un gène dans une condition par rapport à une autre.

Tableau 8 : Résultats des tests de répétabilité

REPETABILITE **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type (log)**	**CV** (%)	**Fold Change**	**Fold Change** (%) **retenu par le laboratoire**	**Conclusion**
Lignée cellulaire SET 50 %	5	38.38	0,01	1.3	1.03	< 2 fois	Conforme
Lignée cellulaire SET 0.1 %	8	0,08	0,19	40	2.36	< 3 fois	Conforme

4.3.2 Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire

D'après le SH GTA 04 :
9.6.1.2 : « L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages… » (103).
En pratique, la fidélité intermédiaire est calculée à partir des contrôles internes de qualité (CIQ) qui sont passés quotidiennement sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et sur deux niveaux de concentration.

Nous avons travaillé avec les mêmes matrices que pour les tests de répétabilité, la SET 50% et la SET 0.1% que nous avons mis dans chaque technique

lancée pour ce travail. Ces deux dilutions de lignée nous serviront de contrôles internes de qualité.

Notre technique n'étant pas encore utilisée en routine, nous n'avons pas pu recueillir toutes les données nécessaires au calcul de la fidélité intermédiaire Nous présentons tout de même les résultats préliminaires dans le tableau 9. Nous avons à ce jour obtenu 9 valeurs de chaque contrôle.

Ces résultats préliminaires sont conformes aux exigences du laboratoire et aux recommandations du GBMHM qui préconisent un maximum de 5 fold-change pour les résultats de fidélité intermédiaire (106)

Tableau 9 : Résultats des tests de fidélité intermédiaire

FIDELITE INTERMEDIAIRE **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type (log)**	**CV** (%)	**Fold Change**	**Fold Change** (%) **retenu par le laboratoire**	**Conclusion**
Lignée cellulaire SET 50 %	9	39.58	0.04	8.6	1.18	< 5 fois	Conforme
Lignée cellulaire SET 0.1 %	9	0.07	0.26	50.2	3.28	< 5 fois	Conforme

4.3.3 Variabilité inter-opérateurs

D'après le SH GTA 04 :

9.6.2.1 : « La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur la vérification de la compétence des opérateurs (habilitation). Des critères pourront être établis, par exemple, par l'intermédiaire d'une analyse de la robustesse ». (103) C'est un indicateur de maîtrise de la réalisation de méthodes non automatisées.

Au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Saint Etienne, quatre opérateurs vont être amenés à réaliser cette technique en routine ; nous apprécierons la variabilité inter-opérateurs grâce aux données de fidélité intermédiaire qui seront incrémentées au fur et à mesure.

Concernant la formation des techniciens, les automates sont déjà utilisés en routine pour la quantification du transcrit de fusion *BCR-ABL*, nous n'avons donc pas eu besoin de les former à l'utilisation de l'AutoDG et du QXDx 200.

4.3.4 Justesse

D'après le SH STA 04 :
9.6.1.2 : « La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie). »
« Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la valeur vraie. L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ). » (103)

L'approche de la justesse n'est pas applicable dans notre cas car il n'existe pas de programme de CIQ externalisés pour cette technique.

4.3.5 Exactitude

D'après le SH GTA 04 :
9.6.1.4 : « L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. Comme la justesse, l'exactitude devrait être vérifiée à partir d'étalons primaires ou de matériaux de référence certifiés ou de

méthodes de référence traçables au SI ou à des étalons internationaux. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité (EEQ). » (103)

Pour la recherche et la quantification de la mutation *JAK2* V617F, le laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Saint Etienne est inscrit aux programmes d'EEQ du Groupe des Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes (GBMHM) qui envoie quatre échantillons une à deux fois par an.

Pour les critères quantitatifs comme le nôtre, une valeur de référence appelée valeur cible est calculée ; elle correspond à la moyenne de l'ensemble des résultats des participants. Ensuite, pour calculer le résultat de chaque laboratoire, la méthode du z-score est utilisée (Figure 21). A chaque résultat une note sous forme de lettre (A, B, C ou D) est attribuée en fonction de l'écart à la moyenne.

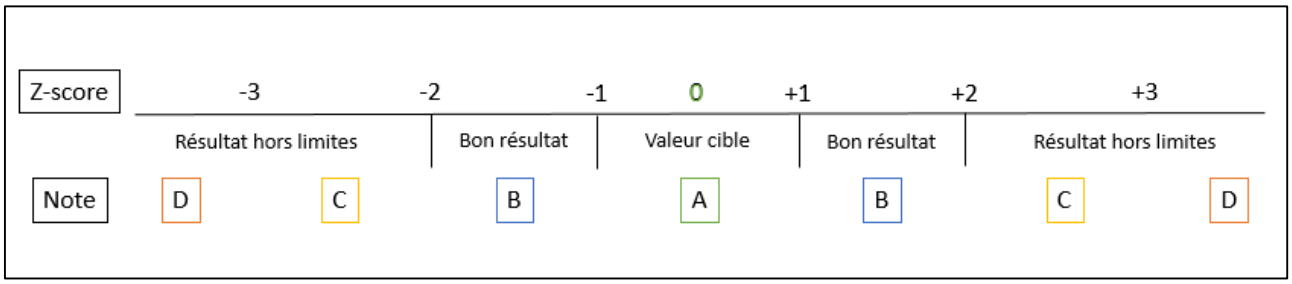


Figure 21 : Méthode du z-score pour le résultat des EEQ

Pour l'étude de l'exactitude de notre dPCR, nous avons testé les quatre échantillons des trois derniers EEQ reçus pendant la période de juin 2020 à décembre 2020.

Les résultats visibles sur le tableau 10 sont conformes aux besoins du laboratoire. Nous n'avons en effet aucun C ou D, il n'y a donc pas de résultat non conformes.

Tableau 10 : Résultats des tests d'exactitude

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ) **Contrôles quantitatifs ☒ ; Contrôles qualitatifs ☐**					
Echantillons	**Valeur Labo**	**Cible (toutes techniques)**	**Bornes 2sigma**	**Z score**	**Conclusion [5]**
Echantillon CQ22.2 JA	5.2	5.83	3.85-8.82	A	Conforme
Echantillon CQ22.2 JB	14.7	17.76	12.29-25.67	B	Conforme
Echantillon CQ22.2 JC	0	0		A	Conforme
Echantillon CQ22.2 JD	1.6	1.93	1.22-3.06	A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JA	8,4	8,73	5.51-13.84	A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JB	47,1	48,32	36.65-63.69	A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JC	0	0		A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JD	1,7	2,29	1,37-3.80	B	Conforme
Echantillon CQ23.2 JA	24	27.83	16-77-46.19	A	Conforme
Echantillon CQ23.2 JB	0	0		A	Conforme
Echantillon CQ23.2 JC	13.5	15.63	8.99-27.16	A	Conforme
Echantillon CQ23.2 JD	4	4.08	2.35-7.09	A	Conforme

4.3.6 Sensibilité et spécificité analytique

Tableau 11 : Données de sensibilité et spécificité (VP = vrai positif, FP = faux positif, FN = faux négatif, VN = vrai négatif, VPP = valeur prédictive positive, VPN = valeur prédictive négative)

<table>
<tr><th colspan="2">SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
(étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐</th></tr>
<tr><td>VPP : 0.984
VPN : 0.976
Sensibilité : 0.985
Spécificité : 0.976</td><td><table><tr><td></td><td>SET</td><td>U937</td></tr><tr><td>Positif</td><td>66(VP)</td><td>1 (FP)</td></tr><tr><td>Négatif</td><td>1 (FN)</td><td>40 (VN)</td></tr></table></td></tr>
</table>

Les calculs de la sensibilité (Se), de la spécificité (Sp), de la VPP et de la VPN se font avec les formules : $Se = \frac{VP}{VP+FN}$, $Sp = \frac{VN}{VN+FP}$, $VPP = \frac{VP}{VP+FP}$ et $VPN = \frac{VN}{VN+FN}$

Durant toutes nos techniques, nous avons passé 67 fois la lignée SET et 41 fois la lignée U937. Une fois la lignée SET est sortie négative, elle était diluée à 0.1 %, et une fois la lignée U937 est sortie positive avec un ratio allélique de 0.025 %.

On obtient donc des valeurs de sensibilité et spécificité (tableau 11) proches de 1 qui est la valeur idéale.

4.3.7 Incertitudes

D'après la norme ISO 15189 :

5.6.2 : « Le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est pertinent et possible. Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte. Les sources contribuant à l'incertitude peuvent inclure l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la sélection des aliquotes d'échantillon, les calibrateurs, les matériaux de référence, les grandeurs d'entrée,

l'équipement utilisé, les conditions expérimentales, l'état de l'échantillon et les changements de manipulateurs » (100)

Le SH GTA 14 a été conçu pour venir en aide aux laboratoires dans la détermination de l'incertitude de mesure des résultats ; il précise que l'incertitude de mesure est « un paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées ». (107)

Pour le calcul de l'incertitude, nous avons utilisé l'incertitude composée qui regroupe l'incertitude due à la dispersion des CIQ et l'incertitude due à la justesse (EEQ). Ce calcul a été réalisé grâce au tableau de calcul des incertitudes proposé par le GBMHM et disponible en ligne sur http://www.gbmhm.fr/.
Les résultats (tableau 12) sont conformes aux exigences du laboratoire (108) qui sont de maximum cinq fold-change.

Tableau 12 : Données d'incertitude de mesure (U_{CIQ} = écart type des CIQ, U_{EEQ} = écart type des EEQ)

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ☐ ; calcul ☐		
	Incertitudes calculées	**Exigence de performances**
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	$U(C) = \sqrt{U_{CIQ}^2 + U_{EEQ}^2}$	SH GTA 04
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : SET 50 %	Fold Change : 1.34	< 5 fold change
Quantification de l'incertitude (niveau 2) : SET 0,1 %	Fold Change : 3.36	< 5 fold change

4.3.8 Etendue de mesure

Dans ce paragraphe, nous allons traiter de la limite de détection (LOD), de la limite de quantification (LLOQ) et de la limite supérieure de linéarité (ULOQ).

4.3.8.1 La limite de détection (LOD)

D'après le SH GTA 04, la limite de détection correspond au « plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions » (103). Pour la mesurer, il est recommandé d'effectuer trente mesures répétées d'une matrice dénuée de l'analyte à doser. Nous sommes partis de la lignée U937 qui ne possède pas la mutation *JAK2* V617F et nous l'avons passée 30 fois. Sur ces trente passages, elle est sortie 29 fois négatives et une fois nous avons trouvé un ratio allélique de 0.025 %.
Il faut ensuite calculer l'écart type de ces trente mesures, l'écart type obtenu :

$$Sb_{U937} = 0.00456.$$

La formule usuelle pour le calcul de la limité de détection est la suivante :

$$LOD = \mu_{U397} + 3^* Sb_{U937} = 0.01\ \%$$

μ_{U397} = moyenne des 30 passages de U937

Il est donc possible de détecter la présence de la mutation *JAK2* V617F à partir d'un ratio allélique de 0.01 %.

4.3.8.2 La limite de quantification (LLOQ)

D'après le SH GTA 04, la limite de quantification est « la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue. » (103)

Elle peut être évaluée à l'aide de dilutions d'un étalon ou se calculer sur la base de l'écart type de la limite de détection selon la formule :

$$LLOQ = \mu_{U397} + 10^* Sb_{U937} = 0.047\ \%$$

Nous sommes donc capables de quantifier la mutation *JAK2* V617F à partir d'un ratio allélique de 0.047 %

4.3.8.3 La limite supérieure de linéarité (ULOQ)

La limite supérieure de linéarité se calcule en diluant un échantillon de concentration très élevée. On vérifiera ensuite l'existence d'une relation linéaire entre les dilutions effectuées (concentrations attendues) et les concentrations observées.

Nous sommes partis d'un échantillon présentant un ratio allélique élevé en PCR quantitative (90 %) et nous avons réalisé dix dilutions en cascades (2 en 2) pour obtenir une gamme de mesure allant de 90 % à 0.07 % de ratio allélique. Nous avons passé chaque échantillon en quintuplicate et fait une moyenne de ces cinq résultats obtenus (Figure 22).

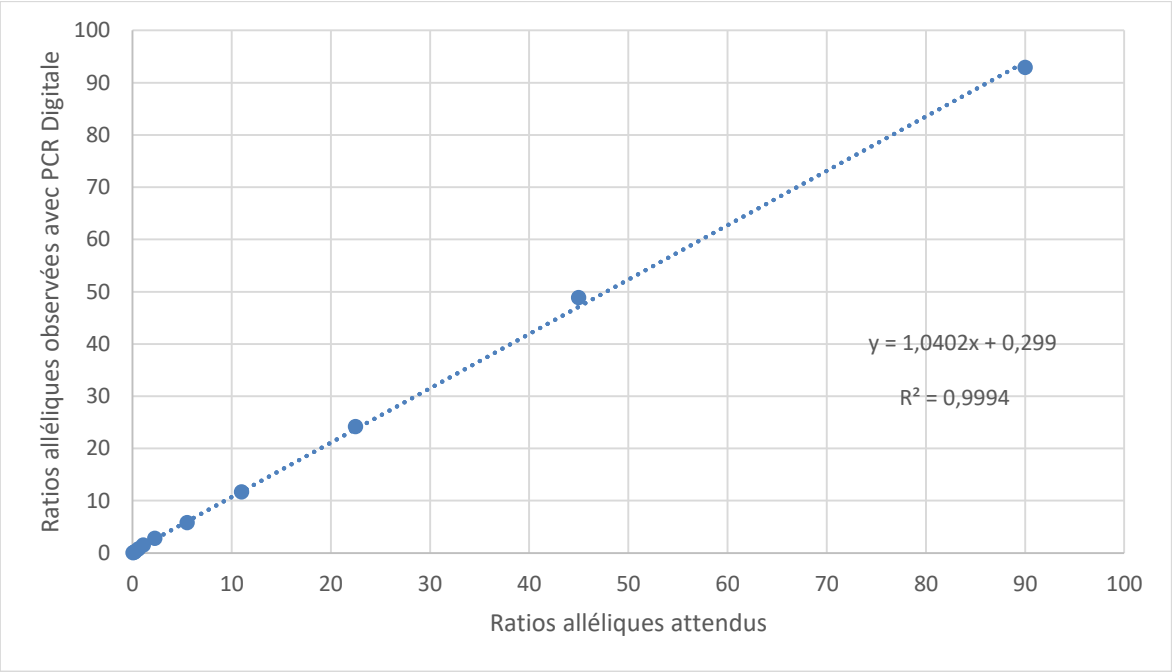


Figure 22 : Résultats obtenus lors de la réalisation des tests d'étendue de mesure

L'équation de la droite obtenue est : y = 1.0402x + 0.299.
Le coefficient de détermination obtenu est : 0.9994
Cette étude de linéarité nous a permis d'obtenir une plage mesurable s'étendant de 0.1 % à 91 %.

Ces résultats sont comparables à ceux d'une étude comparant la qPCR avec la ddPCR de chez Biorad® dans laquelle la ddPCR permet d'obtenir un coefficient de variation de 0.962 entre les valeurs attendues et les valeurs obtenues. Dans cette même étude, la ddPCR a une LOD de 0.01 % donc identique à la nôtre.(93).

4.3.9 Comparaison de méthode

D'après le SH REF 02 :
6.5.6.4 : « Le laboratoire doit s'assurer de la comparabilité des résultats obtenus pour l'ensemble des systèmes analytiques utilisés pour un même examen ainsi que pour les analyseurs multi-modules. » (101)

D’après la norme NF EN ISO 15189 :

5.6.4 : « Il doit exister un moyen défini permettant de comparer les procédures, équipements et méthodes utilisés et d’établir la comparabilité des échantillons de patients dans les intervalles critiques appropriés pour des procédures et/ou équipements identiques et/ou des sites différents. (…) Si les systèmes de mesure donnent des intervalles de mesure différents pour le même mesurande et en cas de modification des méthodes d’analyse, le laboratoire doit informer les utilisateurs des différences de comparabilité des résultats et traiter les implications pour la pratique clinique ». (100)

En pratique, il faut analyser au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l’étendue du domaine physiopathologique sur deux méthodes : celle à tester et celle utilisée au laboratoire

Nous avons comparé notre ancienne méthode basée sur la PCR quantitative avec notre nouvelle pratique, la PCR Digitale. Nous avons sélectionné 30 échantillons appartenant à des patients différents et permettant de couvrir une grande partie de l’étendue de mesure (de 0 % à 91 % de fréquence allélique) (Figures 23 et 24).

Nos résultats avec la dPCR sont globalement plus faibles que ceux trouvés avec la qPCR. On voit en effet dans le graphique des différences, que tous les point exceptés un sont en dessous de la ligne zéro.

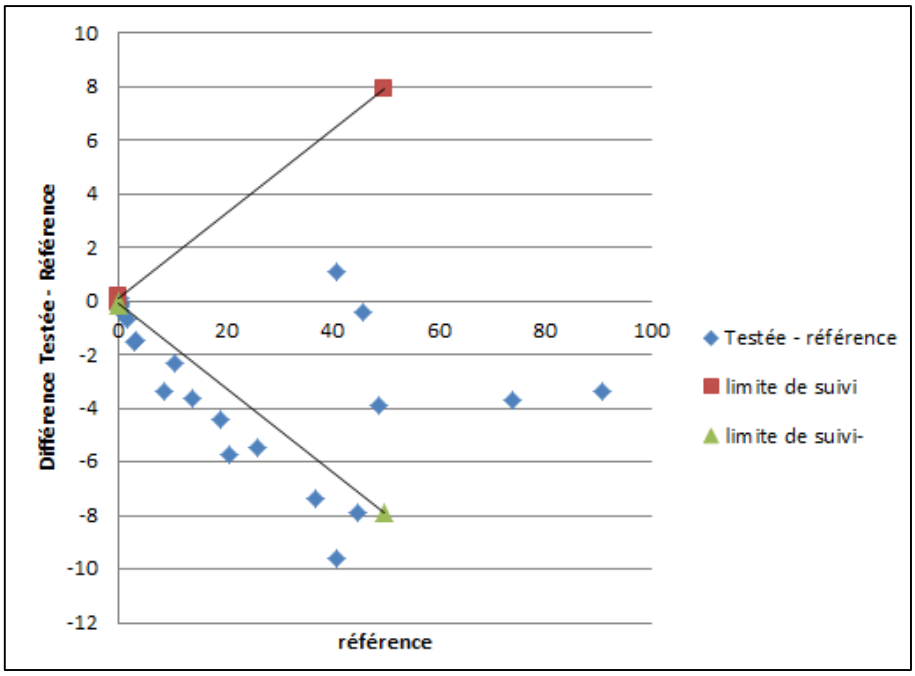


Figure 23 : Différences obtenues lors de la comparaison de méthodes

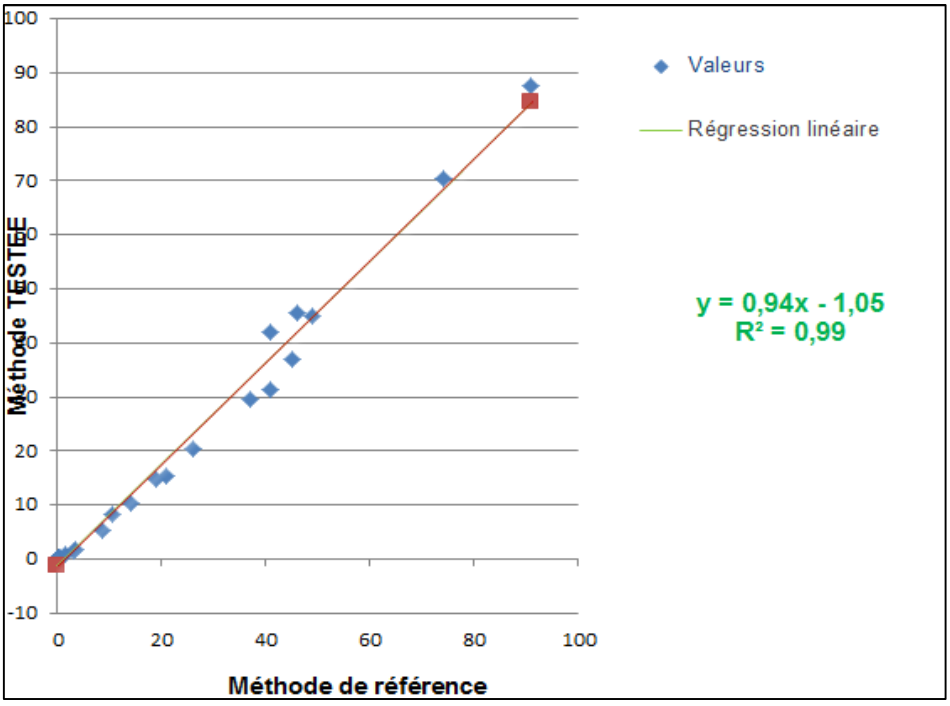


Figure 24 : Droite de régression obtenue lors de la comparaison de méthodes

La valeur du coefficient de corrélation n'a pas d'intérêt pour la comparabilité de deux méthodes ; ce sont la pente et l'ordonnée à l'origine de l'équation de la droite de régression qui expriment la similitude des méthodes comparées. Ici nous avons obtenu l'équation : y = 0.94x-1.05 avec 0.94 la pente de la droite et 1.05 l'ordonnée

à l'origine. La similitude est optimale si la valeur de la pente se rapproche de 1 et l'ordonnée à l'origine de 0 (103).
Les résultats sont concordants entre les deux techniques.

4.3.10 Interférences

D'après le SH GTA 04 :
9.6.1.8 : « Une méthode « sélective » ou « spécifique » permet le dosage d'un analyte sans interférence dans une matrice complexe. Des substances dites « interférentes » altèrent le signal de mesure pouvant entrainer des résultats erronés. Une étude expérimentale pertinente doit être effectuée dans le cas d'une portée de type B afin d'établir l'influence de substances présentes dans la matrice et potentiellement interférentes. » (103).

Pour cette technique, les interférences ont été décrites dans les trois premiers sou-processus qui correspondent aux extractions d'ADN. Pour l'extraction à partir de sang total et de culots de cellules mononuclées, il a été testé l'interférence de l'héparine, de l'hémolyse et de l'excès de protéines. Pour l'extraction d'ADN à partir de culots cytogénétiques, il n'a pas été testé d'interférence car ce sont des prélèvements précieux de plus, ils sont lavés plusieurs fois avant l'extraction
Pour limiter les risques d'interférences de l'héparine, seuls les tubes EDTA sont acceptés.

4.3.11 Contamination

D'après le SH GTA 04 :
9.6.1.9 : « Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques notamment au niveau des systèmes de pipetage des échantillons (contamination inter-échantillons) et de distribution des réactifs (contamination inter-réactifs). » (103)

Il existe la contamination inter-échantillons et la contamination inter-réactifs, cette dernière n'étant pas applicable à notre technique car les mix réactionnels sont préparés de façon unique

Pour tester le risque de contamination inter-échantillons de notre technique, nous avons sélectionné un échantillon avec une fréquence allélique élevée connue et nous avons, sur notre plaque de PCR, alterné cet échantillon avec la lignée U937 (Figure 25).

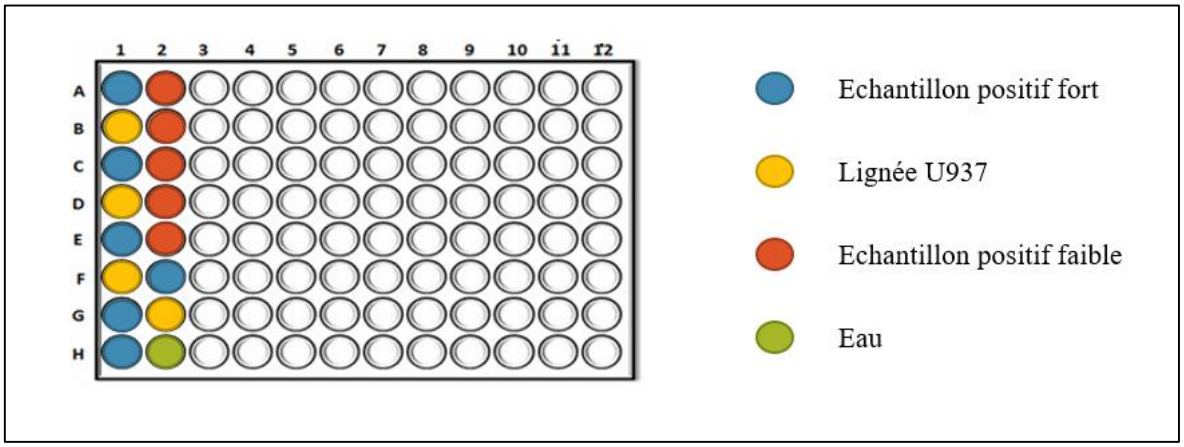


Figure 25 : Plan de plaque du test de contamination

Les résultats obtenus dans le tableau 13 montrent l'absence de contamination inter-échantillon ; en effet, les échantillons négatifs représentés par la lignée U937 ont une fréquence allélique nulle.

La contamination inter-échantillons est également vérifiée à chaque plaque de PCR, en effet nous alternons un puit avec de l'eau, un puit avec la SET 50% puis un puit ave la lignée U937 et enfin deux puis de SET 0.1%.

Tableau 13 : Fréquences alléliques obtenues pour le test de contamination inter-échantillon.

	1	2
A	44,20%	2%
B	0%	2,20%
C	45,40%	2,10%
D	0%	2%
E	43,80%	2,30%
F	0%	45,20%
G	45,90%	0%
H	45,20%	0%

4.3.12 Robustesse et fiabilité des réactifs

D'après le SH GTA 04 :
9.6.1.10 : « La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. » (103)

La robustesse de la méthode a été contrôlé lors des tests d'optimisation de la méthode. En effet, pendant ces tests, nous avons essayé plusieurs quantités d'amorces et d'ADN ainsi que des températures d'hybridation différentes.
Les résultats (Figures 16 à 20 et tableaux 5 et 6) montrent que les ratios alléliques sont stables peu importe les changements apportés. Il y a tout de même deux puits de SET 0.1 % qui sont sortis négatifs avec 35 ng d'ADN et 1 µL d'amorces, c'est pour cela que nous avons choisi de travailler avec 50 ng d'ADN. Toutefois il n'y avait pas de problème avec les puits contenant la SET 50 %

Concernant la stabilité des réactifs, nous respectons les dates de péremption et nous suivons les recommandations du fournisseur, les amorces étant conservées à 4°C et le mix à -20°C.

4.3.13 Intervalles de référence

Dans les syndromes myéloprolifératifs, le seuil de signification clinique de la mutation *JAK2* V617F est de 1 % (109). Entre 0,1 % et 1 %, la présence d'une mutation *JAK2* V617F peut être le témoin d'une hématopoïèse clonale. Elle doit entrainer la recherche des autres mutations fréquentes des NMP (*JAK2* exon12, *CALR* et *MPL*) ou en cas de négativité des trois marqueurs un NGS pour éliminer de faux négatifs et rechercher des mutations rares. Entre 0.01 % et 0.1 % le résultat srea rendu douteux avec demande d'un prélèvement de contrôle. En dessous de 0,01 %, le résultat est considéré comme négatif (110).

4.4 Patients avec faible nombre de copies en qPCR

Nous avons passé 30 échantillons en duplicate. Ces échantillons proviennent de patients ayant été passé en qPCR de janvier 2019 à juin 2020 et pour lesquels nous avons obtenus entre 3 et 9 copies *JAK2* V617F. Nous avons souhaité vérifier si le signal obtenu était un vrai signal correspondant à une hématopoïèse clonale ou un signal non spécifique.

Nous pouvons voir sur les résultats (Annexe 1 et Figure 26) que 5 patients (17%) sur les 30 ont un ratio allélique positif en PCR digitale. Sur ces 5 patients, 2 (patient 13 et patient 23) ne sont positifs que sur un puits, ce qui peut nous faire penser à une amplification non spécifique.
Les trois autres patients (patients 7, 9 et 21) présentent respectivement des ratios alléliques de 0.095 %, 0.022 % et 0.028 %.
Les patients 7 et 9 sont des patients venus en consultation à l'ICLN (Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth) alors que le patient 21 était en hospitalisation en médecine interne lors de son prélèvement.
La figure 26 permet de nous rendre compte que les faibles VAF observées avec la qPCR étaient liées à des amplifications non spécifiques. En effet, la dPCR rend en signal complètement négatif pour 25 patients. Il n'était néanmoins impossible de

distinguer ces résultats faux positifs des 3 patients qui se sont démarqués grâce à la dPCR.

Le patient 9 présentait une VAF de 0.05 % en qPCR représentant 9 copies *JAK2* V617F. C'est un homme de 57 ans diagnostiqué TE qui présente en plus de cette charge mutationnelle faible V617F, une mutation de type 1 de *CALR* c'est-à-dire une délétion de 52pb (p.L367fs*46). Cette mutation est retrouvée dans 53 % des thrombocytémies essentielles *CALR* mutées (111).

Le patient 7 avait 4 copies *JAK2* V617F en qPCR qui représentaient une VAF à 0.02 %. C'est un homme jeune, de 31 ans qui a été vu en consultation à l'ICLN car il présente une polyglobulie avec une hémoglobine à 18.5 g/dl et un hématocrite à 53.5 % ainsi qu'une carence martiale. Au niveau clinque, ce patient se plaint d'asthénie et de douleurs abdominales. Il a été réalisé un dosage d'EPO qui a montré des valeurs normales. Les investigations se sont arrêtées ici du fait de l'absence de syndrome d'hyperviscosité et l'absence d'anomalies retrouvées sur les autres lignées.

Le patient 21 avait 3 copies *JAK2* V617F en qPCR et donc une VAF à 0.01 %. C'est une femme âgée de 85 ans hospitalisée en service de médecine interne pour un suivi de sclérodermie systémique. Une recherche de la mutation *JAK2* V617F avait été demandée pour l'exploration d'une thrombocytose isolée aux alentours de 500 G/L. Suite à ce résultat très faiblement positif, les mutations de *CALR* et *MPL* ont également été recherchées sans positivité retrouvée.

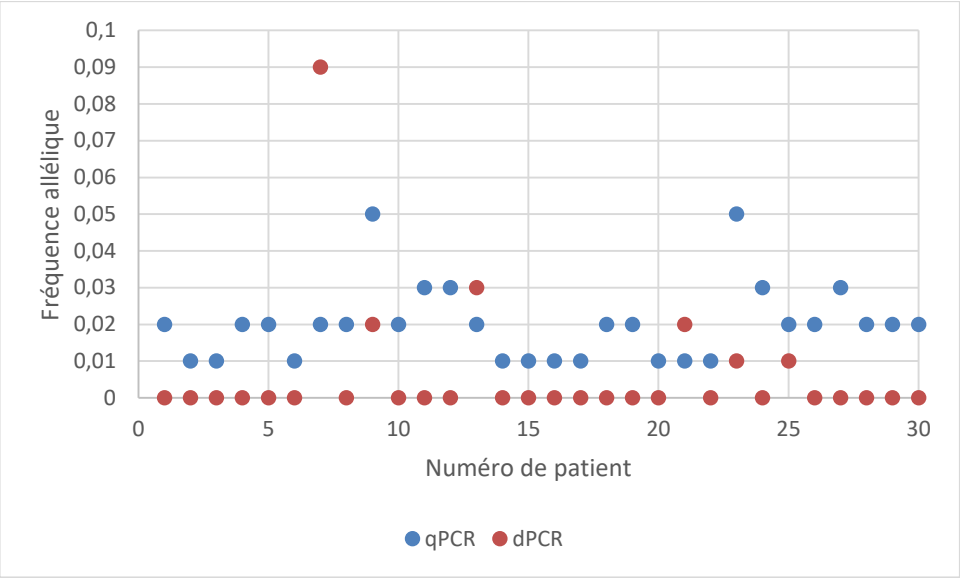


Figure 26 : Comparaison des résultats obtenus en dPCR et qPCR pour les patients avec 3 à 10 copies V617F en qPCR

4.5 Patients médecine thérapeutique

Comme nous l'avons démontré plus haut, la mutation *JAK2* est associée à un risque accru de développement de thromboses. La technique de PCR digitale étant plus sensible que la qPCR ; nous avons souhaité savoir si elle permettait de mettre en évidence des ratios alléliques très faibles chez des patients ayant présenté une thrombose et présentant un bilan de thrombophilie négatif pour lesquels le résultat de qPCR était négatif. Nous avons donc recherché des prélèvements qui avaient eu une demande de recherche de mutation *JAK2* V617F de la part du service de médecine thérapeutique et dont l'amplification en qPCR s'est avérée négative. Nous avons récupéré 26 échantillons sur une période de 20 mois, de décembre 2018 à juillet 2020 (Annexe 3).

Le but est de vérifier l'absence de mutations V617F dans ces échantillons de patients ayant présenté une thrombose et un bilan de thrombophilie négatif avec la PCR digitale.

Tous les échantillons ont été passés en duplicate, et aucun n'est ressorti positif (Résultats en annexe 2).

DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude a été de réaliser un dossier de validation de méthode afin de mettre en place une nouvelle technique de PCR digitale pour la détection de la mutation *JAK2* V617F afin de demander son accréditation au COFRAC. Pour cela, le COFRAC propose un document support, le SH FORM 43 que nous avons utilisé comme trame dans la rédaction de ce dossier de validation de méthode. Ce travail a été réalisé dans le secteur de biologie moléculaire du service d'hématologie du CHU de Saint Etienne.

La nouvelle technique de dPCR ne portant pas de marquage CE-IVD, ce changement de méthode nous oblige à passer d'un dossier de vérification de méthode portée A à une validation de méthode portée B qui requiert un plus grand nombre d'essais.

Avant de réaliser ces étapes, nous avons tenté d'optimiser la méthode. A la suite des tests effectués sur les quantités d'amorces et d'ADN optimums pour la PCR digitale *JAK2* V617F, nous avons décidé de travailler avec 1 µL d'amorces et 50 ng d'ADN. Néanmoins, ces tests ont été réalisés avant la recommandation du fournisseur d'avoir un volume réactionnel total de 22 µL par puits. Pour arriver à cette condition, nous avons augmenté de façon proportionnelle les volumes d'amorces, de mix et d'eau. Nous préparons donc chaque puits réactionnel avec 5 µL d'ADN à 10 ng/µL + 1.1 µL d'amorces + 11 µL de QXDx ddPCR Supermix + 4.9 µL d'eau. Pour faciliter le travail des techniciens, lors de la préparation du MIX, nous mélangerons les amorces, le ddPCR supermix et l'eau en fonction du nombre de puits. Il sera ensuite nécessaire de pipeter 17µL de cette préparation dans chaque puits, puis d'ajouter les 5µL d'ADN. Cela limite les pipetages de petits volumes et donc les erreurs.

Nous avons également décidé de réaliser nos tests avec une température d'hybridation de 54°C qui permet une bonne fluorescence et une parfaite séparation des différents nuages de points.

Concernant nos valeurs de répétabilité et de fidélité intermédiaire, les résultats obtenus avec la SET 50 % sont comparables à ceux obtenus avec l'ancienne méthode. Nous remarquons cependant qu'avec la SET 0.1 %, les valeurs de fold-change sont légèrement plus élevés avec notre nouvelle technique. En effet, nous avions un fold-change de fidélité intermédiaire à 2.22 en qPCR alors qu'avec la nouvelle technique nous le trouvons à 3.28. Pour pallier à cette variabilité un peu plus importante, nous poserons en duplicate la SET 0.1 % dans chacune de nos plaques de PCR. Nos résultats restent conformes aux exigences du laboratoire.
Il en est de même pour les résultats d'incertitude de mesure, notre fold-change obtenu avec la SET 0.1% étant plus élevé qu'avec l'ancienne technique mais restant conforme aux exigences de performances.

La méthode utilisant le kit Mutaquant avait tendance à surestimer la quantification de la mutation *JAK2* V617F. Nous étions en effet régulièrement au-dessus de la moyenne lors des campagnes d'EEQ, ce qui nous a d'ailleurs valu quelques résultats non conformes. Le passage à la nouvelle technique devrait pourvoir éviter ces résultats trop élevés comme nous avons pu le voir lors de la comparaison de méthode.
Concernant l'exactitude, si nous comparons les résultats obtenus avec notre ancienne technique, sur les 12 échantillons passés, la PCR digitale a obtenu 10 fois la note A et deux fois la note B alors que la PCR quantitative a reçu 7 fois la note A et 5 fois la note B. La figure 27 permet de nous rendre compte des différences de z-score entre les deux techniques ; la dPCR obtenant la plupart du temps des z-score compris entre 0 et -1 alors que les résultats de la qPCR sont régulièrement entre +1 et +2.

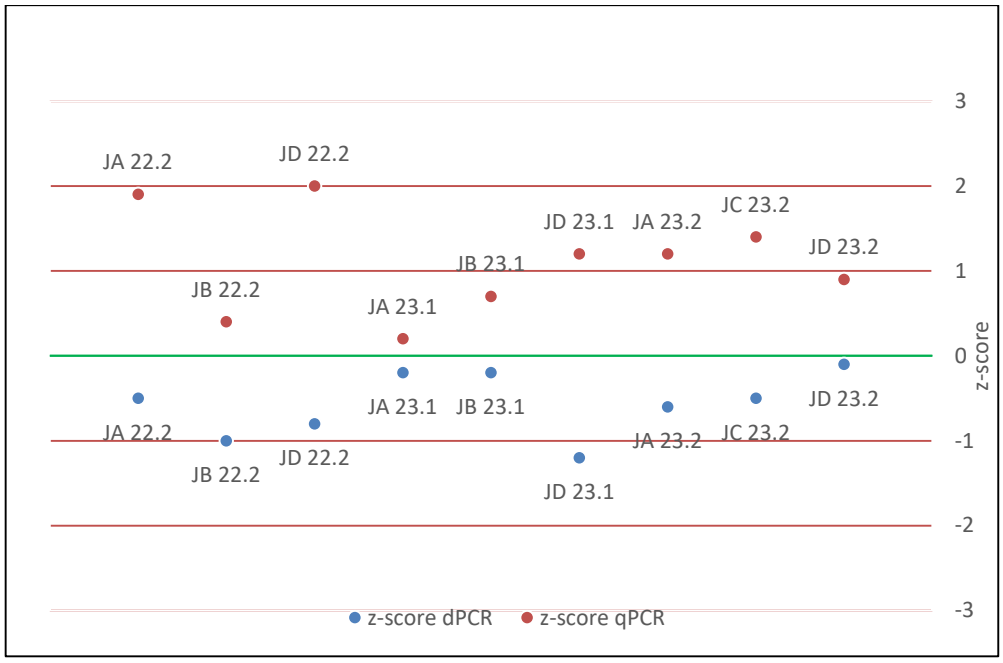


Figure 27 : Comparaison des résultats d'exactitude entre la dPCR et la qPCR sur les trois dernières campagnes d'EEQ

A propos de l'étendue de mesure, notre LOD pour la mutation *JAK2* V617F en dPCR est de 0.01%, résultat comparable à la valeur de LOD retrouvée dans plusieurs études (78,93,95,105). La LOD de l'ancienne technique étant à 0.1%, nous avons donc abaissé notre limite de détection d'un facteur 10.

Concernant la LLOQ, nous serions en mesure d'avoir un seuil de quantification à 0.05% ; néanmoins compte tenu de notre CQI à 0.1 % et des données de la littérature (78,92,93,95,105), nous avons fixé une LLOQ à 0.1 %. En effet, il n'y a pas de pertinence clinique à rendre un résultat positif en dessous de 0.1 %, le seuil de certitude clinique étant à 1 %. Entre 0.1 % et 1 % de ratio allélique, nous rendrons un résultat faible positif témoin d'une hématopoïèse clonale. Les résultats avec une charge mutationnelle entre 0.01 % et 0.1 % seront rendus douteux après analyse des nuages de points par un biologiste. En effet, suite aux nombreux tests effectués, nous sommes en mesure de discriminer les patients présentant un véritable ratio allélique très faible, et donc étant différent d'un patient négatif, de ceux ayant une amplification non spécifique (Figure 28). Afin d'éliminer de faux positifs, un échantillon de contrôle est demandé pour tout résultat entre 0.01 % et 1 %. En fonction de la clinique et de l'appréciation du biologiste, une recherche de

mutations rares par NGS pourra également être rajoutée pour les valeurs de ratio allélique entre 0.01 % et 1 %. Tout résultat inférieur à 0.01 % est considéré comme négatif (Tableau 14).

Nous recommandons également pour les patients présentant une faible charge mutationnelle *JAK2* V617F de faire la recherche des autres mutations drivers des NMP ainsi que des mutations de l'exon 12 de *JAK2*. Dans les cas de NMP triples négatifs, nous conseillons également de réaliser un NGS diagnostic à la recherche de mutations rares ou de faux négatifs sur les gènes déjà recherchés.

Tableau 14 : Synthèse des résultats rendus en fonction des ratios alléliques obtenus en dPCR

Ratio allélique	Résultat rendu
> 1 %	Positif
Entre 0.1 % et 1 %	Positif faible à contrôler
Entre 0.01 % et 0.1 %	Douteux à contrôler
< 0.01 %	Négatif

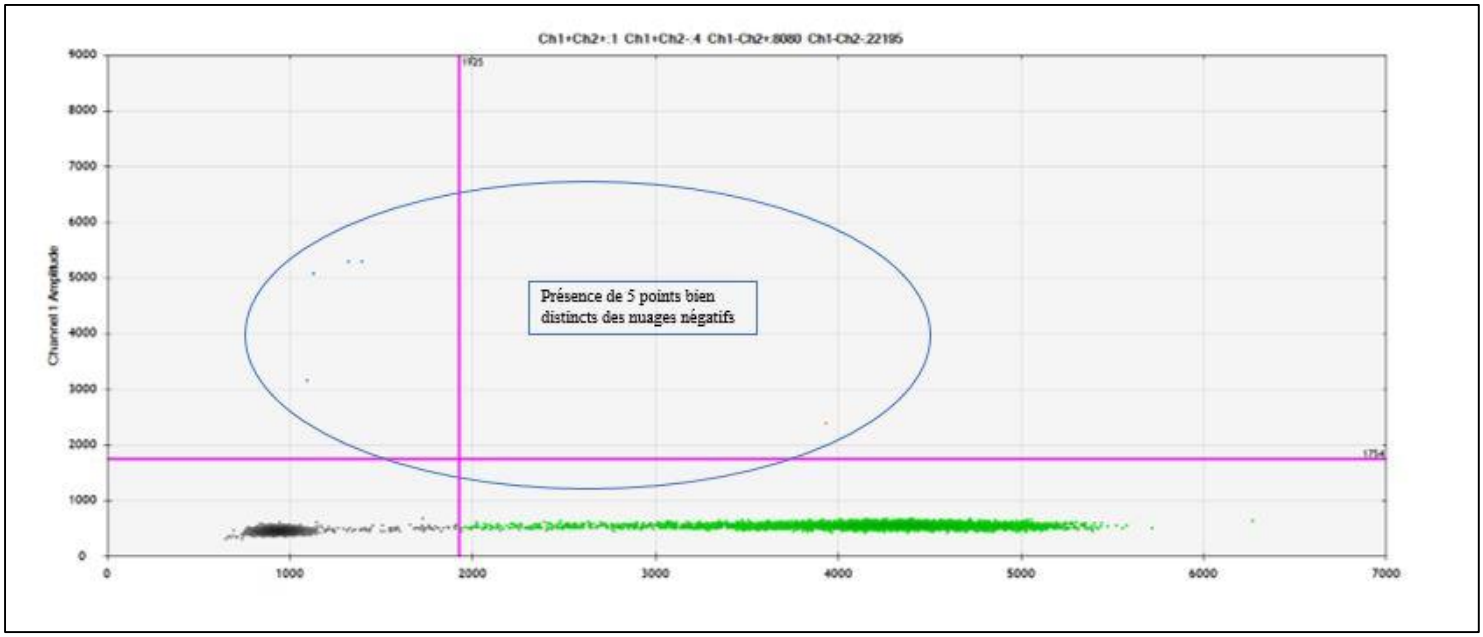


Figure 28 : Nuages de points d'un patient avec une faible charge allélique pour la mutation *JAK2* V617F en dPCR

Il peut exister des polymorphismes génétiques au niveau des zones d'hybridation des amorces qui sont susceptibles de donner des résultats faux négatifs. En effet, nous avons eu un patient présentant une mutation complexe 1848_1849delTGinsCT en position 616 et 617 du gène de *JAK2*. Cette mutation ne modifie pas l'acide aminé en position 616 car la cystéine peut être codé par les codons TGT et TGC par contre elle aboutit à la mutation V617F. Ce patient a montré des résultats discordants entre les PCR quantitatives et digitale qui trouvaient un ratio allélique à 0.3 % et 0.1 % respectivement et le NGS qui retrouvait une VAF à 8%. Les techniques de PCR sous-estiment donc largement la charge mutationnelle pour ce patient surement à cause d'une mauvaise hybridation des amorces liée à la mutation en position 1848. Nous nous sommes intéressés aux mutations décrites et proches de la position 617 du gène de *JAK2* sur le logiciel Alamut mais comme nous pouvons le voir sur la figure 29, la mutation du codon 616 de notre patient n'est pas connue. Il est possible que les 8 mutations visibles sur la figure 29 puissent interférer dans l'hybridation des amorces toutefois ces mutations sont rares.

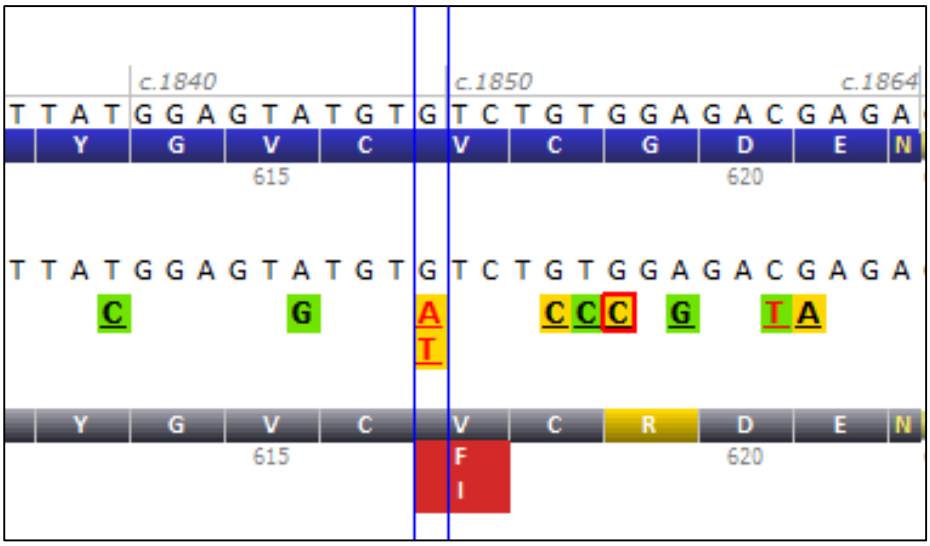


Figure 29 : Mutations décrites de part et d'autre de la position V617F du gène *JAK2* (mutations vertes : ne modifient pas la séquence d'acides aminés, mutations oranges : mutations faux-sens)

Les résultats de sensibilité et de spécificité sont très satisfaisants : ils sont en effet très proches de 1. Néanmoins, au vu de la variabilité observée avec la lignée SET 0.1 %, nous avons décidé de passer en duplicate la totalité des échantillons qui auront une recherche de mutation *JAK2* V617F en dPCR.

Concernant les résultats négatifs des patients de médecine thérapeutique ayant présenté un épisode de thrombose avec un bilan de thrombophilie négatif, ils sont concordants avec une étude récente qui a testé 340 échantillons de patients ayant thrombosé mais ne présentant aucun signe clinique ou biologique de NMP. Après analyse, seulement 2.65 % des patients étaient mutés *JAK2* V617F et 1.1% présentaient un ratio allélique supérieur à 2 % (112).

On peut donc dire que les évènements thrombotiques associés à la mutation *JAK2* V617F ne se produisent que rarement chez les patients ne présentant pas de signes de NMP.

Le patient 9 présentait quant à lui deux mutations « drivers », une du gène *CALR* responsable de sa TE et une *JAK2* V617F avec un ratio allélique de 0.022 % mettant en évidence une hématopoïèse clonale. Une étude récente a mis en évidence que la présence de co-mutations chez les patients avec une NMP est associée avec l'existence de deux clones distincts (113). Il n'a pas été décrit dans l'histoire médicale du patient 9 d'évènements thrombotiques mais il serait intéressant d'étudier le risque de thromboses chez ces patients doublement mutés.

Sur les trente patients testés en dPCR, nous avons mis en évidence la présence de réelle hématopoïèse clonale chez trois d'entre eux. Il n'y avait, dans leur historique médical, aucun évènement thrombotique. Nous n'avons dans ce travail qu'un faible effectif mais il est cohérent avec une étude récente qui a mis en évidence que le risque thrombotique chez les patients présentant une VAF entre 2 % et 10 % était le même que chez les patients avec une VAF inférieure à 2 % (114).

Pour apporter une justification supplémentaire au changement de technique, nous avons réalisé une étude médico-économique, le prix par patient pour la qPCR est de 46.37 € (Master Mix + Kit Qiagen) si réalisation par plaques entières. En comparaison, le prix par patient pour la ddPCR est de 10.52 € (Amorces + Mix) si

réalisation avec 13 patients par plaque. Notre nouvelle technique est donc plus de 4 fois moins onéreuse que l'ancienne.
Comme nous avons pu le voir, la dPCR nécessite davantage de consommables que la qPCR pour fonctionner. On a en effet besoin d'huile pour la formation des gouttelettes, de cônes spécifiques à l'AutoDG, de cartouches DG32, de deux plaques 96 puits par technique et de films pour sceller les plaques. Même en prenant en compte le coût supplémentaire de tous ces consommables, la dPCR reste très abordable par rapport à la qPCR.

Une des limites de cette étude est le fait d'avoir reconstitué à chaque technique les CQI SET 50 % et SET 0.1 % : nous avons donc une variabilité supplémentaire intrinsèque à la préparation de l'échantillon. Nous allons nous affranchir de cette variabilité en préparant à l'avance deux solutions de SET 50 % et SET 0.1 % que nous allons ensuite aliquoter et congeler. Un aliquot de chaque contrôle sera décongelé au moment de la réalisation de chaque technique. Ceci nous permettra également de ne pas avoir plusieurs cycles de congélation/décongélation qui peuvent être à l'origine d'une dégradation des lignées cellulaires.

Un autre point à mettre en avant est le fait que les quantités pipetées sont minimes, impliquant un risque élevé d'erreur au moment de la préparation de la plaque de PCR. Le passage en duplicate des patients nous permettra de limiter un maximum les risques d'erreur liés au pipetage.

CONCLUSIONS

THÈSE SOUTENUE PAR Mme DUPRAT Manon

TITRE :

Mise en place de la détection de la mutation JAK2 V617F en PCR digitale

CONCLUSION :

La mutation *JAK2* V617F est un élément clé dans le diagnostic des néoplasies myéloprolifératives Philadelphie négatives depuis la révision de la classification des NMP selon l'OMS en 2016. La présence de cette mutation est en effet un critère majeur pour le diagnostic de la polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive. Ces pathologies sont plutôt rares avec environ 1500 nouveaux cas par an en France. Néanmoins, la détection et la quantification de la mutation *JAK2* V617F sont assez fréquentes avec plus de 30 prescriptions par mois au CHU de Saint Etienne.

Jusqu'à présent, au CHU de Saint Etienne, la détection de la mutation *JAK2* V617F se faisait par PCR quantitative en temps réel avec utilisation de sondes Taqman mais le laboratoire de biologie moléculaire a acquis depuis peu un nouvel automate de PCR digitale sur lequel il est déjà réalisé la quantification du transcrit de fusion *BCR-ABL1*.

L'objectif premier de cette étude était de mettre en place la détection de la mutation *JAK2* V617F en PCR digitale en réalisant un dossier de validation de méthode afin de pourvoir accréditer cette nouvelle technique. Il était ensuite nécessaire de rédiger tous les documents nécessaires à la réalisation en routine comme le mode opératoire, la feuille de paillasse ainsi que la réalisation des dilutions de lignées qui serviront de contrôles internes.

Les performances analytiques de la PCR digitale sont connues pour être parmi les meilleures des techniques de PCR. En effet, cette PCR est une technique de quatrième génération basée sur le principe de la répartition de l'échantillon dans un très grand nombre de compartiments de façon à n'avoir qu'une seule copie d'ADN par compartiment. Il est ensuite réalisé une amplification sur chaque copie d'ADN.
Nous avons réalisé des tests pour optimiser notre technique pour laquelle nous utilisons donc 50ng d'ADN et 1.1µL d'amorces par puit pour obtenir des résultats optimums.

Les tests analytiques nous ont permis d'obtenir des résultats très satisfaisants concernant la répétabilité, la fidélité intermédiaire, l'incertitude de mesure, la comparaison de méthode, la contamination inter-échantillons, la robustesse ainsi que la sensibilité et la spécificité. Les données d'exactitude et d'étendue de mesure nous ont montré que notre nouvelle technique avait des performances supérieures à la qPCR utilisée jusqu'à maintenant, nous avons en effet amélioré nos notes obtenues lors des campagnes d'EEQ et abaissé d'un facteur 10 notre seuil de détection qui est maintenant de 0.01%.

Des mesures de suivi des performances de la technique ont été mises en place avec le passage des lignées SET 50%, SET 0.1% et U937 qui servent de contrôles positifs et négatifs et qui permettront d'incrémenter les données pour le suivi de la fidélité intermédiaire. Grâce au plan de plaque établi, la contamination inter-échantillons sera testée lors de chaque technique et la variabilité inter-opérateurs sera également évaluée au fur et à mesure des tests en routine.

Sur les 30 patients qui présentaient des faibles signaux en qPCR (0.02% en moyenne), 83% se sont avérés négatifs et 17% avaient un faible ratio allélique confirmé en dPCR reflet probable d'une hématopoïèse clonale. En parallèle, nous avons quantifié la mutation *JAK2* V617F chez 26 patients du service de médecine thérapeutique, qui avaient présenté une thrombose, et n'avons retrouvé aucun patient avec une hématopoïèse clonale *JAK2* V617F en dPCR.

En plus d'être une technique très sensible, la recherche de la mutation *JAK2* V617F est quatre fois moins onéreuse que la qPCR. Elle a également comme avantages d'être rapide, elle peut en effet être réalisée en urgence pour obtenir un résultat en moins de quatre heures et enfin, ne nécessite plus l'utilisation de plasmides.

En conclusion, la nouvelle technique de PCR digitale va remplacer très prochainement la qPCR pour la quantification de la mutation *JAK2* V617F au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Saint Etienne et le dossier de validation de méthode sera présenté au COFRAC en vue d'une accréditation. Cette méthode permettra un gain en sensibilité tout en étant moins couteuse et moins chronophage.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 29/03/2021

LE DOYEN

Michel SEVE

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

LE DIRECTEUR DE THESE :

Docteur Pascale FLANDRIN-GRESTA
LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE
Hôpital NORD
C.H.U de SAINT-ETIENNE

LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :

Pr MOSSUZ Pascal
Institut de Biologie et Pathologie
CHU Grenoble-Alpes

BIBLIOGRAPHIE

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 mai 2016;127(20):2391-405.

2. Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. Cell Mol Life Sci. déc 2006;63(24):2939-53.

3. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J Natl Cancer Inst. juill 1960;25:85-109.

4. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. Leukemia. janv 2008;22(1):3-13.

5. Vainchenker W, Casadevall N. « JAK ;» a dit: c'est un syndrome myéloprolifératif. Hématologie. 1 janv 2006;12(1):3-7.

6. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. juill 2006;3(7):e270.

7. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. N Engl J Med. 1 févr 2007;356(5):459-68.

8. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. N Engl J Med. 19 déc 2013;369(25):2391-405.

9. Maynadié M, Girodon F, Manivet-Janoray I, Mounier M, Mugneret F, Bailly F, et al. Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Cote d'Or (Burgundy, France). Haematologica. janv 2011;96(1):55-61.

10. Maynadié M. Épidémiologie des syndromes myéloprolifératifs chroniques. Revue Francophone des Laboratoires. 1 mai 2017;2017(492):29-32.

11. Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadié M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X, et al. Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. Rev Epidemiol Sante Publique. avr 2016;64(2):103-12.

12. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. Eur J Haematol. avr 2014;92(4):289-97.

13. Lasho TL, Finke CM, Tischer A, Pardanani A, Tefferi A. Mayo CALR mutation type classification guide using alpha helix propensity. Am J Hematol. mai 2018;93(5):E128-9.

14. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. déc 2020;95(12):1599-613.

15. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. janv 2019;94(1):133-43.

16. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Blood. 9 févr 2017;129(6):667-79.

17. Chauveau A, Ianotto J-C, Ugo V, Lippert E. Calreticulin mutations in myeloproliferative syndrome: the missing link? Hématologie. janv 2014;20(1):15-9.

18. Xu N, Ding L, Yin C, Zhou X, Li L, Li Y, et al. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. Ann Hematol. mai 2015;94(5):865-7.

19. McGaffin G, Harper K, Stirling D, McLintock L. JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort. Br J Haematol. oct 2014;167(2):276-8.

20. Mansier O, Luque Paz D, Ianotto J-C, Le Bris Y, Chauveau A, Boyer F, et al. Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. American Journal of Hematology. 2018;93(4):E84-6.

21. Usseglio F, Beaufils N, Calleja A, Raynaud S, Gabert J. Detection of CALR and MPL Mutations in Low Allelic Burden JAK2 V617F Essential Thrombocythemia. J Mol Diagn. janv 2017;19(1):92-8.

22. Mansier O, Migeon M, Etienne G, Bidet A, Lippert E. JAK2V617F and CALR double mutations are more frequently encountered in patients with low JAK2V617F allelic burdens. Leuk Lymphoma. août 2016;57(8):1949-51.

23. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. Leukemia. mai 2018;32(5):1057-69.

24. Hussaini MO, Mirza A-S, Komrokji R, Lancet J, Padron E, Song J. Genetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia Interrogated by Next-generation Sequencing: A Large Cancer Center Experience. Cancer Genomics Proteomics. avr 2018;15(2):121-6.

25. Jia R, Kralovics R. Progress in elucidation of molecular pathophysiology of myeloproliferative neoplasms and its application to therapeutic decisions. Int J Hematol. févr 2020;111(2):182-91.

26. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. The Lancet. 19 mars 2005;365(9464):1054-61.

27. Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. Cells. 8 août 2019;8(8).

28. Park SO, Wamsley HL, Bae K, Hu Z, Li X, Choe S, et al. Conditional deletion of Jak2 reveals an essential role in hematopoiesis throughout mouse ontogeny: implications for Jak2 inhibition in humans. PLoS One. 2013;8(3):e59675.

29. Dupont S, Massé A, James C, Teyssandier I, Lécluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. Blood. 1 août 2007;110(3):1013-21.

30. Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. Blood. 12 avr 2012;119(15):3539-49.

31. Vannucchi AM, Guglielmelli P. JAK2 mutation-related disease and thrombosis. Semin Thromb Hemost. juill 2013;39(5):496-506.

32. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJP, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. Blood. 15 nov 2005;106(10):3377-9.

33. Martinaud C, Brisou P, Mozziconacci M-J. Is the JAK2(V617F) mutation detectable in healthy volunteers? Am J Hematol. avr 2010;85(4):287-8.

34. Hinds DA, Barnholt KE, Mesa RA, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, et al. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. Blood. 25 août 2016;128(8):1121-8.

35. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. Leukemia. juill 2008;22(7):1299-307.

36. Guérin E, Praloran V, Lippert E. Les mutations de JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs en 2008. Hématologie. 1 oct 2008;14(5):368-77.

37. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval J-L. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood. 1 sept 2006;108(5):1652-60.

38. Alshemmari SH, Rajaan R, Ameen R, Al-Drees MA, Almosailleakh MR. JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. Ann Hematol. mai 2014;93(5):791-6.

39. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. Blood. 1 août 2007;110(3):840-6.

40. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. N Engl J Med. 28 avr 2005;352(17):1779-90.

41. Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. Ther Adv Hematol. févr 2011;2(1):21-32.

42. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood. 15 avr 2008;111(8):3931-40.

43. Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, Gil L, Lewandowska M, Lehmann-Kopydłowska A, et al. The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Thromb Res. févr 2015;135(2):272-80.

44. Koren-Michowitz M, Landman J, Cohen Y, Rahimi-Levene N, Salomon O, Michael M, et al. JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis. Leukemia & Lymphoma. nov 2012;53(11):2210-3.

45. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, et al. Low JAK2 V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. Leukemia. avr 2008;22(4):756-61.

46. Palumbo GA, Stella S, Pennisi MS, Pirosa C, Fermo E, Fabris S, et al. The role of new technologies in myeloproliferative neoplasms. Frontiers in Oncology. 2019;9(APR).

47. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. Cancer. 1 févr 2006;106(3):631-5.

48. Barosi G, Klersy C, Villani L, Bonetti E, Catarsi P, Poletto V, et al. JAK2(V617F) allele burden ⩾50% is associated with response to ruxolitinib in persons with MPN-associated myelofibrosis and splenomegaly requiring therapy. Leukemia. août 2016;30(8):1772-5.

49. Jones AV, Silver RT, Waghorn K, Curtis C, Kreil S, Zoi K, et al. Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. Blood. 15 avr 2006;107(8):3339-41.

50. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 30 juill 2009;114(5):937-51.

51. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. Haematologica. oct 2004;89(10):1194-8.

52. Zhang Y, Zhou Y, Wang Y, Teng G, Li D, Wang Y, et al. Thrombosis among 1537 patients with JAK2V617F-mutated myeloproliferative neoplasms: Risk factors and development of a predictive model. Cancer Med. 28 janv 2020;9(6):2096-105.

53. Iurlo A, Cattaneo D, Bucelli C, Baldini L. New Perspectives on Polycythemia Vera: From Diagnosis to Therapy. Int J Mol Sci. 13 août 2020;21(16).

54. Hultcrantz M, Björkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf ÅR, Kristinsson SY, et al. Risk for Arterial and Venous Thrombosis in Patients With Myeloproliferative Neoplasms: A Population-Based Cohort Study. Ann Intern Med. 6 mars 2018;168(5):317-25.

55. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012;2012:571-81.

56. Kiladjian J-J, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. Blood. 15 mai 2008;111(10):4922-9.

57. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. N Engl J Med. 3 janv 2013;368(1):22-33.

58. Marchetti M, Falanga A. Leukocytosis, JAK2V617F mutation, and hemostasis in myeloproliferative disorders. Pathophysiol Haemost Thromb. 2008;36(3-4):148-59.

59. Spivak JL. Polycythemia vera, the hematocrit, and blood-volume physiology. N Engl J Med. 3 janv 2013;368(1):76-8.

60. Hobbs CM, Manning H, Bennett C, Vasquez L, Severin S, Brain L, et al. JAK2V617F leads to intrinsic changes in platelet formation and reactivity in a knock-in mouse model of essential thrombocythemia. Blood. 28 nov 2013;122(23):3787-97.

61. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, Russo L, Diani E, Finazzi G, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Am J Hematol. avr 2011;86(4):337-42.

62. Panova-Noeva M, Marchetti M, Buoro S, Russo L, Leuzzi A, Finazzi G, et al. JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinants of immature platelet parameters in essential thrombocythemia and polycythemia vera patients. Blood. 1 sept 2011;118(9):2599-601.

63. Guy A, Poisson J, James C. Pathogenesis of cardiovascular events in BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 3 mars 2021;

64. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. Leukemia. mai 2008;22(5):905-14.

65. Haider M, Gangat N, Lasho T, Abou Hussein AK, Elala YC, Hanson C, et al. Validation of the revised International Prognostic Score of Thrombosis for Essential Thrombocythemia (IPSET-thrombosis) in 585 Mayo Clinic patients. Am J Hematol. juin 2016;91(4):390-4.

66. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 1 févr 2018;36(4):310-8.

67. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. déc 2018;93(12):1551-60.

68. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Coltro G, Finke CM, Loscocco GG, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. Br J Haematol. avr 2020;189(2):291-302.

69. Tefferi A, Betti S, Barraco D, Mudireddy M, Shah S, Hanson CA, et al. Gender and survival in essential thrombocythemia: A two-center study of 1,494 patients. Am J Hematol. nov 2017;92(11):1193-7.

70. Yogarajah M, Tefferi A. Leukemic Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: A Literature Review on Risk, Characteristics, and Outcome. Mayo Clin Proc. juill 2017;92(7):1118-28.

71. Kiladjian J-J, Giraudier S, Cassinat B. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. Leukemia. avr 2016;30(4):776-81.

72. Kiladjian J-J, Massé A, Cassinat B, Mokrani H, Teyssandier I, le Couédic J-P, et al. Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon α-2a treatment targets JAK2 V617F clones without affecting TET2 mutant cells. Leukemia. août 2010;24(8):1519-23.

73. Quintás-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshouri T, Kilpivaara O, Cortes J, Roupie A-L, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α-2a. Blood. 8 août 2013;122(6):893-901.

74. Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, Heidel FH, Purdon A, Vu T, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-α in a murine model of polycythemia vera. Blood. 2 mai 2013;121(18):3692-702.

75. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. N Engl J Med. 7 juill 2005;353(1):33-45.

76. Sirhan S, Lasho TL, Hanson CA, Mesa RA, Pardanani A, Tefferi A. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. Am J Hematol. mai 2008;83(5):363-5.

77. Verstovsek S, Gotlib J, Mesa RA, Vannucchi AM, Kiladjian J-J, Cervantes F, et al. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. J Hematol Oncol. 29 sept 2017;10(1):156.

78. Lee E, Lee KJ, Park H, Chung JY, Lee M-N, Chang MH, et al. Clinical Implications of Quantitative JAK2 V617F Analysis using Droplet Digital PCR in Myeloproliferative Neoplasms. Ann Lab Med. mars 2018;38(2):147-54.

79. Denis JA, Nectoux J, Lamy P-J, Rouillac Le Sciellour C, Guermouche H, Alary A-S, et al. Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. Ann Biol Clin (Paris). 1 oct 2018;76(5):505-23.

80. Merker JD, Jones CD, Oh ST, Schrijver I, Gotlib J, Zehnder JL. Design and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Quantification of JAK2 V617F and

Wild-Type JAK2 Transcript Levels in the Clinical Laboratory. J Mol Diagn. janv 2010;12(1):58-64.

81. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. juin 2006;27(2-3):95-125.

82. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. Proc Natl Acad Sci U S A. 3 août 1999;96(16):9236-41.

83. Morley AA. Digital PCR: A brief history. Biomol Detect Quantif. 15 août 2014;1(1):1-2.

84. Sykes P, Neoh SH, Brisco M, Hughes E, Condon J, Morley A. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. BioTechniques. 1 oct 1992;13:444-9.

85. Baker M. Digital PCR hits its stride. Nature Methods. juin 2012;9(6):541-4.

86. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. Biomol Detect Quantif. sept 2014;1(1):8-22.

87. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Zárate R, Lozano MD, Zubiri L, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. Clin Chem. janv 2015;61(1):297-304.

88. Otsuji K, Sasaki T, Tanaka A, Kunita A, Ikemura M, Matsusaka K, et al. Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. févr 2017;162(1):11-8.

89. Zhang Y, Xu Y, Zhong W, Zhao J, Chen M, Zhang L, et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR. Oncotarget. 24 janv 2017;8(4):5861-73.

90. Caen O, Nizard P, Garrigou S, Perez-Toralla K, Zonta E, Laurent-Puig P, et al. PCR digitale en micro-compartiments - II. Apport pour la détection quantitative d'ADN tumoral circulant. Med Sci (Paris). 1 févr 2015;31(2):180-6.

91. Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo J-F, Garlan F, Nizard P, Laurent-Puig P, et al. PCR digitale en micro-compartiments - I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares. Med Sci (Paris). 1 janv 2015;31(1):84-92.

92. Kinz E, Leiherer A, Lang AH, Drexel H, Muendlein A. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR. International Journal of Laboratory Hematology. 2015;37(2):217-24.

93. Waterhouse M, Follo M, Pfeifer D, von Bubnoff N, Duyster J, Bertz H, et al. Sensitive and accurate quantification of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms by droplet digital PCR. Ann Hematol. 1 avr 2016;95(5):739-44.

94. Lange T, Edelmann A, Siebolts U, Krahl R, Nehring C, Jäkel N, et al. JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse. Haematologica. mai 2013;98(5):722-8.

95. Link-Lenczowska D, Pallisgaard N, Cordua S, Zawada M, Czekalska S, Krochmalczyk D, et al. A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. Ann Hematol. déc 2018;97(12):2299-308.

96. Organisation internationale de normalisation ISO [En ligne]. [Cité le 13 jan 2021]. Disponible sur: https://www.iso.org/fr/about-us.html

97. COFRAC. SH-FORM-05 : Demande d'accréditation - Section Santé Humaine. 2018.

98. COFRAC. SH-FORM-03 : Prise en compte des exigences pour l'accréditation suivant les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870. 2018.

99. COFRAC. SH-REF-05 : Règlement d'accréditation. 2020.

100. Association française de normalisation. Norme internationale ISO 15189 : 2012. Plaine Saint-Denis, France : AFNOR ; 2012. 56p.

101. COFRAC. SH-REF-02 : Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870. 2019.

102. COFRAC. SH-REF-08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation. 2019.

103. COFRAC. SH-GTA-04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. 2015.

104. COFRAC. SH-FORM-43 : Fiche type - Vérification (Portée A) / Validation (Portée B) d'une méthode de biologie médicale. 2015.

105. La Rocca F, Grieco V, Ruggieri V, Zifarone E, Villani O, Zoppoli P, et al. Superiority of Droplet Digital PCR Over Real-Time Quantitative PCR for JAK2 V617F Allele Mutational Burden Assessment in Myeloproliferative Neoplasms: A Retrospective Study. Diagnostics (Basel) [En ligne]. 5 mars 2020 [cité 2 juin 2020]; Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151190/

106. P F-G, P C, S H, N G, S T, C M, et al. Recommendations for accreditation of laboratories in molecular biology of hematologic malignancies. Ann Biol Clin (Paris). 1 sept 2015;73(5):595-630.

107. COFRAC. SH-GTA-14 : Guide d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. 2011.

108. Branford S, Cross NCP, Hochhaus A, Radich J, Saglio G, Kaeda J, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia. nov 2006;20(11):1925-30.

109. Lippert E, Mansier O, Migeon M, Denys B, Nilsson A, Rosmond C, et al. Clinical and biological characterization of patients with low (0.1–2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. Haematologica. juill 2014;99(7):e098-e101.

110. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. British Journal of Haematology. 2013;160(1):25-34.

111. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. Leukemia. janv 2015;29(1):249-52.

112. Levraut M, Legros L, Drappier C, Béné MC, Queyrel V, Raynaud S, et al. Low prevalence of JAK2 V617F mutation in patients with thrombosis and normal blood counts: a retrospective impact study. J Thromb Thrombolysis. nov 2020;50(4):995-1003.

113. Thompson ER, Nguyen T, Kankanige Y, Yeh P, Ingbritsen M, McBean M, et al. Clonal independence of *JAK2* and *CALR* or *MPL* mutations in comutated myeloproliferative neoplasms demonstrated by single cell DNA sequencing. haematol. 13 août 2020;106(1):313-5.

114. Limvorapitak W, Parker J, Hughesman C, McNeil K, Foltz L, Karsan A. No Differences in Outcomes Between JAK2 V617F–Positive Patients with Variant Allele Fraction < 2% Versus 2-10%: A 6-Year Province-wide Retrospective Analysis. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. 1 sept 2020;20(9):e569-78.

ANNEXES

Annexe 1 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus en PCR digitale pour patients avec un faible nombre de copies en PCR quantitative

	1		2		3		4		5		6		7		8	
A	SET 50 %	37,5	Patient 3	0	**Patient 7**	**0,08**	Patient 11	0	Patient 15	0	Patient 19	0	Patient 23	0	Patient 27	0
B	SET 0,1 %	0,05	Patient 4	0	Patient 8	0	Patient 12	0	Patient 16	0	Patient 20	0	Patient 24	0	Patient 28	0
C	U937	0	Patient 4	0	Patient 8	0	Patient 12	0	Patient 16	0	Patient 20	0	Patient 24	0	Patient 28	0
D	Patient 1	0	Patient 5	0	**Patient 9**	**0,022**	Patient 13	0	Patient 17	0	**Patient 21**	**0,036**	Patient 25	0	Patient 29	0
E	Patient 1	0	Patient 5	0	**Patient 9**	**0,022**	**Patient 13**	**0,06**	Patient 17	0	**Patient 21**	**0,019**	Patient 25	0	Patient 29	0
F	Patient 2	0	Patient 6	0	Patient 10	0	Patient 14	0	Patient 18	0	Patient 22	0	Patient 26	0	Patient 30	0
G	Patient 2	0	Patient 6	0	Patient 10	0	Patient 14	0	Patient 18	0	Patient 22	0	Patient 26	0	Patient 30	0
H	Patient 3	0	**Patient 7**	**0.11**	Patient 11	0	Patient 15	0	Patient 19	0	**Patient 23**	**0.017**	Patient 27	0	U937	0

Annexe 2 : Plan de plaque et ratios alléliques obtenus en PCR digitale pour patients de médecine thérapeutique

	1		2		3		4		5		6		7	
A	SET 50 %	39,4	Patient 3	0	Patient 7	0	Patient 11	0	Patient 15	0	Patient 19	0	Patient 23	0
B	SET 0,1 %	0,018	Patient 4	0	Patient 8	0	Patient 12	0	Patient 16	0	Patient 20	0	Patient 24	0
C	U937	0	Patient 4	0	Patient 8	0	Patient 12	0	Patient 16	0	Patient 20	0	Patient 24	0
D	Patient 1	0	Patient 5	0	Patient 9	0	Patient 13	0	Patient 17	0	Patient 21	0	Patient 25	0
E	Patient 1	0	Patient 5	0	Patient 9	0	Patient 13	0	Patient 17	0	Patient 21	0	Patient 25	0
F	Patient 2	0	Patient 6	0	Patient 10	0	Patient 14	0	Patient 18	0	Patient 22	0	Patient 26	0
G	Patient 2	0	Patient 6	0	Patient 10	0	Patient 14	0	Patient 18	0	Patient 22	0	Patient 26	0
H	Patient 3	0	Patient 7	0	Patient 11	0	Patient 15	0	Patient 19	0	Patient 23	0	U937	0

Annexe 3 : Patients de médecine thérapeutique avec évènement thrombotique et bilan de thrombophilie négatif

Patient	Sexe	Age	Localisation Evènement thrombotique	Artérielle ou veineuse
1	Homme	38	Artère rénale gauche	artérielle
2	Homme	40	Thrombose splénique	artérielle
3	Homme	72	AVC ischémique	artérielle
4	Homme	37	Embolie pulmonaire	veineuse
5	Femme	43	Thrombose portale	veineuse
6	Homme	74	Thrombose portale	veineuse
7	Homme	55	Thrombose veineuse cérébrale	veineuse
8	Homme	31	SCA ST+	artérielle
9	Homme	75	thrombose artère et veine splénique	artérielle et veineuse
10	Homme	67	thrombose veine porte	veineuse
11	Homme	57	TVP membre inférieur	veineuse
12	Femme	52	TVP distale gauche *2	veineuse
13	Homme	59	AVC ischémique	artérielle
14	Homme	87	Embolie pulmonaire	veineuse
15	Femme	74	Thrombose veineuse mésentérique	veineuse
16	Homme	39	Thrombose splénique	artérielle
17	Femme	72	AVC ischémique	artérielle
18	Homme	46	AVC ischémique	artérielle
19	Homme	51	AVC ischémique	artérielle
20	Femme	78	Embolie pulmonaire	veineuse
21	Femme	56	AVC ischémique	artérielle
22	Homme	60	SCA ST+	artérielle
23	Homme	61	AVC ischémique	artérielle
24	Femme	22	Thrombose veineuse cérébrale	veineuse
25	Homme	57	Thromboses artérielle récidivantes	artérielle
26	Homme	21	infarctus rénal	artérielle

Annexe 4 : Dossier de validation de méthode

Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera ***une fiche par examen de biologie médicale***

Rassemblement de l'extraction d'ADN et de la recherche et quantification de la mutation JAK2 V617F dans une validation de processus complexe. Modification de la technique de PCR.

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens LABO.QUAL.DE.001) : Recherche et quantification de la mutation V617F du gène JAK2
Processus simple ☐ ; Processus complexe ☒ (nombre de sous-processus : 4)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Extraction d'ADN à partir de sang total	Modalités de vérification/validation[1] : ☒ 1. Répétabilité ☒ 2. Fidélité intermédiaire ☐ 3. Variabilité inter-opérateurs ☒ 4. Justesse ☐ 5. Exactitude ☒ 6. Sensibilité et spécificité analytique ☐ 7. Incertitudes ☒ 8. Etendue de mesure ☒ 9. Comparaison de méthodes ☒ 10. Interférences ☒ 11. Contamination ☐ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☐ 13. Intervalle de référence
Sous-processus 2	Extraction d'ADN à partir de culots secs	Modalités de vérification/validation[1] : ☒ 1. Répétabilité ☒ 2. Fidélité intermédiaire ☐ 3. Variabilité inter-opérateurs ☒ 4. Justesse ☐ 5. Exactitude ☒ 6. Sensibilité et spécificité analytique

[1] *Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.*
Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.
L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

		☐ 7. Incertitudes ☒ 8. Etendue de mesure ☒ 9. Comparaison de méthodes ☒ 10. Interférences ☒ 11. Contamination ☐ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☐ 13. Intervalle de référence
Sous-processus 3	Extraction d'ADN à partir de culot cytogénétique	Modalités de vérification/validation : ☐ 1. Répétabilité ☐ 2. Fidélité intermédiaire ☒ 3. Variabilité inter-opérateurs ☐ 4. Justesse ☐ 5. Exactitude ☒ 6. Sensibilité et spécificité analytique ☐ 7. Incertitudes ☐ 8. Etendue de mesure ☐ 9. Comparaison de méthodes ☐ 10. Interférences ☐ 11. Contamination ☐ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☐ 13. Intervalle de référence
Sous-processus 4	Recherche et quantification de la mutation JAK2 V617F par PCR digitale	Modalités de vérification/validation : ☒ 1. Répétabilité ☒ 2. Fidélité intermédiaire ☒ 3. Variabilité inter-opérateurs ☐ 4. Justesse ☒ 5. Exactitude ☒ 6. Sensibilité et spécificité analytique ☒ 7. Incertitudes ☒ 8. Etendue de mesure ☒ 9. Comparaison de méthodes ☒ 10. Interférences ☒ 11. Contamination ☒ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☒ 13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maitriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

Les données de répétabilité et reproductibilité sont obtenues sur un nombre restreint d'échantillons, au vue du coût des techniques, de la difficulté d'obtention des échantillons tests ou de la difficulté technique, conformément aux recommandations du groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes (*Flandrin et al, ABC, 2015*)

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité** [2]	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Matière (échantillons)	Identification des prélèvements	3	Formation et habilitation du personnel du centre de prélèvement Formation du personnel soignant (préleveurs) par la cellule d'identitovigilance du CHU	I.IDV.prv01 « Bonnes pratiques d'identification des prélèvements en vue d'une analyse biologique » En mode manuel, vérification visuelle de l'identité patient Manuel de prélèvement (contenant les instructions de prélèvement) et Catalogue des examens de laboratoire
	Préparation du patient	1		
	Type de contenants	3		

[2] **Echelle de criticité du laboratoire fixée de 1 à 3 pour le SH FORM 43, avec :**

- **1 = Risque mineur** : aucune incidence sur le résultat patient et sa prise en charge médicale.
- **2 = Risque modéré** : incidence modérée sur le résultat patient mais aucune pour sa prise en charge médicale.
- **3 = Risque majeur** : incidence majeure sur le résultat patient et sur sa prise en charge médicale.

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Identification des prélèvements après saisie dans les SGL	3	Information des préleveurs Formation et habilitation du personnel en charge de la saisie et de l'étiquetage des prélèvements	disponible sur intranet et internet LABO.QUAL.PG.010 « Prestation de conseil en biologie médicale » LABO.PILOT.DE.008 « Contrat d'engagement clino-biologique entre le laboratoire et les pôles cliniques du CHU » LABO.PILOT.DE.003 « Contrat d'engagement entre le Laboratoire de Biologie Pathologie, le CRB et les Directions fonctionnelles du CHU de St Etienne » Formation, habilitation et évaluation des compétences du personnel enregistrées et suivi dans kalilab.

MAITRISE DES RISQUES **<u>Remarque</u> : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Nature et Volume de l'échantillon	3	Conformité à réception des échantillons	Nature et volume d'échantillon décrit dans le catalogue des analyses disponible dans intranet et internet. Contrôle à réception des échantillons par le personnel en charge du pré-analytique LABO.PRE.IT.002 « Critères d'acceptation et de refus des prescriptions et échantillons à réception et traitement des non conformités pré-analytiques » Transmission trimestrielle du récapitulatif des non conformités pré analytique aux principaux clients

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Délai et température avant traitement analytique	3	Gestion logistique (Pneumatique, navettes, enceintes de transport)	Mise en place de procédures et d'instructions de travail permettant d'assurer la maitrise du transport des échantillons disponibles dans le manuel de prélèvement (intranet et internet) Délai d'acheminement disponible dans le catalogue des analyses (intranet et internet) LABO.PRE.PG.002 « Transport des prélèvements biologiques acheminés au pavillon de biologie (I.BIO.prl17) » LABO.PRE.IT.011 « Transport des échantillons biologiques par le pneumatique et exceptions (I.BIO.prl07) »
	Prétraitement : extraction d'ADN Interférences	1	Conditions d'extraction d'ADN Qualité du prélèvement : Absence d'interférences	HEMAT.AH.MO.046 « Extraction d'ADN à partir de sang total sur Maxwell RSC » Catalogue des analyses du CHU de Saint Etienne

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Milieu	Conditions de conservation des échantillons : - Avant analyse : +4°C - Après analyse : -20°C	2	Métrologie suivi des enceintes	HEMAT.POST.IT.011 « Conservation des prélèvements en pré et post analytique en biologie moléculaire d'hématologie » Contrôle des températures des enceintes : Surveillance métrologique par système Evisense Labguard et cartographie des enceintes en interne LABO.MAT.DE.005 « Traçabilité métrologique des mesures du laboratoire selon SH FORM 38 rev 03 » LABO.MAT.DE.003 « Check list d'installation d'un équipement et de sa qualification avant sa mise en service » MÉTRO.MAT.IT.001 « Cartographie des enceintes climatiques » MÉTRO.MAT.IT.002 « Etalonnage et ajustage des sondes de suivi de température des enceintes climatiques »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	2	Température ambiante : 15-25°C Surpression salle de mix Vérification annuelle par un test à la fumée Gestion des déchets Alimentation électrique Condition d'éclairage Organisation des locaux	Pièces climatisées, installation de sondes de suivi de T° ambiante (gestion informatisée : Evisense) Contrôle d'hygrométrie (hygromètres), de la pression + ou -. Conception du bâtiment : séparation des activités incompatibles, salles techniques protégées de la lumière (ex : salles de microscopie), labo sécurisé P3, salle dédiées pour les prélèvements, salle de stockage) HEMAT.HY-SE.IT.001 « Réglement Intérieur Biologie Moléculaire » Classeur institutionnel du tri des déchets LABO.HY-SE.IT.001 « Gestion des déchets : protocole de tri et d'élimination des déchets simplifié pour le laboratoire » LABO.HY-SE.PG.001 « Consignes générales de prévention des risques professionnels : sécurité, santé et hygiène »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
			Hygiène des locaux	Contrat d'entretien avec prestataire externe (marché UNIHA : société ELIOR) LABO.HY-SE.DX.001 « Contrat de prestation de ménage » LABO.HY-SE.IT.004 « Nettoyage des locaux critiques du laboratoire (circuits et zones à risque) Hors secteur L3 et service d'ACP » Evaluation fournisseur (prestataire en charge du nettoyage) par le suivi des contrôles de nettoyage réalisé par le technicien supérieur hospitalier (TSH) du CHU selon les modalités définies dans les documents suivants : LABO.PILOT.DE.003 « Contrat d'engagement entre le Laboratoire de Biologie Pathologie, le CRB et les Directions fonctionnelles du CHU de St Etienne »

MAITRISE DES RISQUES **<u>Remarque</u> : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau	1	Mesure de la résistivité / stérilité	Non concerné : utilisation d'eau stérile grade PCR
	Surveillance des dérives	2	Périodicité des maintenances	Les maintenances se font selon les recommandations du fournisseur et sont tracées dans kalilab pour les équipements en MAD ou dans le logiciel KARL pour les équipements CHU ou autre. Les maintenances préventives sont effectuées par les biomédicaux du CHU en cas d'équipement CHU. LABO.MAT.DE.002 « PLANNING des contrôles réglementaires et des maintenances préventives des équipements du laboratoire » LABO.MAT.PG.002 « Gestion des maintenances et contrôles réglementaires des équipements (hors informatique et micro-pipettes) »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
			Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, gestion des pannes …)	LABO.MAT.DE.005. « Traçabilité métrologique des mesures du laboratoire selon SH FORM 38 rev 03» MÉTRO.MAT.PG.001 « Gestion de la métrologie au laboratoire » HEMAT.MAT.DE.020 « Maintenance QX200 et AUTODG » HEMAT.MAT.IT.025 « Maintenance Maxwell » CIQ/EEQ : CIQ : 2 niveaux de CIQ (0,1% et 50%) dans chaque technique permettant de valider la série. Extraction ADN : 2 EEQ par an JAK2 : 2 EEQ par an HEMAT.AH.IT.012 « Gestion des CQI et CQE au secteur Biologie Moléculaire Hématologie » Gestion des pannes : - Pour équipement critique mise en place d'une procédure dégradée (Back-up) - - HEMAT.MAT.IT.028 « Conduite à tenir en cas de panne des équipements en hématologie » - 126 - Formation du personnel technique pour la gestion des pannes courantes par le fournisseur du matériel lors de

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Contamination	3	Respect des conditions opératoires du fournisseur Entretien du laboratoire selon un plan défini Respect de la marche en avant définie dans le règlement intérieur	Voir conclusion de la partie « contamination » de ce document disponible en page : Extraction ADN : 26, 33 Quantification JAK2 : 47 LABO.HY-SE.IT.004 « Nettoyage des locaux critiques du laboratoire (circuits et zones à risque) Hors secteur L3 et service d'ACP » HEMAT.HY-SE.IT.001 « Réglement Intérieur Biologie Moléculaire »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Informatique	3	Paramétrage, connexions	Vérification des flux des données entre SIL/automate/serveur de résultat clinique (Cristalnet, etc.) LABO.INF.PG.001 « Maîtrise des systèmes d'information» LABO.INF.IT.001 « Droits et niveaux d'accès des logiciels informatiques (hors automates) » POLE.SGL.PT.001 « Paramétrage des différents systèmes d'information du PBP » LABO.INF.IT.004 « Validations des logiciels et des connexions »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
			archivage des données, gestion des pannes, …	LABO.INF.PG.002 « PANNE INFORMATIQUE (gestion globale) » HEMAT.INF.IT.008.04 « PANNE INFORMATIQUE (coupure et redémarrage GLIMS) : Hématologie spécialisée » Archivage lors des maintenances hebdomadaires et/ou mensuelles LABO.DOC.PG.004 « Maîtrise des archives » HEMAT.MAT.IT.029 « Maintenance QX200 et AUTODG » Traçabilité des maintenances et/ou montées de version des logiciels dans kalilab En cas de panne des procédures dégradée sont mises en place LABO.INF.IT.008 : « PANNE INFORMATIQUE (coupure et redémarrage GLIMS) : conduite à tenir en Hématologie spécialisée)

MAITRISE DES RISQUES **<u>Remarque</u> : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Matériel (réactifs)	Conservation des réactifs : Amorces ; 4°C MIX : -20°C	3	- Avant utilisation : Métrologie des enceintes climatiques (cartographie et suivi des températures) - Pendant utilisation : T° ambiante, réactifs placés dans la glace	Contrôle des températures des enceintes : surveillance métrologique par système Evisense Labguard et cartographie des enceintes en interne Installation de sondes de suivi de T° ambiante (gestion informatisée par logiciel Evisense également) LABO.MAT.DE.005 « Traçabilité métrologique des mesures du laboratoire selon SH FORM 38 rev 03 » MÉTRO.MAT.IT.001 « Cartographie des enceintes climatiques » MÉTRO.MAT.IT.002 « Etalonnage et ajustage des sondes de suivi de température des enceintes climatiques » MÉTRO.MAT.IT.010 « Paramétrage dans le logiciel EVISENSE Labguard» LABO.MAT.IT.010 « Conduite à tenir en cas de panne d'équipement ayant une alarme GTC et/ou associée au logiciel Labguard Evisense»

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Conditions d'utilisation des réactifs : Limites d'utilisation (stabilité après reconstitution/préparation,)	3	Gestion de la stabilité des réactifs : par le technicien	Portée B : utilisation selon les recommandations que vous avez décrites dans votre procédure technique : HEMATO.MAT.IT.029 : « Recherche de la mutation JAK2 V617F par PCR digitale)
	Gestion des stocks	2	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Gestion de stock informatisée dans kalilab STOCK.ACH.IT.002: «Contrôle à réception des réactifs et consommables par le stockage central du Plateau de Biologie » LABO.ACH.IT.004 « KALILAB : Déstockage de produits et consommables» HEMAT.AH.IT.106 « Conditions d'utilisation et de conservation des réactifs en Biologie moléculaire »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	3	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Reconstitution des réactifs, étalons et/ou contrôles selon les recommandations fournisseur (fiche technique fournisseur) HEMAT.AH.IT.106 « Conditions d'utilisation et de conservation des réactifs en Biologie moléculaire »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
			Métrologie des pipettes	Métrologie des pipettes réalisée en interne (sous-traitance exceptionnelle) MÉTRO.MAT.PG.001 « Gestion de la métrologie au laboratoire » LABO.MAT.IT.002 « Présentation et utilisation de la balance Sartorius CPA225D de métrologie» LABO.MAT.IT.011 « Présentation et utilisation de la balance Sartorius CUBIS MPS6.6S de métrologie » LABO.MAT.IT.012 « Fiche technique métrologie : utilisation d'une micropipette » LABO.MAT.IT.013 « Conduite à tenir en cas d'équipement métrologique critique non conforme (après vérification, maintenance, panne et/ou réparation) » LABO.MAT.DE.004 « Formulaire de demande d'équipement métrologique »

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, …)	2	- Bibliographie - Documents fournisseur - Essai sur site	Maitrise de la documentation externe : LABO.DOC.PG.001 « Maîtrise des documents du Laboratoire » Voir la partie « Evaluation des performances de la méthode » de ce document disponible à partir de la page 19

MAITRISE DES RISQUES **<u>Remarque</u> : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Causes d'incertitude de mesure	2	Calcul des incertitudes de mesure (Non quantifiable pour les méthodes qualitatives)	LABO.ANA.IT.001 « Evaluation des incertitudes de mesure » LABO.ANA.DE.002 « Portée A : Trame excel de calcul pour le dossier de vérification de méthode quantitative » LABO.ANA.DE.004 « Portée B : Trame excel de calcul pour le dossier de validation de méthode » Revue périodique de l'incertitude de mesure Voir calcul d'incertitude et conclusion de la partie « incertitude de mesure » de ce document disponible en pages 23,31 et 37 pour l'extraction d'ADN et page 44 pour la quantification de JAK2.

MAITRISE DES RISQUES **Remarque : Cette maitrise des risques vient en complément de chacune des analyses de risques des 11 processus du laboratoire. Elle ne reprend donc que les points critiques spécifiques à cette méthode**				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité [2]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	3	Formation, habilitation et évaluation des compétences du personnel	Formation, habilitation et évaluation des compétences du personnel enregistrées et suivi dans kalilab LABO.RH.PG.004 « Gestion des formations » LABO.RH.IT.002 « Elaboration du plan DPC médical et paramédical et plan de formation au sein du laboratoire » LABO.RH.PG.003 « Gestion des compétences du personnel du laboratoire (habilitation, maintien, veille et développement)» HEMAT.RH.IT.001 « Critères de maintien des compétences – Hématologie » HEMAT.RH.DE.007 « Gr ille de qualification technicien biologie moléculaire N4 » HEMAT.RH.DE.009 « Gr ille de qualification technicien biologie moléculaire N3 » HEMAT.RH.DE.033 « Gr ille de qualification biologiste biologie moléculaire N4 »

*

SOUS-PROCESSUS 1 : Extraction d'ADN à partir de sang total	
Portée A ☒ ; Portée B ☐ (à justifier)	
DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	**Extraction d'ADN**
Principe de la Méthode :	**Extraction à partir de sang total** : L'extraction d'ADN est réalisée sur billes paramagnétiques, qui fixent l'ADN génomique. L'extraction est automatisée sur Maxwell RSC. L'extraction est réalisée sur cartouches à usage unique.
Type d'échantillon primaire :	Sang Total
Type de récipient, additifs :	Tube EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	Absence de prétraitement de l'échantillon
Unités :	ng/µl ou µg/ml
Critères d'interprétation[3] :	Pas de valeur de référence
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non concerné
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Maxwell RSC (Promega)
Référence du réactif :	**Extraction d'ADN à partir de sang total** Maxwell RSC Whole Blood DNA kit, Promega AS1520 (notice 08/2019)
Matériau d'étalonnage (références) :	Absence d'étalonnage
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Absence d'étalonnage
MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	F Bellut, P Flandrin-Gresta, C Mandon, E Girard
Procédure de validation/mode opératoire :	**LABO.QUAL.PG.009 « Elaboration des dossiers de vérification / validation des méthodes SH FORM 43 »** **HEMAT.AH.MO.046 « Extraction d'ADN à partir de sang total sur Maxwell RSC »**

[3] Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge…

Procédure de gestion de la portée flexible :	**LABO.QUAL.PG.005 « Gestion de la portée flexible Gestion de la portée flexible et des demandes d'extension selon la norme NF EN ISO 15189 et 22870 »**
Période d'étude :	Juillet 2019
Date de 1ère utilisation :	Aout 2019

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, …) : sang totaux, culots cellulaires, ADN commercial.

REPETABILITE EXTRACTION ADN SANG TOTAL MAXWELL **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**CV** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**CV** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[4])**	**Conclusion[5]**
Sang total 10G/L	5	76,8	6,5	8,46		30	Conforme
Sang Total 1G/L	5	24,7	1,35	5,47		30	Conforme

Argumentaire de la conclusion : La méthode est répétable, conforme aux besoins du laboratoire et répondant aux critères de qualité du GBMHM (*Flandrin et al, ABC, 2015*).

REPETABILITE DOSAGE ADN **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**CV** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**CV** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[6])**	**Conclusion[7]**
ADN commercial	30	232,50	2,77	1,19		5	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Le dosage des ADN sur automate BioSpec Nano est répétable, conforme aux attentes du laboratoire.

[4] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée.
[5] Conforme/non conforme
[6] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée.
[7] Conforme/non conforme

FIDELITE INTERMEDIAIRE SANG TOTAL MAXWELL Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**CV** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**CV** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[4])**	**Conclusion**[5]
Sang total 10G/L	5	87	23,48	26,99		50	Conforme
Sang total 1G/L	5	23,26	6,43	27,64		50	Conforme

Argumentaire de la conclusion : La méthode d'extraction utilisée est reproductible, conforme aux attentes du laboratoire et aux recommandations du GBMHM (*Flandrin et al, ABC 2015*).

FIDELITE INTERMEDIAIRE DOSAGE ADN Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**CV** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**CV** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[4])**	**Conclusion**[5]
ADN commercial	30	231,79	2,14	0,92		5	Conforme

Argumentaire de la conclusion : le dosage d'ADN est reproductible, conforme aux attentes du laboratoire. La quantité d'ADN extraite peut être évaluée par dosage spectrophotométrique sur Biospec nano.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
…	

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateur est appréciée par la fidélité intermédiaire.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒								
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Valeurs Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Biais** (%) **/groupe de pairs**	**Moyenne générale (toutes techniques)**	**Biais** (%) **/ moyenne générale**	**Biais** (%) **Limite**[4]	**Conclusion**[5]
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : La justesse ne peut être évaluée en l'absence de CIQ externalisés

EXACTITUDE EXTRACTION A PARTIR DE SANG TOTAL **(à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)** Contrôles quantitatifs ☐ ; Contrôles qualitatifs ☒							
Echantillons	**Valeur Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Cible** (**toutes techniques)**	**Biais** (%) **/ groupe de pairs**	**Biais** (%) **/ toute technique**	**Biais** (%) **limite**[4]	**Conclusion**[5]
DI2/19							Conforme
DI1/20							Conforme

Argumentaire de la conclusion : L'EEQ extraction d'ADN (ECAT Fondation) sur sang total teste la capacité à obtenir un ADN en concentration suffisante et de bonne qualité pour l'amplification : on ne peut donc exploiter le biais. Les résultats sont conformes, permettant d'obtenir un ADN de bonne qualité et amplifiable.

EXACTITUDE DOSAGE D'ADN (<u>à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ</u>) **Contrôles quantitatifs ☒ ; Contrôles qualitatifs ☐**								
Echantillons	**Nombre** (N)	**Valeur Labo[8]**	**Cible (groupe de pairs)**	**Moyenne générale (toutes techniques)**	**Biais (%) /groupe de pairs**	**Biais (%) /moyenne générale**	**Biais (%) limite[9]**	**Conclusion**
Echantillon CQ 16.1 A		2254		2311		2,46	10	Exact (A)
Echantillon CQ 16.1 B		2330		2336		0,25	10	Exact (A)
Echantillon CQ 16.1 C		2294		2340		1,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 16.2 A		103		101		2	10	Exact (A)
Echantillon CQ 16.2 B		104		104		0	10	Exact (A)
Echantillon CQ 16.2 C		105		102		2,94	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.1 A		95		101		5,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.1 B		98		102		3,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.1 C		99		102		2,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.1 D		92		99		6,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.2 A		103		103		0	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.2 B		100		102		1,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.2 C		101		103		1,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 17.2 D		99		103		3,8	10	Exact (A)
Echantillon CQ 18.1 A		103		102		0,97	10	Exact (A)
Echantillon CQ 18.1 B		104		103		0,97	10	Exact (A)
Echantillon CQ 18.1 C		107		102		4,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 18.1 D		106		102		3,7	10	Exact (A)
Echantillon CQ 18.2 A		100		103		2,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 18.2 B		102		103		0,97	10	Exact (A)
Echantillon		97		100		3	10	Exact (A)

[8] Nombre de chiffres significatifs

[9] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée.

CQ 18.2 C								
Echantillon CQ 18.2 D		104		105		0,95	10	Exact (A)
Echantillon CQ 19.1 JA		104		100		4	10	Exact (B)
Echantillon CQ 19.1 JB		102		99		3	10	Exact (A)
Echantillon CQ 19.1 JC		102		99		2,9	10	Exact (A)
Echantillon CQ 19.1 JD		101		100		1	10	Exact (A)
Echantillon CQ 19.2 JA	44	89		99,8		10,2	10	Non exact (D)
Echantillon CQ 19.2 JB	44	102		100		1,96	10	Exact (A)
Echantillon CQ 19.2 JC	44	82		99,6		17,6	10	Non exact (D)
Echantillon CQ 19.2 JD	44	94		99,7		5,7	10	Exact (B)
Echantillon CQ 20.1 JA	44	90		87		3,44	10	Exact (A)
Echantillon CQ 20.1 JB	44	94		86		9,3	10	Exact (B)
Echantillon CQ 20.1 JC	44	92		85		8,2	10	Exact (B)
Echantillon CQ 20.1 JD	44	88		86		2,3	10	Exact (A)
Echantillon CQ 20.2 JA	45	107		94		13,8	10	Non exact (C)
Echantillon CQ 20.2 JB	45	98		94		4	10	Exact (B)
Echantillon CQ 20.2 JC	45	95		93		2,1	10	Exact (A)
Echantillon CQ 20.2 JD	45	103		100		3	10	Exact (A)
Echantillon CQ 21.1 JA	42	98		100		2	10	Exact (A)
Echantillon CQ 21.1 JB	42	98		100		2	10	Exact (A)
Echantillon CQ 21.1 JC	42	99		101		1,99	10	Exact (A)
Echantillon CQ 21.1 JD	42	99		101		1 ,99	10	Exact (A)
Echantillon CQ 21.2 JA	43	82		73		12,32	10	Inexact (B)
Echantillon CQ 21.2 JB	43	82		72		13,9	10	Inexact (B)
Echantillon CQ 21.2 JC	43	75		73		2,66	10	Exact (A)
Echantillon CQ 21.2 JD	43	81		74		9,4	10	Exact (A)

Argumentaire de la conclusion : Absence d'EEQ d'extraction d'ADN à partir de culots secs : il n'existe qu'un EEQ appréciant le dosage de l'ADN extrait. L'EEQ réalisé à partir de sang total est conforme. Les méthodes utilisées sont exactes.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Vrais positifs	Evaluation de la capacité d'extraire de l'ADN à partir de 100 échantillons de sang total extraits par cette méthode. L'ADN extrait est amplifiable dans 100% des cas.
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

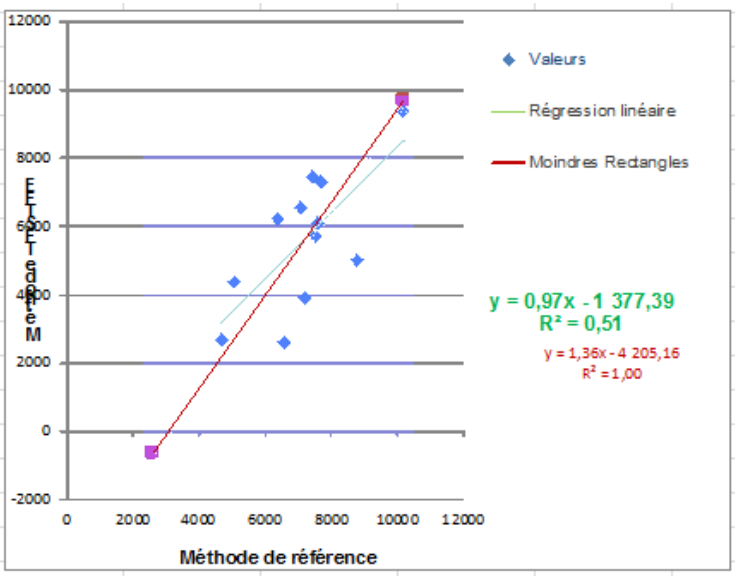
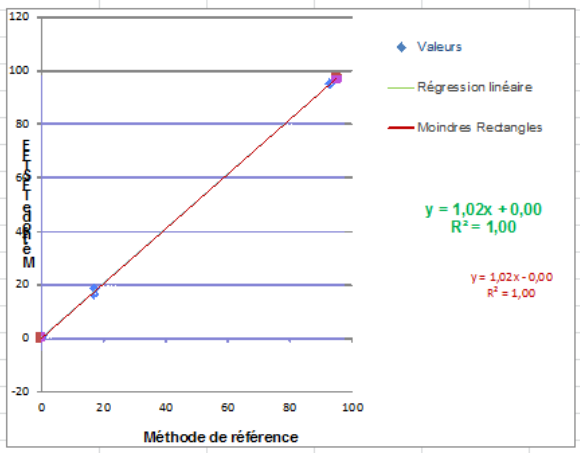
Argumentaire de la conclusion : Une approche de la sensibilité a été réalisée en étudiant la capacité de la méthode à permettre l'extraction d'un ADN amplifiable à partir de 100 prélèvements de sang total extraits : elle est de 100%, puisque nous n'avons jamais observé d'échec d'amplification à partir de sang total (Juillet à décembre 2019).

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ☐ ; calcul ☐		
	Incertitudes calculées	**Exigence de performances**
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue ± U ou Niveau 1 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue ± U ou Niveau 2 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue ± U ou Niveau xxx en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : L'extraction d'ADN ne donnant pas lieu à un résultat clinique, il ne parait pas pertinent de déterminer l'incertitude de mesure.

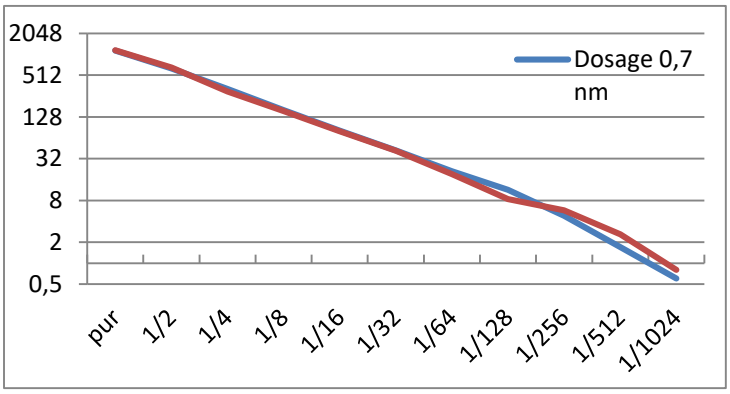
LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Limite de détection :	

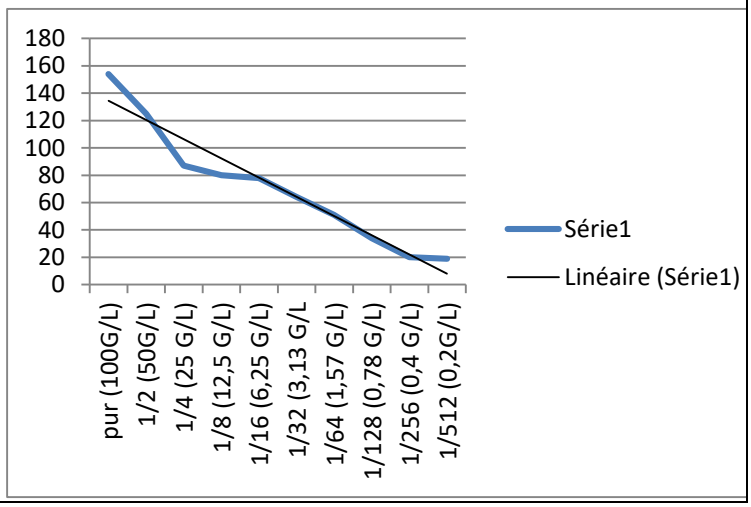
Argumentaire de la conclusion : Voire l'étendue de mesure

COMPARAISON DE METHODES : Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,…) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	- Comparaison de la quantité d'ADN obtenue entre l'ancienne méthode (Qiacube) et la nouvelle méthode (Maxwell) (n=12)  - Comparaison de la quantification de la mutation JAK2 V617F à partir des extractions sur Qiacube (ancienne méthode) et de la nouvelle technique d'extraction (n=6 sur le domaine de mesure) 
Nombre de mesures :	N= 12 ; N = 6
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des	**Quantification JAK2** : 0 – 99%

mesures du laboratoire :	
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres rectangles
Equation de la droite de régression :	1) Y= 1,36X - 4205 2) Y = 1,02x + 0
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Absence de déviants, les résultats sont superposables

Argumentaire de la conclusion : La nouvelle technique d'extraction d'ADN permet l'obtention d'un ADN de bonne qualité, amplifiable, mais en quantité légèrement plus faible que l'ancienne technique utilisée au laboratoire. Les quantités obtenues permettent toutefois d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour la réalisation des techniques en aval (JAK2), avec une concordance parfaite dans la quantification du gène cible.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, …) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	**1 ng/µl**
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	**2 ng/µl** Nous avons évalué la répétabilité d'une mesure d'un ADN à environ 3 ng/µl (n=20) et obtenu un CV de 7,7%, mettant en évidence la capacité à doser avec un degré de fiabilité satisfaisant un ADN de faible concentration.
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Le domaine de mesure du Biospec Nano a été évalué en diluant un ADN fortement concentré de deux en deux, de 1160 ng/µl à 3 ng/µl.  De même, nous avons étudié la capacité du kit sur sang total à extraire selon le nombre de globules blancs présents dans l'échantillon. Nous avons utilisé un sang contenant 100G/L de globules blanc puis procédé à des dilutions de deux en deux, jusqu'à 0,2 G/L. Nous avons

		obtenu de l'ADN de bonne qualité et amplifiable pour toutes les concentrations en globules blancs testées. 

Argumentaire de la conclusion : L'extraction d'ADN sur sang total est utilisable de 0,2 à 100 G/L. Le dosage de l'ADN est linéaire sur Biospec nano de 3 à 1160 ng/µl.

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, … - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Héparine	*Wang J T, Wang T H, Sheu J C, Lin S M, Lin J T, Chen D S. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. J Clin Microbiol. 1992;30:750–753* *- Satsangi J, Jewell D P, Welsh K, Bunce M, Bell J I. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet. 1994;343:1509–1510* *- Masaharu Yokota, Noriyuki Tatsumi, Oytip Nathalang, Tetsuaki Yamada, and Izumi Tsuda. Effects of Heparin on Polymerase Chain Reaction for Blood White Cells*
Hémoglobine	*l-Soud, W.A. and Rådström, P. (2001) Purification and characterization of PCRinhibitory components in blood cells. J. Clin. Microbiol. 39, 485–93*
Excès de protéines	***Augmentation de l'absorbance à 280 nm*** *- Stephen A. Bustin and al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for* *Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 55:4* *(2009)* *- Gemma Johnson and al. Minimum Information Necessary for Quantitative* *Real- Time PCR Experiments Chapitre . Methods in Molecular Biology, vol.* *1160.*

	Les ratios 260/280nM de 50 échantillons ADN extraits sur 5 séries d'extraction (1 mois) montrent que la contamination protéique est faible avec la méthode.

N	A 260/280 > 1,6	A 260/280 < 1,6
50	**100%**	**0%**

Argumentaire de la conclusion : Afin de minimiser les risques d'interférences notamment liés à la présence d'héparine, seuls les échantillons sur tube EDTA sont acceptés au laboratoire. Les autres anticoagulants sont acceptés uniquement sur dérogation, en s'assurant que les ADN sont amplifiables (réalisation d'une PCR de qualification en amont de l'amplification du gène cible).
La méthode permet d'obtenir un ADN pur, de bonne qualité et amplifia

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐

Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, …) :

Etude de la contamination sur l'automate d'extraction Maxwell en alternant des échantillons positifs et négatifs pour la mutation JAK2 V617F, puis quantification de la mutation.

1	Positif fort	94,87
2	négatif	0
3	Positif fort	95,19
4	négatif	0
5	Positif fort	93,69
6	négatif	0
7	Positif fort	94,58
8	négatif	0
9	Positif fort	94,72
10	négatif	0

Etude de la contamination lors du dosage d'ADN sur Biospec nano en alternant trois échantillons positifs et trois négatifs lors du dosage : absence de contamination lors du dosage sur Biospec Nano.

	<table><tr><th>Niveaux Haut</th><th>Résultats Haut</th><th>Niveaux Bas</th><th>Résultats Bas</th></tr><tr><td>H1</td><td>169,1</td><td>B1</td><td>0,8</td></tr><tr><td>H2</td><td>166,8</td><td>B2</td><td>0,4</td></tr><tr><td>H3</td><td>166,3</td><td>B3</td><td>0,3</td></tr><tr><td>H1</td><td>166,80</td><td>B1</td><td>0,6</td></tr><tr><td>H2</td><td>175,20</td><td>B2</td><td>0,7</td></tr><tr><td>H3</td><td>167,30</td><td>B3</td><td>1,1</td></tr><tr><td>H1</td><td>172,60</td><td>B1</td><td>0,9</td></tr><tr><td>H2</td><td>166,00</td><td>B2</td><td>1,8</td></tr><tr><td>H3</td><td>171,70</td><td>B3</td><td>0,6</td></tr><tr><td>H1</td><td>176,90</td><td>B1</td><td>1</td></tr><tr><td>H2</td><td>171,50</td><td>B2</td><td>0,6</td></tr><tr><td>H3</td><td>168,90</td><td>B3</td><td>0,9</td></tr></table>
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, …) :	Cartouches à usage unique, pas de contamination inter-réactif.

Argumentaire de la conclusion : Nos tests sur l'automate d'extraction ou lors du dosage n'ont pas mis en évidence de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, …)	Respect des préconisations du fournisseur
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, …	Respect des préconisations du fournisseur

Argumentaire de la conclusion : Les réactifs sont conservés et utilisés selon les recommandations du fournisseur (voir analyse de risques).

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Valeurs de référence	Absence

Argumentaire de la conclusion : Absence d'intervalle de référence pour l'extraction d'ADN. En effet, la quantifié d'ADN obtenu dépend du nombre de globules blancs contenus dans l'échantillon.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : La méthode d'extraction à partir de sang total sur Maxwell permet d'obtenir un ADN de bonne qualité, en quantité suffisante et amplifiable. De plus, cette méthode permet une maitrise du risque de contamination et donc conforme aux attentes du laboratoire, mise en service à partir du 10/08/20190 Autorisée par : P Flandrin-Gresta Signature

SOUS-PROCESSUS 2 : Extraction d'ADN à partir de culots de cellules mononuclées obtenues à partir de sang ou de moelle	
Portée A ☒ ; Portée B ☐ (à justifier)	
DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	**Extraction d'ADN**
Principe de la Méthode :	**Extraction d'ADN à partir de culots cellulaires** préparés à partir de sang ou de moelle, obtenu par isolement des cellules mononucléées : L'extraction utilise la propriété de précipitation des ADN en milieu alcoolique, après ajout d'un agent chaotropique. L'extraction est manuelle.
Type d'échantillon primaire :	Sang Total Moelle osseuse
Type de récipient, additifs :	Tube EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	Extraction sur culot cellulaire (moelle osseuse, sang) : Isolement des cellules mononucléées par Ficoll
Unités :	ng/µl ou µg/ml
Critères d'interprétation[10] :	Pas de valeur de référence
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non concerné
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Non concerné, extraction manuelle
Référence du réactif :	Flexigen , Qiagen 51206 (notice 01/2014)
Matériau d'étalonnage (références) :	Absence d'étalonnage
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Absence d'étalonnage
MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	F Bellut, P Flandrin-Gresta, C Mandon, E Girard
Procédure de validation/mode opératoire :	**LABO.QUAL.PG.009 « Elaboration des dossiers de vérification / validation des méthodes SH FORM 43 »** **HEMAT.AH.MO.021 « Extraction d'ADN avec Kit Flexigen à partir de culots secs »**

[10] Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge…

Procédure de gestion de la portée flexible :	**LABO.QUAL.PG.005 « Gestion de la portée flexible Gestion de la portée flexible et des demandes d'extension selon la norme NF EN ISO 15189 et 22870 »**
Période d'étude :	2005 -2014 (étude rétrospective)
Date de 1ère utilisation :	Préciser : 2005

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, …) : sang totaux, culots cellulaires, ADN commercial.

REPETABILITE EXTRACTION ADN CULOTS SECS FLEXIGEN **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**CV** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**CV** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[11])**	**Conclusion[12]**
Culot cellulaire 1Million de cellules	5	355,8	16,2	4,55		30	Conforme
Culot cellulaire 20 millions de cellules	5	454,3	84,4	18,6		30	Conforme

Argumentaire de la conclusion : La méthode est répétable, conforme aux besoins du laboratoire et répondant aux critères de qualité du GBMHM (*Flandrin et al, ABC, 2015*).

[11] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée.

[12] Conforme/non conforme

REPRODUCTIBILITE EXTRACTION ADN CULOTS SECS FLEXIGEN Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**CV** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**CV** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[13])**	**Conclusion[14]**
Culot cellulaire 1Million de cellules	5	345,8	45,4	13,12		50	Conforme
Culot cellulaire 20 millions de cellules	5	467,4	95,4	20,4		50	Conforme

Argumentaire de la conclusion : La méthode est reproductible, conforme aux besoins du laboratoire et répondant aux critères de qualité du GBMHM (*Flandrin et al, ABC, 2015*).

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
…	

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateur est appréciée par la fidélité intermédiaire.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒								
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Valeurs Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Biais** (%) **/groupe de pairs**	**Moyenne générale (toutes techniques)**	**Biais** (%) **/ moyenne générale**	**Biais** (%) **Limite[4]**	**Conclusion[5]**
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

<u>Argumentaire de la conclusion :</u> Absence de CIQ externalisé

[13] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée.

[14] Conforme/non conforme

EXACTITUDE EXTRACTION A PARTIR DE CULOTS SECS (<u>à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ</u>) Contrôles quantitatifs ☐ ; Contrôles qualitatifs ☐							
Echantillons	**Valeur Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Cible (toutes techniques)**	**Biais (%) / groupe de pairs**	**Biais (%) / toute technique**	**Biais (%) limite[4]**	**Conclusion [5]**

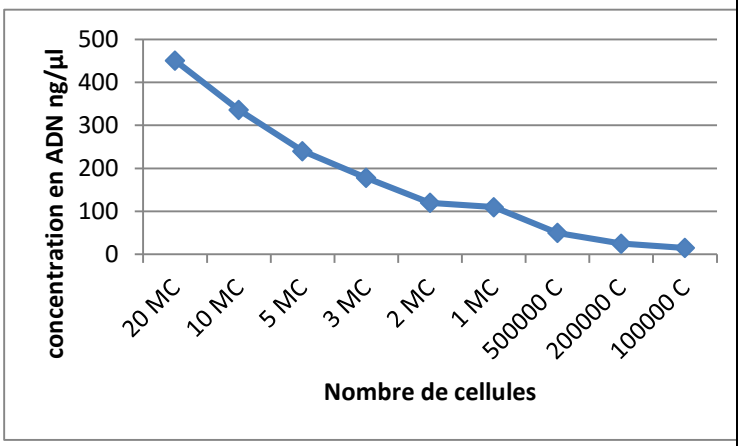
<u>Argumentaire de la conclusion</u> Il n'existe pas d'EEQ pour l'extraction d'ADN à partir de culot cellulaires. Seul le dosage d'ADN peut être évalué par des EEQ (voir sous processus 1).

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (Étude expérimentale indispensable en portée B) (Étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Vrais positifs	Evaluation de la capacité d'extraire de l'ADN à partir de 100 culots secs extraits par cette méthode (année 2012-2014) ADN extrait et amplifiable dans 100% des cas.
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

<u>Argumentaire de la conclusion</u> : La sensibilité analytique et la spécificité n'ont pas d'intérêt pour l'extraction d'ADN. L'important est la détermination du domaine de mesure. Nous avons toutefois évalué la capacité de la méthode à extraire de l'ADN sur 100 prélèvements extraits, qui est de 100%. Nous n'avons jamais eu d'échec d'extraction à partir de culots secs.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ☐ ; calcul ☐		
	Incertitudes calculées	**Exigence de performances**
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue ± U ou Niveau 1 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue ± U ou Niveau 2 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue ± U ou Niveau xxx en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : L'extraction d'ADN ne donnant pas lieu à un résultat clinique, il ne parait pas pertinent de déterminer l'incertitude de mesure.

<table>
<tr><th colspan="3">ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour :
troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, …)
Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐</th></tr>
<tr><td>Limite de détection :</td><td>Etude bibliographique (sources et valeurs)</td><td>1 ng/µl</td></tr>
<tr><td>Limite de quantification :</td><td>Etude bibliographique (sources et valeurs)</td><td>2 ng/µl
Nous avons évalué la répétabilité d'une mesure d'un ADN à environ 3 ng/µl (n=20) et obtenu un CV de 7,7%, mettant en évidence la capacité à doser avec un degré de fiabilité satisfaisant un ADN de faible concentration.</td></tr>
<tr><td>Limite supérieure de linéarité :</td><td>Etude bibliographique (sources et valeurs)</td><td>Nous avons réalisé des extractions à partir de culots cellulaires de différentes tailles, afin d'apprécier la capacité de la technique à extraire un ADN amplifiable.
 

Les ADN extraits étaient tous amplifiables, et les ratios obtenus de bonne qualité (> 1,6).</td></tr>
</table>

Argumentaire de la conclusion : La technique d'extraction est utilisable pour des culots cellulaires allant de 150000 à 20 millions de cellules.

<table>
<tr><th colspan="2">INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, … - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)
Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐</th></tr>
<tr><td>Héparine</td><td>Wang J T, Wang T H, Sheu J C, Lin S M, Lin J T, Chen D S. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. J Clin Microbiol. 1992;30:750–753
- Satsangi J, Jewell D P, Welsh K, Bunce M, Bell J I. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet. 1994;343:1509–1510
- Masaharu Yokota, Noriyuki Tatsumi, Oytip Nathalang, Tetsuaki Yamada, and Izumi Tsuda. Effects of Heparin on Polymerase Chain Reaction for Blood White Cells</td></tr>
<tr><td>Hémoglobine</td><td>l-Soud, W.A. and Rådström, P. (2001) Purification and characterization of PCRinhibitory components in blood cells. J. Clin. Microbiol. 39, 485–93</td></tr>
<tr><td>Excès de protéines</td><td>Augmentation de l’absorbance à 280 nm
- Stephen A. Bustin and al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for
Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 55:4
(2009)
- Gemma Johnson and al. Minimum Information Necessary for Quantitative
Real- Time PCR Experiments Chapitre . Methods in Molecular Biology, vol.
1160.
Les ratios 260/280nM de 50 échantillons ADN extraits sur 5 séries d'extraction (1 mois) montrent que la contamination protéique est faible avec la méthode.
<table>
<tr><th>N</th><th>A 260/280 > 1,6</th><th>A 260/280 < 1,6</th></tr>
<tr><td>50</td><td>98%</td><td>2% (1,55 – 1,57)</td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

Argumentaire de la conclusion : Afin de minimiser les risques d’interférences notamment liés à la présence d’héparine, seuls les échantillons sur tube EDTA sont acceptés au laboratoire. Les autres anticoagulants sont acceptés uniquement sur dérogation, en s’assurant que les ADN sont amplifiables (réalisation d’une PCR de qualification en amont de l’amplification du gène cible).
La méthode permet d’obtenir un ADN pur, de bonne qualité et amplifiable.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,…) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Pas d'autre méthode utilisée au laboratoire pour l'extraction des ADN à partir de culots secs
Nombre de mesures :	
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	
Méthode d'exploitation des résultats :	
Equation de la droite de régression :	
Diagramme des différences et/ou des rapports :	

Argumentaire de la conclusion : L'extraction utilisant le kit Flexigen est la seule méthode utilisée au laboratoire pour l'extraction de l'ADN à partir de culots secs.

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, …) :	Extraction d'échantillons négatifs ou positifs pour le gène JAK2 dans la même série, puis quantification du gène JAK2.
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, …) :	

1	Positif fort	Positif
2	négatif	Négatif
3	Positif fort	Positif
4	négatif	négatif

Argumentaire de la conclusion : La possibilité théorique de contamination croisée est liée à l'extraction des ADN simultanée de différents patients dans une même série. Il est donc théoriquement possible que lors de l'extraction l'ADN d'un patient contamine celui d'un autre.
Les résultats montrent l'absence de contamination croisée dans les études expérimentales.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, …)	Respect des préconisations du fournisseur
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, …	Respect des préconisations du fournisseur

Argumentaire de la conclusion : Les réactifs sont conservés et utilisés selon les recommandations du fournisseur (voir analyse de risques).

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Valeurs de référence	Absence

Argumentaire de la conclusion : Absence d'intervalle de référence pour l'extraction d'ADN. En effet, la quantifié d'ADN obtenu va dépendre du nombre de globules blancs contenus dans l'échantillon.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : La méthode d'extraction à partir de culots secs est conforme aux besoins du laboratoire , permet d'obtenir un ADN de bonne qualité, en quantité suffisante et amplifiable, qui donne satisfaction depuis de nombreuses années (2005) Autorisée par :P Flandrin-Gresta Signature

SOUS-PROCESSUS 3 : Extraction d'ADN à partir de culots cytogénétiques	
Portée A ☐ ; Portée B ☒ (à justifier)	
DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	**Extraction d'ADN**
Principe de la Méthode :	**Extraction d'ADN à partir de culot cytogénétique** : Le principe d'extraction est basé sur l'utilisation d'une colonne de silice, qui va retenir l'ADN. Cette extraction est manuelle, sur un kit commercialisé.
Type d'échantillon primaire :	Sang Total Moelle osseuse
Type de récipient, additifs :	Culot cytogénétique
Prétraitement de l'échantillon :	Préparation et congélation d'un culot cytogénétique (moelle osseuse, sang), obtenu après réalisation d'un buffy-coat. Il s'agit donc d'un enrichissement en globules blancs, avec élimination des globules rouges. Le culot cytogénétique est issu de la mise en culture des globules blancs par des techniques de culture cellulaire.
Unités :	ng/µl ou µg/ml
Critères d'interprétation[15] :	Pas de valeur de référence
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non concerné
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Non concerné (extraction manuelle)
Référence du réactif :	**Extraction d'ADN à partir de culot cytogénétique** QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen 51304 (notice 08/2016)
Matériau d'étalonnage (références) :	Absence d'étalonnage
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Absence d'étalonnage
MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	P Flandrin-Gresta, C Mandon

[15] Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge…

Procédure de validation/mode opératoire :	**LABO.QUAL.PG.009 « Elaboration des dossiers de vérification / validation des méthodes SH FORM 43 »** **HEMAT.AH.MO.029 « Extraction d'ADN à partir de culot cytogénétique »**
Procédure de gestion de la portée flexible :	**LABO.QUAL.PG.005 « Gestion de la portée flexible Gestion de la portée flexible et des demandes d'extension selon la norme NF EN ISO 15189 et 22870 »**
Période d'étude :	Février 2020
Date de 1ère utilisation :	Février 2020

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, …) : Culots cytogénétiques conservés à -20°C.

Les culots cytogénétiques étant des prélèvements précieux, nous nous sommes assurés sur 5 échantillons différents, de taille variable et pour lesquels une conservation à long terme n'était pas nécessaire, que l'ADN était de bonne qualité et amplifiable.

Echantillon	Concentration en ADN (ng/µl)	Ratio 260/280	PCR MYD88
2001C152015	158	1,99	ADN Amplifiable
2001C131690	132	1,96	ADN Amplifiable
2001C201709 (petit culot)	90	2,03	ADN Amplifiable
2001C222317	113	1,98	ADN Amplifiable
2001C222407 (petit culot)	68	1,97	ADN Amplifiable

Argumentaire de la conclusion : le kit d'extraction d'ADN Minikit de Qiagen est donc utilisable pour l'extraction d'ADN à partir de culots cytogénétiques, puisqu'il permet d'obtenir des ADN en quantité suffisante et amplifiables par PCR.

REPETABILITE **Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**Fold Change** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**Fold change** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[16])**	**Conclusion[17]**

Argumentaire de la conclusion : Prélèvements précieux, le coût d'obtention d'un culot cytogénétique étant élevé, pas d'étude de répétabilité envisageable.

FIDELITE INTERMEDIAIRE **Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type**	**Fold Change** (%)	**CV** (%) **fournisseur**	**Fold Change** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[4])**	**Conclusion[5]**

Argumentaire de la conclusion : Prélèvements précieux, le coût d'obtention d'un culot cytogénétique étant élevé, pas d'étude de reproductibilité envisageable.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS **Applicable ☒ ; non applicable ☐**	
F Bellut	Réalisation de plusieurs extractions (2003C041027, 2002C181961, 2003C201524, 2003C201524, 2003C032230) par trois opérateurs différents.
E Mazet	
E Girard	

Argumentaire de la conclusion : Tous les opérateurs ont permis d'obtenir un ADN en quantité suffisante et amplifiable par différentes techniques (NGS, MYD88).

[16] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée.

[17] Conforme/non conforme

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒								
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Valeurs Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Biais** (%) **/groupe de pairs**	**Moyenne générale (toutes techniques)**	**Biais** (%) **/ moyenne générale**	**Biais** (%) **Limite**[4]	**Conclusion**[5]
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : Il n'existe pas de CIQ externalisé pour cette technique.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, …) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	

<u>Argumentaire de la conclusion</u> : Les culots cytogénétiques étant des prélèvements précieux, une étude de l'étendue de mesure n'est pas envisageable. En pratique, nous avons toujours obtenu de l'ADN en quantité suffisante pour nos analyses, quelle que soit la taille du culot utilisé.

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, … - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Hémolyse	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Turbidité	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Bilirubine, ictère	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Médicaments	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge
…	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge

Argumentaire de la conclusion : Les culots cytogénétiques étant des prélèvements précieux, une étude des interférences n'est pas envisageable. Le culot cellulaire étant lavé plusieurs fois avant extraction, les risques d'interférence sont minimes. Nous n'avons jamais observé d'échec d'amplification après utilisation de cette technique.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion : Prélèvements précieux, le coût d'obtention d'un culot cytogénétique étant élevé, pas d'étude de sensibilité ou spécificité envisageable.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ☒ ; calcul ☐		
	Incertitudes calculées	**Exigence de performances**
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue ± U ou Niveau 1 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue ± U ou Niveau 2 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue ± U ou Niveau xxx en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : L'extraction d'ADN ne donnant pas lieu à un résultat clinique, il ne parait pas pertinent de déterminer l'incertitude de mesure.

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, …) :	
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, …) :	

Argumentaire de la conclusion : Les culots cytogénétiques sont extraits rarement et unitairement, pas de risque de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, …)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, …	

Argumentaire de la conclusion : Les réactifs sont utilisés selon les recommandations du fournisseur.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Valeurs de référence	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion : Il n'existe pas d'intervalle de référence

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : La validation de cette extraction est une validation à minima, qui permet de s'assurer que la méthode peut être utilisée pour l'extraction d'ADN à partir de culot cytogénétique. Ces prélèvements sont des prélèvements précieux, souvent obtenus à partir de moelle osseuse, et l'utilisation de cette source de cellules est réservée aux prélèvements pour lesquels un nouveau prélèvement de moelle est difficile ou impossible, ce qui limite beaucoup leur utilisation. Méthode conforme utilisée à partir du 20/02/2020 Autorisée par :P Flandrin-Gresta Signature

SOUS-PROCESSUS 4 : recherche et quantification de la mutation JAK2 V617F
Portée A ☐ ; Portée B ☒ (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	**Recherche et quantification de la mutation JAK2 V617F**
Principe de la Méthode :	PCR digitale quantitative : répartition de l'ADN dans plusieurs milliers de gouttelettes en réalisant autant de PCR indépendantes. Détection en point final par fluorescence. Les sondes ciblant la séquence WT sont couplées avec le fluorochrome HEX alors que les sondes ciblant la séquence mutée sont couplées avec le fluorochrome FAM. Chaque gouttelette va contenir une séquence d'ADN mutée ou non. A la lecture de la fluorescence, on pourra savoir quelle est la séquence d'ADN dans chaque gouttelette et faire un ratio entre les gouttelettes « mutées » et les grouttelettes « WT ».
Type d'échantillon primaire :	Sang Total Moelle Culot cytogénétique
Type de récipient, additifs :	Tube EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	Extraction d'ADN (voir sous processus 1 à 3)
Unités :	% de copies mutées par rapport au nombre de copies totales (sauvages + mutées) = **ratio allélique**
Critères d'interprétation :	Le seuil de positivité retenu est de 1%. La mutation JAK2 V617F doit être absente d'un individu sain (< 1%). Entre 0,1 et 1%, peut être considéré comme un marqueur d'hématopoïèse clonale : rendu faible positif et nécessité de rechercher les mutations CALR et MPL. Inférieur à 0.1% : rendu négatif Les ratios alléliques sont différents en fonction des pathologies : 96% dans la PV, 58% dans la TE et 53% dans la MFP.
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non concerné
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	AUTO DG : Générateur automatique de gouttelettes (Biorad) Thermocycleur : VERITI (Life Technologies)

	PX1 PCR Plate Sealer (Biorad) Lecture des gouttelettes : QX200 Droplet Digital PCR System (Biorad)
Référence du réactif :	Amorces : ddPCR Mut Assay, VAL JAK2 V617F, Hsa (Biorad®) Mix : ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) 500 Rxns (Biorad®)
Matériau d'étalonnage (références) :	Pas d'étalonnage
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Pas d'étalonnage, maintenances annuelles

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Françoise BELLUT, Pascale FLANDRIN-GRESTA, Manon DUPRAT
Procédure de validation/mode opératoire :	**LABO.QUAL.PG.009 « Elaboration des dossiers de vérification / validation des méthodes SH FORM 43 »** **HEMATO.AH.MO.093 : « Recherche de la mutation JAK2 V617F par PCR digitale »**
Procédure de gestion de la portée flexible :	**LABO.QUAL.PG.005 « Gestion de la portée flexible Gestion de la portée flexible et des demandes d'extension selon la norme NF EN ISO 15189 et 22870 »**
Période d'étude :	Mai 2020-Février 2021
Date de 1ère utilisation :	2021

MAITRISE DES RISQUES

(Voir maitrise des risques commune avec le sous processus 1 : extraction d'ADN)

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, …) :
Echantillons de patients, lignées cellulaires.

REPETABILITE **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type (log)**	**CV** (%)	**Fold Change (%)**	**Fold Change** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[18])**	**Conclusion[19]**
Lignée cellulaire SET 50%	5	38.38	0,005	1.3	1.03	< 2 fois	Conforme
Lignée cellulaire SET 0.1%	8	0,08	0,19	40	2.36	< 3 fois	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Répétabilité conforme aux attentes du laboratoire et selon les recommandations du GBMHM (Flandrin et al, ABC, 2015).

FIDELITE INTERMEDIAIRE **Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐**							
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Moyenne**	**Ecart-type (log)**	**CV** (%)	**Fold Change** (%)	**Fold Change** (%) **retenu par le laboratoire (cf. source[4])**	**Conclusion[5]**
Lignée cellulaire SET 50%	9	39.58	0.04	8.6	1.18	< 5 fois	Conforme
Lignée cellulaire SET 0.1%	9	0.07	0.26	50.2	3.28	< 5 fois	Conforme

[18] Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…).
[19] Conforme/non conforme

Argumentaire de la conclusion : Fidélité intermédiaire conforme aux attentes du laboratoire et selon les recommandations du GBMHM (Flandrin et al, ABC, 2015).

VARIABILITE INTER-OPERATEURS **Applicable ☐ ; non applicable ☒**	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
…	

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateur sera évaluée en incrémentant les données de fidélité intermédiaire car l'ensemble des techniciens du laboratoire vont participer à cette activité.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) **Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒**								
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Valeurs Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Biais** (%) **/groupe de pairs**	**Moyenne générale (toutes techniques)**	**Biais** (%) **/ moyenne générale**	**Biais** (%) **Limite**[4]	**Conclusion**[5]
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : L'approche de la justesse n'est pas possible car il n'existe pas de CIQ externalisé pour cette technique.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) **Contrôles quantitatifs ☒ ; Contrôles qualitatifs ☐**					
Echantillons	**Valeur Labo**	**Cible** (toutes techniques)	**Bornes 2sigma**	**Z score**	**Conclusion**[5]
Echantillon CQ22.2 JA	5.2	5.83	3.85-8.82	A	Conforme
Echantillon CQ22.2 JB	14.7	17.76	12.29-25.67	B	Conforme
Echantillon CQ22.2 JC	0	0		A	Conforme
Echantillon CQ22.2 JD	1.6	1.93	1.22-3.06	A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JA	8,4	8,73	6,93-10,99	A	Conforme

Echantillon CQ23.1 JB	47,1	48,32	42,08-55,48	A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JC	0	0		A	Conforme
Echantillon CQ23.1 JD	1,7	2,29	1,77-2,95	B	Conforme
Echantillon CQ23.2 JA	24	27.83	16-77-46.19	A	Conforme
Echantillon CQ23.2 JB	0	0		A	Conforme
Echantillon CQ23.2 JC	13.5	15.63	8.99-27.16	A	Conforme
Echantillon CQ23.2 JD	4	4.08	2.35-7.09	A	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Les résultats sont tous conformes, la méthode est donc conforme aux exigences du laboratoire.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
(étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐

VPP : 0.984

VPN : 0.975

Sensibilité : 0.984

Spécificité : 0.975

	SET	U937
Positif	64	1 (FP)
Négatif	1 (FN)	39

Argumentaire de la conclusion :
Sur toutes les techniques, nous avons passé 65 fois la lignée SET à différents % (lignée JAK2 mutée) et 40 fois la lignée U937 (ligné négative). 1 fois la lignée SET est sortie négative (elle était diluée à 0.1 %) et une fois la lignée U397 est sortie positive (0.025 %).

Etude bibliographique :
Perricone et al, Oncotarget, 2017
Bench, Br J Haematol, 2013

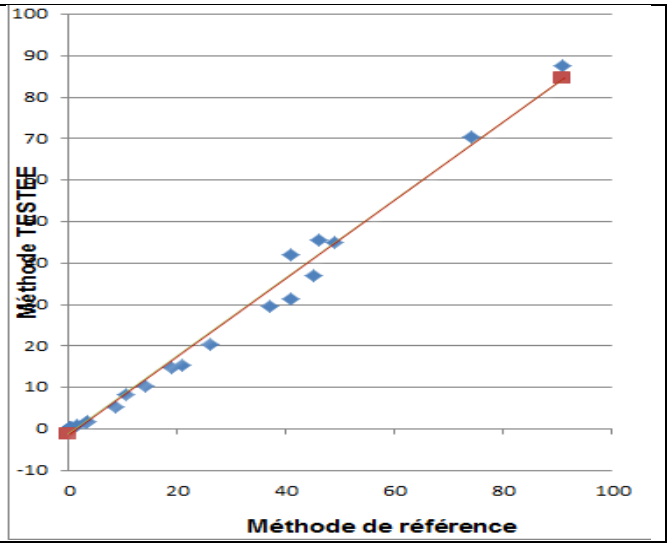
INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ☐ ; calcul ☒		
	Incertitudes calculées	**Exigence de performances**
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	$U(C) = \sqrt{U_{CIQ}^2 + U_{EEQ}^2}$	SH GTA 04
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : SET 50%	Fold Change : 1.34	< 5 fold change
Quantification de l'incertitude (niveau 2) : SET 0,1%	Fold Change : 3.36	< 5 fold change

Argumentaire de la conclusion:Le calcul de l'incertitude globale est conforme aux données de la littérature (Branford S, Leukemia, 2006)

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☒ ; non applicable ☐	
Limite de détection :	**0.01 %**

Argumentaire de la conclusion : 40 passages de Lignée U937 : nombre de copies JAK2 *3 Sb = 0.01 %.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,…) :	Références méthodes
Méthodes comparées : méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareils en miroir ou back-up, EBMD, …	Comparaison avec la méthode de PCR quantitative utilisée au laboratoire sur l'automate ABI 7900
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	0% - 91%
Méthode d'exploitation des résultats :	Etude des différences
Equation de la droite de régression :	**y = 0.94x-1.05**

Exploitation des résultats de comparaison (diagramme de différences, concordance catégorielle) :	

Méthode référence	Méthode testée	Testée - Référence
21	15,3	-5,7
41	31,4	-9,6
91	87,6	-3,4
14	10,4	-3,6
49	45,1	-3,9
74	70,3	-3,7
41	42,1	1,1
10,5	8,2	-2,3
46	45,6	-0,4
37	29,6	-7,4
45	37,1	-7,9
26	20,5	-5,5
3,37	1,93	-1,44
0,42	0,1	-0,32
0,43	0,34	-0,09
1,63	0,97	-0,66
0,25	0,16	-0,09
0,35	0,45	0,1
0,43	0,28	-0,15
0,47	0,25	-0,22
0,07	0	-0,07
0,01	0	-0,01
0,05	0,03	-0,02
0	0	0
0	0	0

0	0	0
0	0	0
3,1	1,6	-1,5
19,1	14,7	-4,4
8,6	5,2	-3,4

Argumentaire de la conclusion : Les résultats sont concordants entre les deux techniques.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, …) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	0,01% (déterminée par le passage systématique d'une lignée cellulaire négative)
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	0,1% (déterminée par le passage systématique d'une lignée cellulaire à 0.1%, qui donne toujours un signal positif et reproductible (voir fidélité intermédiaire)
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (données fournisseurs, 100%)	91% Etude expérimentale (valeurs)

Argumentaire de la conclusion : Nous avons dilué 2 par 2 un patient connu pour avoir une VAF à 90% en qPCR. Nous avons passé chaque dilution en quintuplicate.

Les données de la littérature nous apportent :

- Une certitude clinique au-delà de 1% d'allèle JAK2 muté.
- Des résultats devant être considérés comme positifs faibles entre 0,1 et 1%, et témoins soit d'une hématopoïèse clonale, soit de la présence d'une autre mutation affectant les gènes JAK2 (exon 12), CALR ou MPL. Afin d'éliminer de faux positifs, nous demandons toujours un contrôle des échantillons faiblement positifs sur un second prélèvement.
- Nous considérons comme négatif tout résultat de JAK2 < 0,1%. Nous réalisons dans toutes nos PCR un témoin positif aux alentours de 0,1% afin de s'assurer de la capacité de la technique à détecter un faible signal. Depuis que nous utilisons ce CQI faible niveau, un signal JAK2 a toujours été détecté.
- Des polymorphismes génétiques au niveau des zones d'hybridation des amorces peuvent donner de faux négatifs. Dans notre expérience (n=1), et après comparaison avec les données de NGS, la PCR quantitative et la PCR digitale sous estimaient le signal (0,3% et 0.1% versus 8%), mais n'a pas donné un signal totalement négatif. Quoi qu'il en soit, nous recommandons dans les SMP triple négatifs de réaliser un NGS diagnostic à la recherche de mutations rares ou de faux négatifs.

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, … - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Hémolyse	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Turbidité	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Bilirubine, ictère	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Médicaments	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge
…	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge

Argumentaire de la conclusion : les interférences sont celles décrites dans le sous processus 1 correspondant à l'extraction d'ADN.

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐

Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, …) :

Nous avons extrait et quantifié des échantillons fortement positifs et négatifs pour la mutation JAK2 V617F et n'avons pas observé de contamination alors que les échantillons étaient évalués sur des positions contiguës lors de l'extraction et de l'amplification.

Etude de la contamination sur l'automate d'extraction Maxwell en alternant des échantillons positifs et négatifs pour la mutation JAK2 V617F, puis quantification de la mutation.

1	Positif fort	94,87
2	négatif	0
3	Positif fort	95,19
4	négatif	0
5	Positif fort	93,69
6	négatif	0
7	Positif fort	94,58
8	négatif	0

Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, …) :

Les mix étant préparés de façon unique, pas de risque de contamination inter réactifs.

Argumentaire de la conclusion : le risque de contamination est maitrisé au laboratoire. De plus, le risque de contamination est testé à chaque technique car nous alternons sur chaque plaque de PCR les contrôles positifs et les contrôles négatifs.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, …)	Quantité d'ADN et d'amorces
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, …	Données fournisseurs : respect des règles d'utilisation des réactifs (conservation, délai de péremption)

Argumentaire de la conclusion :

Les réactifs (amorces et MIX) sont conservés selon les recommandations du fournisseur (Amorces à 4°C et MIX à -20°C), de plus nous respectons les dates de péremption pour permettre la stabilité des réactifs.

La robustesse de la technique a été évaluée en testant plusieurs quantités d'ADN et d'amorces différentes, les résultats de ratio allélique étaient stables.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable ☒ ; non applicable ☐	
Valeurs de référence	La mutation JAK2 V617F (c.1849G>T) (exon 14 du gène JAK2) est retrouvée dans 96 % des Polyglobulies de Vaquez, 58 % des thrombocytémies essentielles et 53 % des myélofibroses Primitives. Elle est également retrouvée au cours de bilans de thrombophilie dans le cadre de syndromes de Budd Chiari, de thromboses portes ou cérébrales. Le seuil de signification clinique dans les syndromes myéloprolifératifs est de 1%. Entre 0,1 et 1%, la présence d'une mutation JAK2 V617F peut être le témoin d'une hématopoïèse clonale. Elle doit entrainer la recherche des autres mutations fréquentes des SMP (JAK2 exon12, CALR et MPL) ou en cas de négativité des trois marqueurs un NGS pour éliminer de faux négatifs. Entre 0.01% et 0.1%, le résultat sera rendu douteux avec demande d'un nouveau prélèvement de contrôle. En dessous de 0,01%, le résultat est considéré comme négatif.

Argumentaire de la conclusion : La méthode utilisée permet d'identifier la mutation du gène JAK2 conformément à l'intervalle de référence défini dans la littérature (Bench, Br J Haematol, 2013).

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : Les performances obtenues sur site Les fold change de fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) sont conformes aux attentes fixées par le laboratoire en accord avec les données de la littérature et du fournisseur. Enfin, les résultats des EEQ sont conformes aux attentes du Groupe Français des Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes (GBMHM). Au vue de l'ensemble du dossier de vérification de méthode, la recherche de mutation JAK2 V617F en PCR Digitale est validée pour être utilisée en routine au laboratoire d'Hématologie du CHU de Saint-Etienne. Méthode conforme utilisée à partir de 2021. Autorisée par : P Flandrin-Gresta Signature

Annexe 5 : Mode opératoire – Recherche de la mutation *JAK2* V617F par PCR digitale

RECHERCHE DE LA MUTATION JAK2 V617F PAR PCR DIGITALE

1 OBJET

Ce mode opératoire décrit le déroulement de la recherche et la quantification de la mutation JAK2 V617F par la technique de PCR digitale.

La technologie de digitale PCR est basée sur le principe du partitionnement de l'échantillon en 20 000 microgoutelettes (par une émulsion eau dans huile), puis à l'amplification de chaque ADN ainsi individualisé. La détection de la fluorescence est réalisée en point final.

2 RESPONSABILITES - DOMAINE D'APPLICATION

Ce document doit être connu et appliqué par les techniciennes, internes et biologistes du laboratoire d'hématologie (secteur de biologie moléculaire).

3 REFERENCES

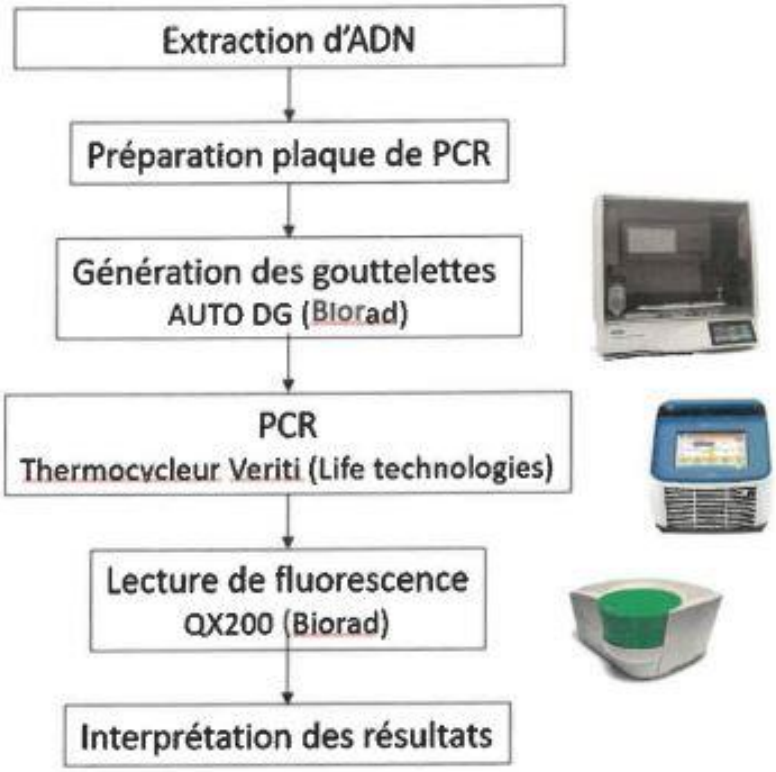
QXDx™ BCR-ABL %IS Kit Guide (ref 12006672FRrevB)

4 DEFINITIONS - ABREVIATIONS

PCR : Polymerase Chain Reaction

5 CONTENU

5.1 Etapes opératoires



5.2 Préparation des réactifs

Les réactifs sont prêts à l'emploi.
Le mix se trouve dans le congélateur -20°C et les amorces sont au réfrigérateur 4°C dans la salle de mix.

5.3 Préparation de la plaque de PCR

- Décongeler les ADN dans la glace
- Préparer les dilutions des ADN pour obtenir des échantillons à 10 ng/µL (cf Tableau de dilution ADN pour quantification JAK2 V617F) dans tubes Eppendorf XXX µL
- Sortir le ddPCR supermix du congélateur et le laisser décongeler dans la glace
- Sortir les amorces du réfrigérateur
- Vortexer les réactifs pour bien homogénéiser (minimum 5 secondes), puis centrifuger brièvement.
- Préparer le mix réactionnel comme indiqué dans le tableau ci-dessous (quantitiés données à titre indicatif, la feuille de travail permet de calculer les volumes à prélever quelque soit le nombre d'échantillons :

Réactif	Nombre d'échantillons (patients + contrôles)				
	1	8	16	24	32
	Volumes à prélever (µl)				
Amorces	1.1	8.8	17.6	26.4	35.2
ddPCR supermix	11	88	176	264	352
Eau	4.9	39.2	78.4	117.6	156.8
Volume final	17	136	272	408	544

- Répartir 17 µL de mix dans chaque puit
- Ajouter 5 µL d'ADN à 10 ng/µL dans chaque puit

ATTENTION *Si une colonne n'est pas pleine, déposer 22µl de tampon de contrôle ddPCR pour s'assurer que les gouttelettes se formeront. Ne jamais laisser de puits vides dans une colonne.*

- Sceller la plaque avec film plastique
- Vortexer puis centrifuger la plaque
- Enlever le film plastique

5.4 Scellage de la plaque

La plaque est scellée par un film en aluminium grâce au **Plate Sealer** (PX-1).

- **Allumer l'appareil** (bouton On/Off situé à l'arrière)
- **Sortir le portoir s'il est encore dans l'appareil**
- **Allumer le Plate Sealer** : il va monter en température jusqu'à 180 degrés (il met environ 5 secondes à monter en température)
- **Mettre en place le portoir dans le Plate Sealer**
- **Déposer la plaque de PCR** sur le portoir
- La recouvrir avec le **film, trait rouge visible vers le haut**
- **Appuyer sur la touche « Seal »** pour commencer le scellage : la porte se ferme et le scellage commence.

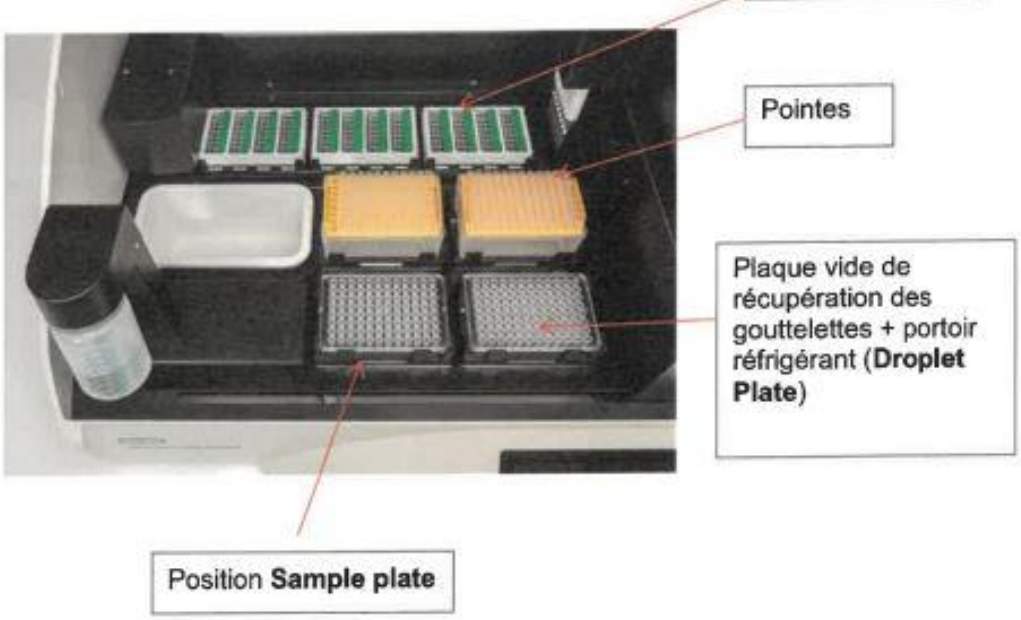
- Récupérer la plaque et sortir le portoir que l'on dépose à côté du Plate Sealer.

5.5 Production des gouttelettes

- **Brancher l'AutoDG.**

- **Ouvrir la porte**

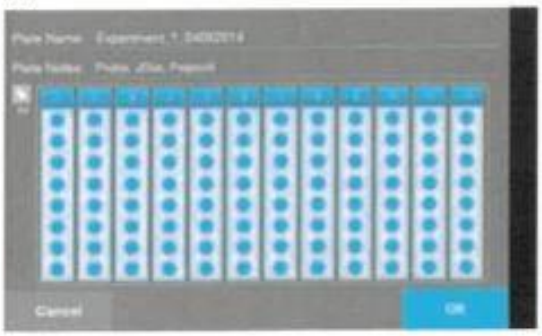
- Récupérer dans le congélateur le portoir réfrigéré et le déposer en position « Droplet Plate ». Déposer une plaque Biorad 96 puits vide dessus.



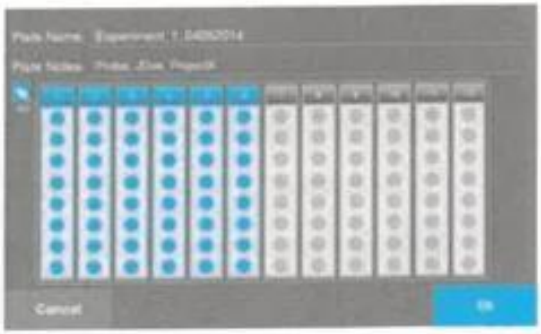
- Déposer la plaque scellée contenant les échantillons et les réactifs de PCR en position « Sample Plate ».

- Appuyer sur le bouton vert « *Configure Sample Plate* », et sélectionner le nombre de colonnes nécessaires.

A



B



- En fonction du nombre de colonnes sélectionnées, des voyants lumineux jaunes s'allument indiquant le nombre de consommables à charger sur l'instrument.
- Déposer **une ou deux boites de pointes** complètes après avoir retiré le couvercle.
- Déposer autant de **cartouches DG32** que nécessaire.
- Vérifier que l'huile AutoDG est bien chargée dans l'instrument, côté gauche. Sélectionner le type d'huile AutoDG dans l'onglet **Droplets for probes** : le type d'huile sélectionné est coloré en bleu.
- Lorsque tous les indicateurs de l'autoDG sont verts, **appuyer sur le bouton Bleu** « *Start Droplet Generation* ». La porte va se refermer automatiquement et l'instrument va s'initialiser.
- **Cliquer sur** « *Start Run* » pour lancer la génération des gouttelettes.
- L'écran indique alors le temps restant en fonction du nombre de colonnes chargées.
- Lorsque la production de gouttelettes est terminée, **sortir la plaque contenant les gouttelettes et la sceller comme précédemment dans les 30 minutes suivant la fin du cycle de préparation des gouttelettes.**
- **Procéder au nettoyage de l'AutoDG :**
    - Vider la poubelle et la rincer à l'eau puis à l'alcool à 70%.
    - Vider les boites de pointes, retirer les cartouches AutoDG. Retirer la plaque échantillons et la jeter.
    - Nettoyer à l'aide d'un chiffon imbibé d'alcool les différentes positions du plateau.

5.6 Amplification par PCR

Déposer la plaque scellée dans le **thermocycleur Veriti** et lancer le programme « JAK2 Digitale »

	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps	Vitesse de montée en température
Activation enzymatique	1	95	10 min	2 °C / s
Dénaturation	40	95	30 s	
Hybridation		54	1 min	
Désactivation enzymatique	1	98	10 min	
Stabilisation des gouttelettes	1	4	30 min	

Cette étape dure environ 2h15.

5.7 Lecture des gouttelettes

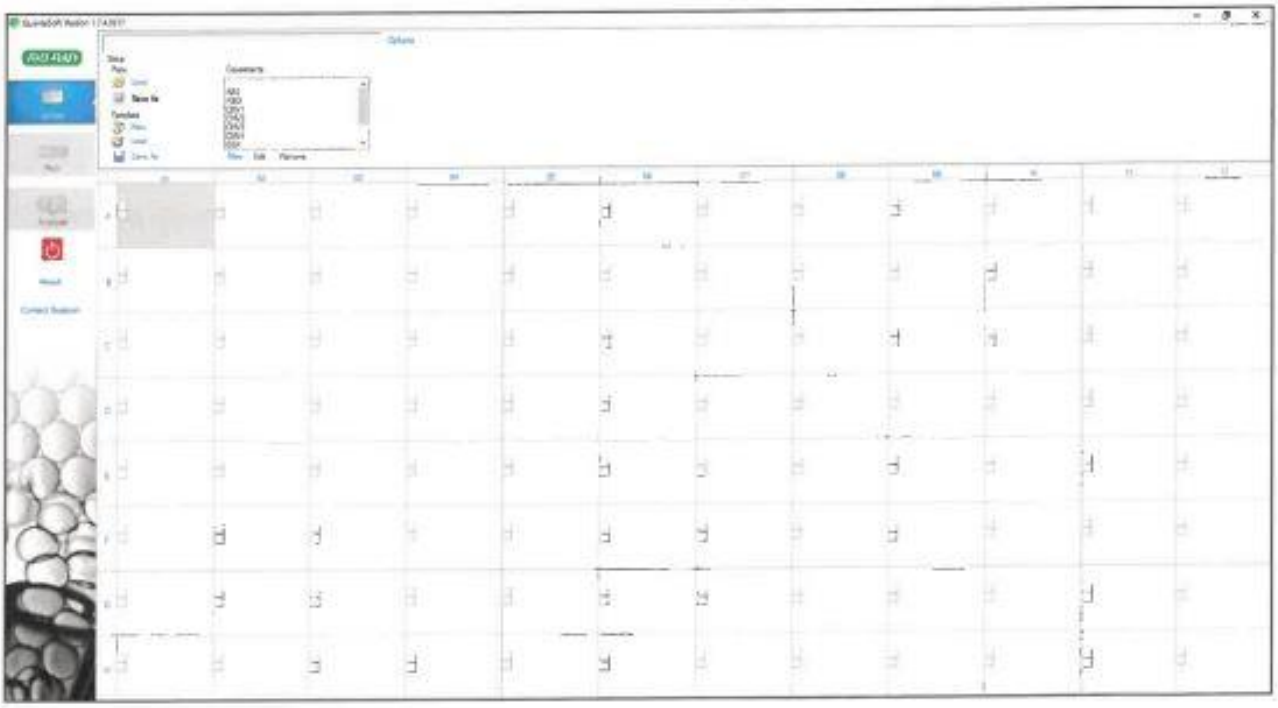
5.7.1 Paramétrage de la plaque

1. Allumer le QX 200 l'automate (bouton à l'arrière)
2. Allumer l'ordinateur : l'ordre d'allumage est important pour avoir accès à RUN

Le mot de passe de l'ordinateur (session User) est « ***QuantaLife*** »

- Ouvrir le logiciel Quantasoft : la fenêtre suivante s'ouvre

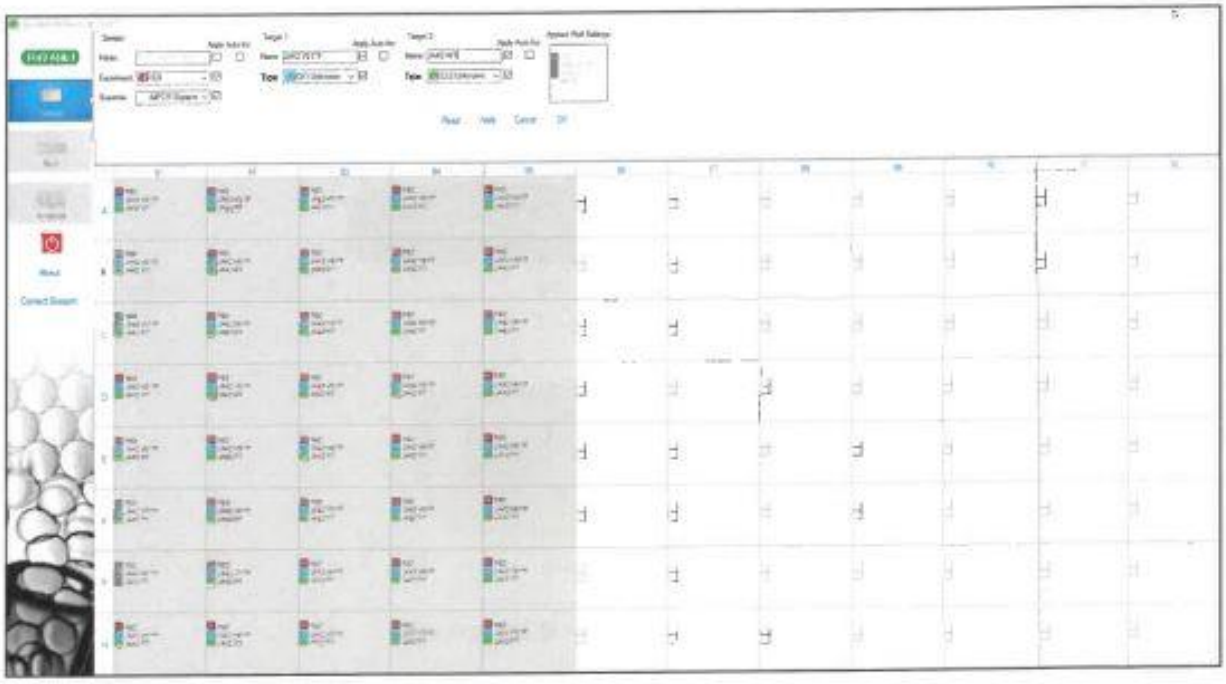
- Double-cliquer sur une case, la fenêtre suivante s'ouvre :



- Sélectionner les colonnes à lire

- Remplir le paramétrage comme ci-dessus :
  - Experiment : RED
  - Supermix : ddPCR Supermix for probes (no UTP)
  - Target 1 : JAK2 V617F, Ch1 Unknown
  - Target 2 : JAK2 WT, Ch2 Unknown

- Appuyer sur entrée



- Noter le nom des patients dans les cases correspondantes. Pour cela, double cliquer sur la ou les cases correspondantes (si plusieurs cases, cliquer sur CTRL en même temps.

- Renseigner l'identité du patient dans l'onglet « name » puis appuyer sur Enter ou Apply.

- Désélectionner les cases non utilisées (les mettre en Unused dans l'onglet Type)

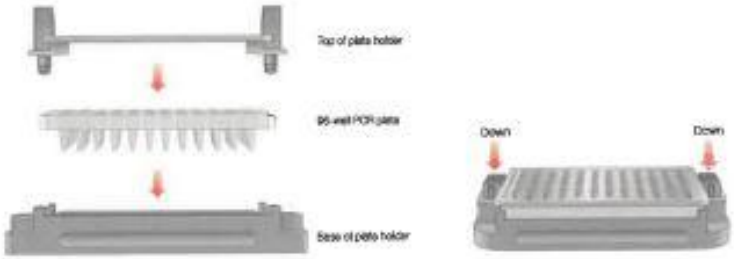
- Une fois tous les patients rentrés, sélectionner RUN (le logiciel va vous demander si vous voulez créer un template, cliquez sur OUI)

- Sauvegarder la plaque dans « HEMATOLOGIE » avec comme intitulé « JAK2 et date »

5.7.2 Lecture de la fluorescence

- Récupérer la plaque contenant les gouttelettes amplifiées à +4°C. La déposer dans l'automate. Pour cela, ouvrir la porte du QX200

- Ouvrir les clamps noirs et retirer la plaque métallique. Déposer sur le portoir noir la plaque échantillons et reposer la plaque métallique dessus.



- Clipser les clamps en position basse

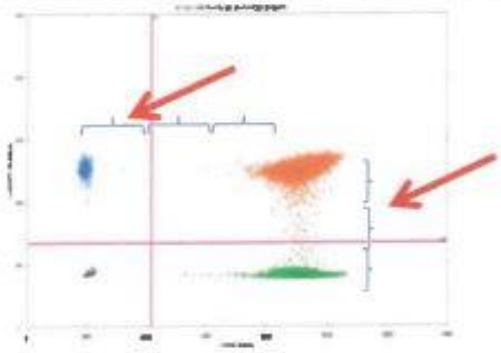
- Fermer la porte du QX200 en appuyant sur le bouton vert.
- Cliquez sur le bouton RUN (le logiciel va vous demander si vous voulez créer un template, cliquez sur OUI)
- Sauvegarder la plaque dans « HEMATOLOGIE » avec comme intitulé « JAK2 et date »
- Un message apparait : vérifier que « colonnes » et « Fam/Hex » sont bien sélectionnés. La lecture des gouttelettes commence

ATTENTION **Durant le run, ne pas utiliser l'ordinateur pour effectuer d'autres taches et éviter les vibrations autour du système**

5.8 Analyse

- Une fenêtre s'est ouverte pour vous avertir de la fin du run, cliquer sur OK
- Il faut vérifier que les puits correspondent aux critères d'acceptation (>10000 gouttes).
  - Dans le volet gauche sélectionner l'onglet Analyze
  - Sélectionner tous les puits
  - Cliquer sur le bouton Events et décocher la case Pos puis cocher la case Total
  - Tous les puits ayant moins de 10000 événements doivent être exclus de l'analyse finale
  - Enregistrer tous les puits à exclure

- **Mise en place du seuillage**
  - Cliquer sur le bouton « *2D Amplitude* »
  - Sélectionner tous les puits
  - Définir le seuil d'environ 1/3 entre les populations négatives et positives. Le graphique doit ressembler à la figure ci-dessous :



Réglage des seuils à l'aide de la souris : sélectionner les droites roses et les faire glisser selon les indications

  - Cliquer sur « *Options* » et cocher la case « *Fixed* » pour verrouiller les axes

- **Noter les valeurs de seuil** : elles sont dans les cases Ch1 et Ch2 en bas à gauche de l'écran. Les noter sur la feuille de travail.

- Vérifier sur les échantillons Eau et U937 que tous les points soient en dessous de la ligne horizontale

- Vérifier sur les autres puits que les seuils appliqués ne coupent pas les populations de gouttelettes.

5.9 Exportation des données

- Sélectionner tous les puits puis désélectionner les puits exclus (cliquer dessus tout en appuyant sur la touche Ctrl)

- Sélectionner « ***Single*** » dans la liste déroulante puis cliquer sur « ***Export CSV*** » pour enregistrer les puits fusionnés et de chaque puits dans un fichier .csv

- Récupérer ce fichier sur une clé USB.

  Tous les échantillons incluant plus d'un puits et ayant le même identifiant seront fusionnés numériquement au niveau du nombre de gouttelettes.

5.10 Analyse des résultats

- Sur les ordinateurs en salle d'analyse reliés à une imprimante, ouvrir le fichier csv préalablement sauvegardé sur la clé USB.

- La fenêtre suivante s'ouvre :

- Lancer la Macro « PCR Digitale JAK2 » en cliquant sur le bandeau en haut à gauche :

Les patients et les contrôles internes sont alors rangés par ordre alphabétique avec le nombre de copies par puits, le ratio allélique et le résultat.

	A	B	C	D	E	F	G
78	F06		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
79	G06		JAK2 V617F	0			
80	F06		JAK2 WT	11020	11040		
81	G06		JAK2 WT	11060			
82	D04		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
83	E04		JAK2 V617F	0			
84	D04		JAK2 WT	6740	6620		
85	E04		JAK2 WT	6500			
86	F03		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
87	G03		JAK2 V617F	0			
88	F03		JAK2 WT	9880	9930		
89	G03		JAK2 WT	9720			
90	F05		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
91	G05		JAK2 V617F	0			
92	F05		JAK2 WT	12020	12130		
93	G05		JAK2 WT	12240			
94	F07		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
95	G07		JAK2 V617F	0			
96	F07		JAK2 WT	11520	11480		
97	G07		JAK2 WT	11440			
98	B01		JAK2 V617F	1,6		0,02%	douteux
99	B01		JAK2 WT	9080			
100	A01		JAK2 V617F	3380		39,39%	positif
101	A01		JAK2 WT	5200			
102	F02		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
103	G02		JAK2 V617F	0			
104	F02		JAK2 WT	8780	8090		
105	G02		JAK2 WT	7920			
106	B03		JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
107	C03		JAK2 V617F	0			
108	B03		JAK2 WT	9280	9130		
109	C03		JAK2 WT	9020			
110	C01	U937	JAK2 V617F	0	0	0,00%	négatif
111	H07	U937	JAK2 V617F	0			
112	C01	U937	JAK2 WT	15160	7597		
113	H07	U937	JAK2 WT	34			

Imprimer ce document et rentrer les résultats et les ratios alléliques dans GLIMS.

Annexe 6 : Fiche technique PCR Digitale Biorad®

BIO-RAD

ddPCR Mutation Detection Assays, Single-Tube Format

Catalog #	Description
10049047	**ddPCR Mutation Detection Assay (FAM+HEX)**, 200 x 20 µl reactions
10049048	**ddPCR Mutation Detection Assay (FAM+HEX)**, 1,000 x 20 µl reactions
10049049	**ddPCR Mutation Detection Assay (FAM+HEX)**, 2,500 x 20 µl reactions
12005579	**ddPCR Mutation Detection Assay (Cy5+Cy5.5)**, 200 x 20 µl reactions
12005580	**ddPCR Mutation Detection Assay (Cy5+Cy5.5)**, 1,000 x 20 µl reactions
12005581	**ddPCR Mutation Detection Assay (Cy5+Cy5.5)**, 2,500 x 20 µl reactions

For research purposes only.

Description

ddPCR Mutation Detection Assays are expertly designed specifically for Droplet Digital PCR (ddPCR) using proprietary computational algorithms. These assays have not been wet-lab validated by Bio-Rad. Performance of these assays should be validated prior to use. Mutant target and wild-type assays are mixed together and provided in a single tube, with either FAM targeting the mutant allele and HEX targeting the wild-type allele or Cy5 targeting the mutant allele and Cy5.5 targeting the wild-type allele. The QX200 ddPCR System can be used with FAM and HEX assays; the QX ONE ddPCR System works with FAM, HEX, Cy5, and Cy5.5 fluorophores.

Ordering Information

The ddPCR assays can be ordered online at bio-rad.com/digital-assays.

Storage and Stability

The ddPCR assays are stable for 12 months when stored at 4°C protected from light. The assay mix can be kept at –20°C for long-term storage.

Kit Contents

The ddPCR Mutation Detection Assay is a 20x concentrated, ready-to-use primer-probe mix optimized for use with ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (FAM+HEX and Cy5+Cy5.5 Assays) or ddPCR Multiplex Supermix (Cy5+Cy5.5 Assays). Each kit comes with 200, 1,000, or 2,500 µl of the 20x assay mix (18 µM primers and 5 µM each probe), sufficient for 200, 1,000, or 2,500 x 20 µl reactions, respectively.

Reagents and Equipment

For assays using the QX200 ddPCR System (#1864002) or Automated Droplet Generator (#1864141)

- ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (catalog #1863023, #1863024, #1863025)
- Single and multiplex ddPCR Mutation Detection Assays using FAM and HEX fluorophores
- C1000 Touch Thermal Cycler with 96–Deep Well Reaction Module (#1851197)
- PX1 PCR Plate Sealer (#1814000)

For assays using the QX ONE ddPCR System (#12006536)

- ddPCR Multiplex Supermix (#12005909, #12005910, #12005911)
- Single and multiplex ddPCR Mutation Detection Assays using FAM, HEX, Cy5, and Cy5.5 fluorophores
- PX1 PCR Plate Sealer (#1814000)

Please refer to the QX200 Droplet Generator, QX ONE ddPCR System, or Automated Droplet Generator instruction manuals (#10031907, #12007493, or #10043138, respectively) for ordering information on consumables such as oils, cartridges, gaskets, plates, and seals.

Determination of Optimal Annealing Temperature

Newly designed ddPCR Mutation Detection Assays should be run across a thermal gradient (50–60°C), to determine the annealing/extension temperature that optimizes separation between positive and negative droplets while minimizing rain (droplets that fall between the major positive and negative populations). If possible, an annealing/extension temperature that optimizes performance of both target and wild-type assays should be selected.

- Using a sample containing both mutant and wild-type alleles as template, prepare reaction mix for at least eight wells (one 96-well plate column) according to the guidelines in Table 2 or Table 3
- For optimal performance, follow recommendations on pages 2–3 for restriction digestion and ddPCR reaction setup
- After droplet generation, proceed to thermal cycling on a C1000 Touch Thermal Cycler with 96–Deep Well Reaction Module (#1861197) or QX ONE ddPCR System (#12006536). Use an annealing temperature gradient as described in Table 1
- Optimum annealing temperature range is determined based on the separation between the four clusters
  - Figure 1, QX200 ddPCR System or Automated Droplet Generator
  - Figure 2, QX ONE ddPCR System
- For more information, see the Rare Mutation Detection Best Practices Guide (bulletin 6628)
- Run several no template control (NTC) wells

Table 1. Thermal gradient cycling conditions for determination of optimal annealing/extension temperature.*

Cycling Step	Temperature, °C	Time	Ramp Rate	Number of Cycles
Enzyme activation	95	10 min	2°C/sec** (Note: Ramp rate option not available for gradient step)	1
Denaturation	94	30 sec		40
Annealing/extension	50–60	1 min		
Enzyme deactivation	98	10 min		1
Hold (optional)**	4	Infinite		1

* Use a heated lid set to 105°C and set the sample volume to 40 µl.
** QX ONE thermal cycling protocols do not require a hold step and ramp rate is preset.

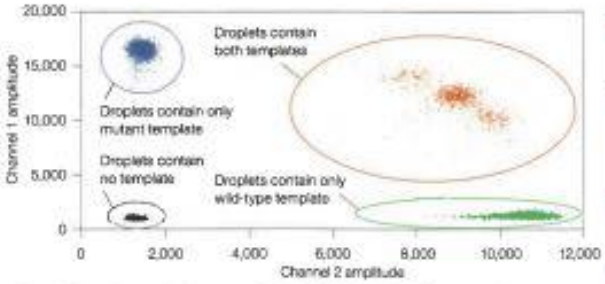


Fig. 1. Two-dimensional scatterplot of QX200 ddPCR System data demonstrating the four clusters obtained with a mutant (FAM) and wild-type (HEX) allele.

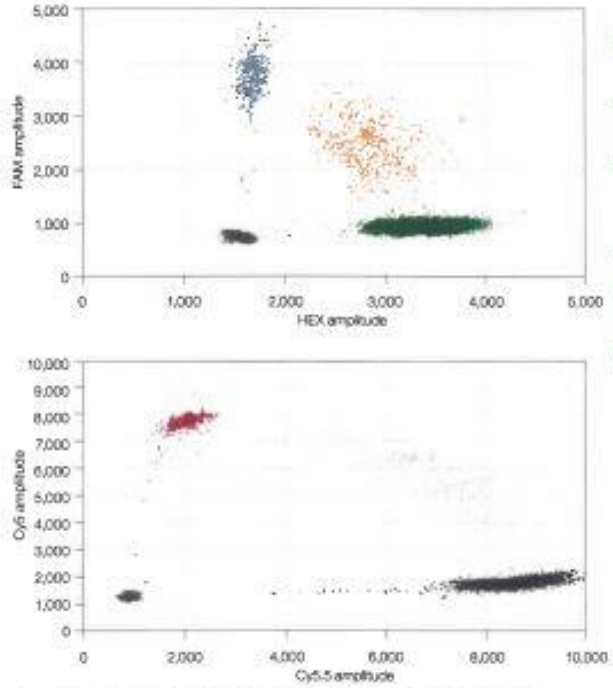


Fig. 2. Two-dimensional scatterplot of QX ONE ddPCR System data demonstrating the eight clusters obtained from samples with mutant and wild-type alleles at two loci. Top: mutant (FAM), wild-type (HEX). Bottom: mutant (Cy5), wild-type (Cy5.5)

Restriction Enzyme Digestion of Sample DNA

DNA fragmentation by restriction digestion prior to droplet generation improves accuracy by separating tandem gene copies, reducing sample viscosity, and improving template accessibility. Two strategies may be used to perform restriction digestion of DNA samples: digestion directly in the ddPCR reaction during setup (recommended) or conventional digestion prior to ddPCR.

Digestion Directly in ddPCR Reaction

- Efficient digestion of sample DNA can be achieved by direct addition of restriction enzyme to the ddPCR reaction
- 2–5 units of restriction enzyme per ddPCR reaction are recommended
- Dilute the restriction enzyme using the recommended diluent buffer according to the manufacturer's instructions, then add 1 µl to the ddPCR reaction according to the guidelines in Table 2 or Table 3
- Reactions can be set up at room temperature; no additional incubation time is required
- The addition of restriction enzyme buffers with high salt content can inhibit ddPCR and should be avoided

Digestion Prior to ddPCR

- Restriction enzyme digestion can be carried out as a separate reaction before ddPCR reaction setup
- Use 10–20 units of restriction enzyme per microgram of genomic DNA
- Incubate the reaction for 1 hr at the temperature recommended for the restriction enzyme
- Heat inactivation is not required but can be considered if long-term storage is required; do not heat inactivate above 65°C
- DNA purification is not necessary after restriction digestion
- Use a minimum tenfold dilution of the digest to reduce the salt content of the sample in ddPCR
- Store digested DNA at –20°C or below

© 2019 Bio-Rad Laboratories, Inc.

10000050422

Data Acquisition and Analysis

Note: See QX ONE Software instructions for droplet reading and data analysis with the QX ONE ddPCR System.

1. After thermal cycling, place the sealed 96-well plate in the QX200 Droplet Reader.
2. Launch the appropriate software to set up a new plate layout according to the experimental design.
3. Under Setup, double click on a well in the plate layout to open the Well Editor dialog box.
4. Designate the sample name, experiment type, supermix type, target name(s), target type(s), and reference.
5. Select **Apply** to load the wells and, when finished, select **OK**.
6. Once the plate layout is complete, select **Run** to begin the droplet reading process. Select the appropriate dye set and run options when prompted.
7. After data acquisition, select samples in the well selector under Analyze. Set appropriate threshold for the ddPCR Mutation Detection Assay. For more detailed information about setting thresholds, please refer to the Rare Mutation Detection Best Practices Guide (bulletin 6628).
8. The concentration reported is copies/µl in the final 1x ddPCR reaction.

Visit bio-rad.com/DropletDigitalPCRAssays for more information.

BIO-RAD, DDPCR, DROPLET DIGITAL PCR, and QX ONE are trademarks of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions.

Purchase of Digital PCR products from Bio-Rad Laboratories includes a limited, non-transferable right under our intellectual property for you to use the products for your internal research purposes only. Unless we expressly state otherwise in additional Terms and Conditions, no rights are granted for you to distribute or resell the products or to use the products for commercial applications, such as contract services or fee for services. No rights are granted for diagnostic uses. Information concerning a license for such uses can be obtained from Bio-Rad Laboratories. It is the responsibility of the purchaser/end user to acquire any additional intellectual property rights that may be required. The QX ONE, QX200, and QX200 AutoDG Droplet Digital PCR Systems and/or their use is covered by claims of U.S. patents, and/or pending U.S. and non-U.S. patent applications owned by or under license to Bio-Rad Laboratories, Inc. See bio-rad.com/en-us/trademarks for details.

All trademarks used herein are the property of their respective owner.

Bio-Rad Laboratories, Inc.
2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547
1-800-424-6723

10000050422 Ver C 19-0664 1119

Serment de Galien

Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes

Serment de Gallen

« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

DUPRAT Manon

Mise en place de la détection de la mutation JAK2 V617F en PCR Digitale

Filière : Biologie médicale

Résumé

La polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive constituent le groupe des néoplasies myéloprolifératives Philadelphie négatives. Ce sont des hémopathies malignes chroniques associées à des anomalies génétiques acquises qui confèrent aux cellules souches hématopoïétiques un avantage de prolifération et de survie Selon la nouvelle classification OMS 2016, leur diagnostic repose sur plusieurs critères dont la présence de la mutation V617F du gène JAK2. Actuellement au CHU de Saint Etienne, la recherche et la quantification de la mutation JAK2 V617F est effectuée en PCR quantitative. L'objectif principal de cette étude a été de mettre en place une nouvelle technique de PCR digitale pour la détection de la mutation JAK2 V617F pour ensuite faire la demande de son accréditation. En effet, depuis 2008, l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 est obligatoire. Pour cela, les laboratoires doivent préparer des dossiers de vérification/validation de méthode en s'appuyant sur différents documents proposés par le COFRAC comme le SH GTA 04 qui a été utilisé comme trame pour ce travail. La PCR digitale consiste à répartir l'échantillon dans un grand nombre de compartiments soit sous forme de microchambes sur puce soit sous forme de micro-gouttelettes aqueuses en suspension dans un fluide non aqueux. C'est cette dernière technologie que nous avons mise en place grâce au générateur de gouttelettes QXDx 200 de Biorad®. Nous avons dans un premier temps réalisé une optimisation du protocole opératoire qui nous a permis de travailler dans les conditions optimales avec : 1.1µL d'amorce et 50 ng d'ADN par puits de réaction ainsi qu'à une température d'hybridation de 54°C. Les résultats de répétabilité, de fidélité intermédiaire, d'exactitude et d'incertitude de mesure sont revenus conformes aux exigences du laboratoire et aux données de la littérature. La dPCR a montré de très bonnes valeurs de sensibilité et spécificité avec respectivement 0.985 et 0.976. Les tests pour évaluer la limite de détection nous ont permis d'obtenir une valeur de 0.01% ce qui est 10 fois plus faible que la technique de qPCR. En parallèle de ces travaux pour la réalisation du dossier de validation de méthode, nous avons passé 30 patients avec antécédent de thrombose qui étaient sortis négatifs en qPCR. Aucun de ces patients n'a présenté de signal positif en dPCR. Pour finir, nous avons passé 26 patients pour lesquels la qPCR avait donné un ratio allélique très faible (0.02% en moyenne) en dessous du seuil de détection. Parmi ces derniers, 17% ont présentés un signal positif en dPCR. Nous avons également réalisé une étude médico-économique qui a montré que la dPCR est 4 fois moins onéreuse que la qPCR. Pour la détection de la mutation JAK2 V617F, nous avons donc remplacé la qPCR par la dPCR qui possède de meilleures performances analytiques en plus d'être une technique moins longue et moins couteuse.

Mots clés

JAK2	PCR Digitale
V617F	Validation de méthode

Jury

M. MOSSUZ Pascal - Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Mme. CAMPOS Lydia - Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Mme. FLANDRIN-GRESTA Pascale - Praticien Hospitalier
Mme TONDEUR Sylvie - Praticien Hospitalier

Date de soutenance

27 Avril 2021

Adresse de l'auteur

5 rue du stade 69360 Saint Symphorien d'Ozon