

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par
Mariana TSVETANOVA

Présentée et soutenue publiquement le 27/10/2011

**LA DEMARCHE D'ACCREDITATION
D'UN LABORATOIRE DE GENETIQUE PRIVE
SELON LA NORME NF EN ISO 15189**

Président :

Mme Françoise BALLEREAU, Professeur de Pharmacie clinique et Santé Publique

Membres du jury :

M. Christos ROUSSAKIS, Professeur de Biologie cellulaire et de Génétique moléculaire

Professeur Jean-Paul MOISAN, Directeur de laboratoire IGNA/LGNA

Mme Odile HERBERT, Responsable technique de LGNA

Table des Matières

GLOSSAIRE.....	4
I INTRODUCTION.....	6
II ORGANISATION DE LGNA AU SEIN D'IGNA.....	7
1 Diagnostic de maladies monogéniques.....	9
2 Diagnostic de maladies multifactorielles.....	9
3 Etude de polymorphismes génétiques en pharmacogénétique.....	10
III CONTEXTE REGLEMENTAIRE, NORMATIF ET DE SANTE PUBLIQUE DES ANALYSES DE GENETIQUE.....	11
1 Contexte de Santé Publique.....	11
2 Contexte réglementaire.....	12
3 Contexte normatif.....	13
IV LA DEMARCHE D'ACCREDITATION.....	15
1 Définitions et approches qualité employés.....	15
1.1 Terminologie.....	15
1.2 Approches qualité.....	17
2 Lecture de la norme ISO 15189 et interprétations.....	18
1.1 Exigences management.....	19
1.2 Exigences techniques.....	21
3 Organisation du travail.....	23
3.1 Tableau de bord.....	23
3.2 Rétroplanning.....	23
3.3 Intégration dans le SMQ.....	25
4 Construction et mise en place du Système de Management de la Qualité.....	26
4.1 Politique Qualité.....	26
4.2 Cartographie des processus.....	27
4.2.1 Processus Management.....	28
4.2.2 Processus de réalisation « Etudes des variations génétiques ».....	29
4.2.3 Processus Supports.....	29
4.3 Manuel Qualité.....	30
4.4 Organigramme.....	32
4.5 Maîtrise des documents.....	33
4.5.1 Etat des lieux.....	35
4.5.2 Méthodologie.....	37
4.5.3 Gestion des documents.....	38
4.6 Maîtrise des non-conformités. Actions correctives et préventives.....	49
4.6.1 Etat des lieux.....	50
4.6.2 Méthodologie.....	50
4.6.3 Gestion des NC.....	51
4.7 Audit.....	56
4.7.1 Préparation de l'audit.....	57
4.7.2 Réalisation de l'audit.....	58
4.7.3 Rapport de l'audit.....	58
4.8 Amélioration continue.....	58
4.8.1 Création et suivi des indicateurs.....	59
5 Interprétation des résultats de pharmacogénétique en réponse à l'exigence de la norme « 4.7 Prestations de conseil ».....	61
5.1 Polymorphisme génétique du gène TPMT et traitement par Azathioprine.....	63

5.2 Polymorphisme génétique du gène <i>DPYD</i> et traitement par 5-Fluorouracile	65
5.3 Polymorphisme génétique du gène <i>UGT1A1</i> et traitement par Irinotécan.....	69
5.4 Polymorphisme génétique du gène <i>MTHFR</i> et traitement par 5-Fluorouracile et <i>Méthotrexate</i>	76
5.5 Polymorphisme génétique du gène <i>CDA</i> et traitement par Gemcitabine	80
5.6 Polymorphisme génétique des gènes <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>SULT1A1</i> , <i>UGT2B15</i> et traitement par Tamoxifène	84
6 Validation de la méthode analytique de discrimination allélique	88
6.1 Etat des lieux	90
6.2 Méthodologie	95
7 Difficultés rencontrés.....	96
V CONCLUSION ET OUVERTURES A LA DISCUSSION	97
ANNEXES	99
BIBLIOGRAPHIE	122

GLOSSAIRE

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CAPA : (ACP) : Action Corrective Préventive

CDA : Cytidine désaminase

COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation

CYP : Cytochrome P450

DON : Donnée

DPYD : Dihydropyrimidine déshydrogénase

GED : Gestion électronique des documents

HPST : Loi relative à l'Hôpital, aux Patients, à la Santé et aux Territoires

IC : Indice de criticité

IGNA : Institut Génétique Nantes Atlantique

IMP : Imprimé

ISO : International Standard Organisation

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LGNA : Laboratoire Génétique Nantes Atlantique

ML : Métaboliseur Lent

MO : Mode Opérateur

MQ : Manuel Qualité

MR : Métaboliseur Rapide

MTHFR : Méthylènetetrahydrofolate réductase

MUR : Métaboliseur Ultra Rapide

NC : Non-conformité

PCR : Polymerase Chain Reaction

PR : Procédure/Processus

RQ : Responsable qualité

SMQ : Système de Management de la Qualité

SULT1A1 : Sulfotransférase 1A1

TPMT : Thiopurine S-méthyltransférase

UGT : Uridine-diphosphatase glucuronosyltransférase

5-FU : 5-fluorouracile

I INTRODUCTION

Dans le cadre de la validation de ma sixième année de Pharmacie, j'ai choisi d'effectuer mon stage de neuf mois dans un laboratoire d'analyses génétiques à Nantes. IGNA est un laboratoire de génétique médico-légal.

En 2003, dans le cadre des lois Allègre (loi sur l'innovation), un accord tri partite est signé entre l'hôpital, l'université et le professeur Moisan pour permettre la création de l'Institut Génétique Nantes Atlantique. Cinq experts et un pharmacien biologiste sont les fondateurs. Vingt et une personnes issues du CHU (experts, techniciens, personnel administratif...) ont rejoint IGNA/LGNA entre juillet et janvier 2004. Actuellement, l'établissement comprend 65 personnes qui travaillent dans cette structure commune et contribuent à la performance de l'analyse génétique et à la qualité des prestations fournies.

Au sein de ce même établissement deux structures juridiques se distinguent.

LGNA est un laboratoire de biologie médicale qui travaille avec les hôpitaux et les cliniques privées pour fournir des prestations d'analyses génétiques. IGNA travaille avec tous les tribunaux de France et réalise les empreintes génétiques, les empreintes digitales, la morphoanalyse des traces de sang et l'analyse des supports informatiques destinés aux services de la justice.

La qualité a beaucoup évolué pendant les dernières années. Depuis 1987, l'assurance qualité s'appuie sur les exigences des normes internationales ISO 9000. La certification selon ces normes traduit la reconnaissance de la conformité des processus.

Depuis 2002, l'assurance qualité devient système de management de la qualité. ISO 9001 est une certification qui démontre l'efficacité des processus. L'exigence est l'amélioration continue. La mise en œuvre d'un système de management de la qualité est un outil de management qui permet l'amélioration de l'organisation et de fonctionnement d'un établissement.

L'accréditation prouve la compétence et prend en compte la technique, ainsi que le personnel. Il s'agit de la qualification de personnel, la calibration du matériel, la validation des méthodes...

Dans ce cadre IGNA a été accrédité selon la norme ISO 17025.

L'accréditation des LBM (Laboratoires de Biologie Médicale) est un sujet d'actualité et suscite de nombreuses interrogations parmi les professionnels de santé. En effet, la loi HPST (réforme relative à l'Hôpital, aux Patients, à la Santé et au Territoires) rend obligatoire l'accréditation de tous les LBM. Dans ce contexte, mon objectif pendant le stage a été de mettre en place les dispositifs nécessaires afin de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189.

C'est avec grand enthousiasme que j'ai accepté de traiter le sujet et de contribuer à la démarche d'accréditation de LGNA.

Pendant mon stage, d'une part j'ai mis en place les dispositifs nécessaires pour répondre aux exigences de la norme. C'est une phase de travail qui a nécessité des connaissances dans le domaine du management de la qualité. D'autre part j'ai réalisé une activité de recherche bibliographique et d'interprétation. Cette phase de travail a nécessité l'application de mes connaissances dans le domaine de la pharmacie. La pharmacogénétique est une discipline qui fait le lien entre la génétique et les médicaments. Compte-tenu du fait que la norme ISO 15189 précise que les laboratoires d'analyses médicales doivent prodiguer un conseil sur les résultats qu'ils rendent aux prescripteurs ou directement aux patients, mon rôle de pharmacien a porté sur l'analyse des voies métaboliques et sur l'individualisation des traitements des patients, dont la variation du métabolisme a des causes génétiques.

II ORGANISATION DE LGNA AU SEIN D'IGNA

LGNA est un laboratoire d'analyses médicales qui propose actuellement le diagnostic de plusieurs maladies génétiques par l'analyse de nombreux gènes. En rapport avec l'avancement rapide de la médecine personnalisée, LGNA propose des prestations d'analyse de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments avec une marge thérapeutique étroite et permet ainsi le diagnostic des sujets métaboliseurs lents, rapides et ultra-rapides.

La génétique moléculaire est la discipline qui a permis l'analyse directe de l'ADN. Les examens de génétique moléculaire (tests génétiques) ont plusieurs applications médicales :

- Diagnostic des maladies héréditaires à transmission mendélienne,
- Diagnostic prénatal,
- Détermination des facteurs héréditaires de prédisposition à certaines maladies,
- Dépistage néonatal,
- Dépistage des hétérozygotes dans la famille de sujets atteints ou dans les populations à risque élevé,
- Pharmacogénétique.

Les maladies génétiques représentent une part importante de la charge en médecine clinique. Or, certaines d'entre elles peuvent bénéficier d'un diagnostic génétique en déterminant l'anomalie située dans l'ADN. Il est ainsi possible de :

- confirmer le diagnostic suspecté,
- proposer un conseil génétique au sein de la famille,
- débiter une prise en charge thérapeutique précoce et/ou préventive, en particulier dans le cas des maladies à révélation tardive.

Nous pouvons distinguer plusieurs applications possibles des analyses de génétique :

- Le conseil génétique dans le cadre de maladies monogéniques,
- La médecine prédictive pour l'évaluation des facteurs de risques d'origine génétique dans les maladies multifactorielles (maladies cardiovasculaires, obésité, diabète...),
- L'étude des prédispositions aux cancers,
- La pharmacogénétique : l'étude de polymorphisme génétique.

La génétique moléculaire permet de révéler des maladies héréditaires au sens mendélien du terme, caractérisées par le fait que les anomalies d'un seul gène sont nécessaires et suffisantes pour provoquer un état pathologique.

Les maladies multifactorielles sont une conjonction de mutations génétiques, de facteurs dits environnementaux et de facteurs comportementaux.

1 Diagnostic de maladies monogéniques

Il s'agit dans ce cas d'analyser chez une famille, dans laquelle une maladie génétique est récurrente, le gène impliqué. Le but est de savoir si un individu est porteur ou non de la mutation familiale. Cela passe en général par l'analyse du patient malade afin de révéler chez lui l'anomalie génétique que l'on recherchera alors chez ses apparentés. C'est le cas des maladies ci-dessous, pour lesquelles un diagnostic peut être réalisé.

- Mucoviscidose,
- Thalassémies et drépanocytose,
- Hémochromatose,
- Facteurs Leiden (II et V) et MTHFR pour la coagulation,
- Glaucome,
- Rétinite pigmentaire.

2 Diagnostic de maladies multifactorielles

Il s'agit d'un axe de développement très prometteur de la génétique médicale. En effet, de nombreuses maladies, non considérées comme génétiques au sens mendélien, comme l'hypertension, le risque d'infarctus du myocarde, certains cancers, l'obésité, le diabète.....etc. ont une composante génétique plus ou moins importante. Il existe donc, à côté des facteurs de risque environnementaux (nourriture, activité physique, consommation de toxiques, pollution, virus, parasites...etc.), des risques génétiques. Ces risques génétiques ne vont pas automatiquement aboutir à la pathologie, mais sous certaines conditions environnementales, vont donner au patient qui en est porteur, une propension accrue à développer cette maladie.

Il est donc important, dans un but préventif, de détecter ces facteurs de risque génétiques.

Un exemple d'une maladie multifactorielle dont l'analyse génétique peut être réalisée est la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

3 Etude de polymorphismes génétiques en pharmacogénétique

LGNA a développé son activité de pharmacogénétique car l'intérêt est très croissant.

La pharmacogénétique est une application de la génétique qui vise à évaluer la manière dont un individu va métaboliser un médicament. En d'autres termes, il s'agit de la variabilité des réponses aux médicaments en raison du polymorphisme génétique.

Un individu porte deux allèles d'un même gène, identiques ou différents. Ces gènes peuvent présenter des variations de deux types : les polymorphismes de répétition et ceux atteignant un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Les SNPs sont des mutations ponctuelles qui aboutissent à des défauts de fonction ou à des gains de fonction.

Quand la mutation affecte les deux allèles du gène, les sujets sont qualifiés d'homozygotes mutés. Quand la mutation affecte un seul allèle, les sujets sont qualifiés d'hétérozygotes. Dans le cas où il n'y a pas de mutation sur les deux allèles du gène étudié, le sujet est homozygote normal. Les effets de la mutation sont plus accentués quand les deux allèles du gène sont mutés.

Les polymorphismes des enzymes du métabolisme et du transport des médicaments permettent de distinguer les ML (défaut d'activité), les MR (activité normale) et les MUR (activité excessive). Les métaboliseurs lents pour une enzyme ont un déficit en cette enzyme et donc une métabolisation moindre. Généralement quand la molécule administrée est sous forme active, les ML présentent une accentuation des effets indésirables. Les métaboliseurs ultra-rapides ont un métabolisme accéléré ce qui provoque un échappement thérapeutique quand la molécule active est la molécule administrée telle quelle.

Pour qualifier une variation génétique de polymorphisme, la notion de fréquence intervient. L'allèle le moins fréquent devant être présent dans au moins 1% de la population.

En effet, en fonction des variations génétiques touchant divers gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments (comme ceux codant les enzymes de détoxification), nous sommes inégaux devant une prise de médicaments: certains vont les métaboliser rapidement, d'autres très lentement. Ainsi, une dose efficace mais sans effets secondaires devra être adaptée et définie pour chacun en fonction de son background génétique.

LGNA s'intéresse essentiellement à la pharmacologie des traitements de chimiothérapie des cancers et propose ainsi l'analyse du polymorphisme des gènes CYP2D6, DPYD, MTHFR, UGT1A1 et CDA. D'autres tests sont en cours de mise au point.

Ces gènes sont également impliqués dans le métabolisme de médicaments destinés à d'autres thérapeutiques (cardiologiques, antidépresseurs....) et peuvent donc être étudiés dans d'autres contextes que le cancer.

Les analyses de pharmacogénétique permettent, avant l'administration de traitement, d'identifier les individus à risque, et à modifier et/ou d'adapter au statut génétique des patients, la prescription et les modalités de surveillance du traitement.

III CONTEXTE REGLEMENTAIRE, NORMATIF ET DE SANTE PUBLIQUE DES ANALYSES DE GENETIQUE

1 Contexte de Santé Publique

Parmi les analyses de génétiques, la pharmacogénétique est en plein essor, ceci en relation avec le développement de la médecine personnalisée.

« Le bon médicament, à la bonne personne au bon moment » (George Post. Pharmacogenomics : Revolution or Reaction ? Genetic Variation in Drug Development, 1998. Nature Biotechnology 16).

La pharmacogénétique est apparue pour répondre à l'étude des effets indésirables des médicaments qui seraient responsables de 100 000 décès par an aux Etats-Unis dont la moitié seulement correspondrait à un mauvais emploi. En France 20 % des malades admis dans un service d'urgence le sont pour ce type d'accident (1).

Les polymorphismes génétiques expliquent une partie des accidents médicamenteux parce que certains variants alléliques des gènes codant pour des enzymes, des cibles ou des transporteurs intervenant dans le métabolisme des médicaments sont associés à des gains ou des pertes de fonction.

Le polymorphisme génétique touche des gènes qui sont impliqués dans le métabolisme d'environ 30% des médicaments (2).

Généralement les facteurs génétiques sont responsables de 15%-30% de la variabilité du métabolisme et de la réponse aux médicaments. Pour certains, les facteurs génétiques peuvent être impliqués à 95% (3, 4, 5).

Le métabolisme des médicaments a lieu essentiellement dans le foie et est sous le contrôle des enzymes de phase I, incluant de nombreuses isoformes du cytochrome P450 (CYP450), qui rendent les molécules plus polaires par hydroxylation, et des enzymes de phase II qui catalysent des réactions de conjugaison. Les CYP450 assurent 80% des réactions d'oxydation. Les polymorphismes les plus étudiés sont ceux de CYP2D6 et CYP2C9 parce qu'ils concernent un grand nombre de médicaments et affectent des fractions importantes de la population générale.

Les analyses de pharmacogénétique permettent une meilleure prise en charge des patients et contribuent à la diminution des coûts des dépenses en médicaments de l'assurance maladie.

2 Contexte réglementaire

Les analyses de génétiques, appelées aussi des « tests génétiques » font l'objet en France d'une réglementation encadrée.

La réglementation de la génétique moléculaire en France tient ses fondements des lois cadres de bioéthique du 29 juillet 1994 et du 6 août 2004, le décret du 23 juin 2000 relatif aux conditions de prescription et de réalisation des examens génétiques, la loi Kouchner du 4 mars 2002 relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé et la loi relative à la santé publique du 9 août 2004. L'ensemble de ces règles juridiques est rassemblé dans le code civil, le code pénal et le code de la santé publique.

Le consentement éclairé est une pièce obligatoire à fournir, ainsi qu'une prescription médicale. Le patient ne peut donc pas demander une analyse génétique directement au laboratoire d'analyses. Ce qui pose problème aujourd'hui c'est que cette réglementation n'est pas valable dans tous les pays. En parallèle avec les tests d'analyses génétiques qui respectent les conditions légales, se développent sur internet des tests effectués pour convenance personnelle. Le problème majeur est le manque d'accompagnement médical lors de la prise de connaissance des résultats, ce qui peut avoir de lourdes conséquences sur le sujet. Le rôle du conseil génétique est justement la transmission d'une information juste au patient, en faisant la différence entre un risque et une certitude, ainsi que d'une prise en charge éventuelle et un suivi.

En règle générale, dans le cadre d'un dépistage de prédisposition individuelle, le résultat n'indique qu'un risque relatif très faible. La plupart des maladies communes sont l'addition

de multiples facteurs de risque, dont ceux liés à l'environnement. En revanche, les données pharmacogénétiques peuvent être très utiles. Les renseignements individuels, issus d'un génotypage des gènes des polymorphismes, peuvent être utiles tout au long de la vie pour choisir au mieux les traitements et ajuster les posologies. Grâce au développement de nouvelles techniques comme les puces à ADN, les laboratoires peuvent permettre de génotyper un grand nombre de polymorphismes à des coûts relativement bas.

Les résultats des tests génétiques sont une information qui est soumise au respect de secret médical. Il existe une interdiction de leur utilisation à des fins discriminatoires.

3 Contexte normatif

Les tests génétiques doivent faire l'objet d'une validation pour assurer la qualité des résultats fournis aux prescripteurs. Dans ce contexte, l'article 69 de la loi n° 2009-879 du 21 juillet 2009 rend obligatoire l'accréditation des LBM.

Cette loi vise à :

- Harmoniser les dispositions applicables aux laboratoires de biologie médicale publics et privés ;
- Mieux garantir la qualité des examens de biologie médicale, notamment en mettant en place une procédure d'accréditation des laboratoires ;
- Définir les missions du biologiste, du laboratoire de biologie médicale et du personnel technique dans le cadre du parcours de soins du patient, en assurant l'efficacité des dépenses de santé ;
- Instituer les mesures permettant d'assurer la pérennité de l'offre de biologie médicale dans le cadre de l'organisation territoriale de l'offre de soins ;
- Eviter les conflits d'intérêts et garantir l'autorité du biologiste responsable sur l'activité du laboratoire de biologie médicale ;
- Adapter les missions et prérogatives des agents habilités à effectuer l'inspection des laboratoires de biologie médicale ;
- Adapter le régime des sanctions administratives et pénales.

Accréditer c'est « faire reconnaître officiellement quelqu'un pour lui donner autorité en tant que ». La philosophie de la loi HPST consiste à intégrer totalement la biologie médicale dans le parcours de soins. L'objectif est de prendre en compte tout le processus en partant du prélèvement jusqu'à la communication des résultats au prescripteur et non seulement l'analyse en elle-même.

L'organisme compétent pour délivrer cette accréditation en France est le Comité français pour l'accréditation (COFRAC) et le référentiel support de l'accréditation est la norme NF EN ISO 15189.

L'accréditation des LBM est une démarche volontaire permettant une évaluation, par une tierce partie indépendante, du système qualité mis en place associé à la compétence technique du laboratoire. La procédure d'accréditation telle qu'elle peut être assurée par l'organisme français d'accréditation COFRAC se déroule en plusieurs phases : dépôt d'une demande, envoi d'un dossier technique transmis aux évaluateurs, audit, rapport puis décision finale. Le référentiel de support d'audit pour les LBM est la norme NF EN ISO 15189. L'accréditation initiale prononcée pour 4 ans et 9 mois est renouvelable avec des évaluations régulières tous les 15 mois. Un système qualité bien maîtrisé repose sur : une politique qualité définie, des tâches clairement déterminées, une formation des personnels appropriée, un système documentaire construit (manuel qualité, procédures, modes opératoires, enregistrements), des audits internes réguliers, une revue de direction, une traçabilité rigoureuse, la gestion des non-conformités et des réclamations. La cohérence des choix techniques, la validation des méthodes, l'exploitation des contrôles de qualité internes et externes sont les supports de la qualité technique du laboratoire.

IV LA DEMARCHE D'ACCREDITATION

1 Définitions et approches qualité employés

Dans la présente thèse je n'ai pas systématiquement utilisé les termes qualité car pour un LBM qui est un établissement de santé certains termes ne me paraissent pas appropriés. Par exemple, dans le domaine de la qualité nous parlons de « clients », ici le terme utilisé est « prescripteurs » ; dans le domaine de la qualité nous parlons de « produit », ici il s'agit d'« analyse génétique » ou de « résultat ». Cette démarche a pour objectif de rester bien dans le domaine de la santé, dans le but de participer activement aux soins de qualité prodigués aux patients, et d'adapter au maximum la démarche d'accréditation aux laboratoires de génétiques qui se distinguent par leur spécificité d'activité.

Cependant, certains termes sont applicables à tout établissement, médical ou non.

Dans cette partie sont détaillées les définitions de certains principes et la terminologie qui m'ont servi à la construction et la mise en place de Système de Management de la Qualité. Ceci va aider la compréhension des lecteurs extérieurs au domaine de la qualité.

1.1 Terminologie

Accréditation : procédure par laquelle l'organisme autorisé délivre la reconnaissance formelle de la compétence à effectuer des tâches spécifiques par une personne ou un établissement.

Action corrective : Action mise en place pour éliminer la cause d'une NC relevée.

Action curative : Action immédiate mise en place pour agir sur la conséquence d'une NC qui vient de se produire.

Action préventive : Action mise en place pour éliminer la cause d'une NC potentielle qui pourrait arriver.

Amélioration continue : Partie du management de la qualité qui consiste à accroître la capacité à remplir les exigences qualité.

Audit : Examen méthodique, indépendant et documenté qui permet une évaluation objective des activités et des résultats relatifs à la qualité par rapport aux dispositions

préétablies. L'audit permet de vérifier que les dispositions mises en place de façon effective sont aptes à atteindre les objectifs fixés.

Audit externe : Les audits externes incluent généralement les audits réalisés par des sujets ayant un intérêt dans l'organisation auditée ou par des sujets d'une organisation indépendante.

Audit interne : Les audits internes sont réalisés par le personnel du laboratoire qui examine la conformité des éléments du SMQ aux exigences de la norme.

Cartographie des processus : Représentation graphique de l'ensemble des activités d'un établissement.

Certification : procédure par laquelle l'organisme autorisé délivre la preuve écrite qu'un produit, un processus ou un service est conforme aux exigences requises.

Champ d'accréditation : La déclaration formelle et précise des activités pour lesquelles le laboratoire demande l'accréditation. Récemment les organismes d'accréditation ont permis la « portée flexible », ce qui permet de changer certaines conditions d'analyses et/ou modifier le champ d'analyses sans avoir un audit supplémentaire de l'organisme d'accréditation.

Indicateur : Permet de mesurer de façon objective un phénomène étudié.

Manuel qualité : Document qualité qui décrit le SMQ et l'organisation d'un établissement.

Non-conformités : Non satisfaction d'une exigence de SMQ qui nécessite la mise en place d'actions correctives.

Politique qualité : Orientation et intentions relatives à la qualité officiellement formulées par la direction d'un établissement.

Procédures : Ensemble de documents qui spécifient la manière d'effectuer une activité ou un processus.

Processus : Ensemble d'activités en interaction qui transforment des données d'entrée en données de sortie.

Système de management de la qualité : Ensemble d'éléments corrélés ou interactifs permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité.

Traçabilité : Capacité de tracer chaque élément des différents processus pour avoir la totalité de l'information concernant une activité ou un produit.

Validation : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiques définies sont satisfaites.

1.2 Approches qualité

Approche processus :

L'approche processus consiste à gérer les activités en tant qu'un système de processus interdépendants les uns des autres.

Un processus est un ensemble d'activités qui transforme un élément d'entrée en élément de sortie. Le processus est corrélé aux ressources est représentées par le concept des 5M (Matériel, Main d'œuvre, Méthode, Milieu, Matières). Récemment deux autres éléments des ressources peuvent être considérés – Monnaie et Management.

L'approche processus est l'identification méthodique des processus au sein d'un établissement, leur management et leurs interactions.

PDCA (Plan, Do, Check, Act) ou Roue de Deming:

Ce concept fait référence à l'amélioration continue et aide à coordonner les efforts en vue d'amélioration de la qualité.

C'est un cercle qui n'a pas de fin (**Figure 1**). Ce concept démontre que l'amélioration commence par une planification attentive de laquelle doit résulter une action efficace. Planifier signifie d'évaluer la situation et d'élaborer un plan d'action. Ensuite il s'agit de conduire ce plan à petite échelle, l'évaluer et l'ajuster quand c'est nécessaire. Après ces trois étapes le plan d'action définitif et adapté doit être appliqué.

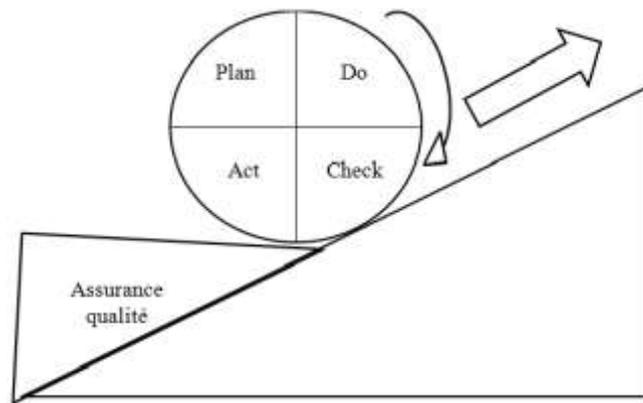


Figure 1 : « Roue de Deming »

QOOQCP (Qui, Quoi, Où, Quand, Comment, Pourquoi) :

Le QOOQCP est une méthode qui permet de clarifier les situations à mettre en œuvre pour la construction de SMQ.

2 Lecture de la norme ISO 15189 et interprétations

La norme ISO 15189 assure la qualité des services apportés dans les soins prodigués aux patients. Cette norme est destinée à tous les laboratoires de biologie médicale. Un effort de réflexion et d'interprétation est nécessaire pour l'appliquer dans le contexte des analyses génétiques.

L'accréditation considère, en plus des exigences management concernant le SMQ (Système de Management de la Qualité), les compétences techniques telles que la formation du personnel, la validation des méthodes, la maintenance des équipements, la calibration du matériel et les contrôles de qualité externes et internes.

La norme ISO 15189 aborde différents points concernant le SMQ et des aspects techniques. Elle ne détaille pas « comment » répondre à toutes ces exigences. Par conséquent, la première partie de mon travail a consisté dans une lecture approfondie des exigences, leur compréhension et ensuite leur interprétation. C'est seulement après cette étape que la mise en place des dispositifs nécessaires a pu être lancée.

Les principales exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2007 sont détaillées ci-dessous. Les différents points seront par la suite développés au niveau de leur mise en place à LGNA.

Remarque : Les correspondances avec la norme sont notifiées entre parenthèses.

1.1 Exigences management

Cette première partie de la norme contient un certain nombre d'exigences. La mise en place des exigences management se déroule en trois phases :

1) Conception du SMQ (4.1)

- Répondre aux besoins des clients (4.1.2/5.1.4).
- Respecter les exigences de la norme (4.1.3).
- Mettre en place un dispositif de communication interne (4.1.6).
- Concevoir, mettre en place le SMQ, assurer son suivi et adopter une démarche d'amélioration (4.1.5).
 - Mettre à disposition des ressources nécessaires (4.1.5 a)).
 - Ne pas avoir des conflits d'intérêt (4.1.5 b)).
 - Respecter la confidentialité (4.1.5 c)).
 - Ne pas avoir des engagements délétères (4.1.5 d)).
 - Définir l'organisation et les relations (4.1.5 e) et 4.1.5 f)).
 - Créer un programme de formation interne par les personnes habilitées (4.1.5 g)).
 - Mettre en place un encadrement technique (4.1.5 h)).
 - Identifier le responsable qualité (4.1.5 i)).
 - Identifier les référents qualité sectoriels (4.1.5 j)).

2) Mise en place du SMQ (4.2 et 4.3)

- Définir la politique qualité (PQ), les missions et l'engagement de la direction (4.2.3).
- Créer le manuel qualité (MQ) (4.2.4) et assurer la maîtrise du système documentaire (4.3).
- Le personnel doit être qualifié et impliqué (5.1). Il s'agit de disposer d'un organigramme, de fiches métiers et d'un programme de formations continues.
- Identifier les locaux et assurer leur entretien. Organiser et gérer les flux d'activité (5.2).
- Programmer des contrôles qualité internes et/ou évaluations extérieures (4.2.2).
- Assurer une vigilance permanente. Il s'agit de vérifications et évaluations diverses, d'audits internes, de la maîtrise des non-conformités et de la démarche d'amélioration.
- Assurer la maîtrise du système documentaire (4.2.1 et 4.3). Ils existent deux types de procédures : PR d'organisation et PR fonctionnelles.
- Les PR d'organisation nécessaires pour la mise en place de SMQ sont :
 - PR Organisation générale ;
 - PR Organigrammes, personnel, matériels, examens ;
 - PR Gestion des prélèvements et contrôles qualité ;
 - PR Gestion des fournitures et du système d'information ;
 - PR Hygiène et sécurité des locaux, élimination des déchets.

3) Maintient du SMQ et lancement d'une démarche d'amélioration (4.4 à 4.15)

Les PR d'organisation nécessaires sont :

- PR Démarche d'amélioration continue (4.12) et audits internes (4.14) ;

- Audits internes : identifier les points forts et les points à améliorer (4.14).
- Analyse des processus (4.11). Il s'agit de la méthodologie qui gouverne la maîtrise des processus. L'analyse des processus permet d'identifier les points critiques et par conséquent les attitudes préventives.
- Ecoute client (4.8 et 4.13.3). Il s'agit d'enregistrer et de traiter les réclamations, d'organiser des enquêtes de satisfaction, de mettre en place des contrats clinico-biologiques et de les évaluer régulièrement.
- PR Revue des contrats et revue de direction (4.4 et 4.15) ;
- PR Gestion des non-conformités, indicateurs de qualité et suivi (4.9) ;
- PR Conservations des spécimens (5.4.14 et 5.7.2) ;
- PR Enregistrements et archivage (4.13 et 5.8.6) ;

1.2 Exigences techniques

Dans cette deuxième partie de la norme nous pouvons distinguer deux catégories d'exigences :

1) Exigences générales (5.1 et 5.2)

- Chaque membre du personnel doit être inscrit dans un organigramme (5.1.1).
- Les diplômes, les qualifications, les formations doivent être conservées (5.1.2).
- La direction du laboratoire doit justifier de sa compétence (5.1.3).
- Les responsabilités et les missions doivent être définies dans les fiches métier (5.1.4 a)).

- Les tâches à effectuer doivent être désignées et les personnes habilitées doivent être identifiées dans les fiches métier et les fiches de poste (5.1.7).
- Une évaluation périodique du personnel concernant les formations et les habilitations doit être mise en place (5.1.11).
- Le conseil et l'aide au diagnostic doivent être assurés par une personne habilitée compétente (5.1.12).
- Les locaux d'activité doivent être cohérents avec les missions que le laboratoire s'est assigné (5.2).
- Les matériels doivent être en cohérence avec les missions du laboratoire (5.3.1).
- Les performances des systèmes analytiques doivent être vérifiées (5.3.4 h) et 5.5.2)).

2) Système documentaire concernant les exigences techniques (5.3 à 5.8)

Les PR fonctionnelles nécessaires sont :

- PR générale de fonctionnement ;
- PR Prélèvement ;
- PR Réception des spécimens ;
- PR Métrologie ;
- PR Fonctionnement d'un appareil ;
- PR Maintenance d'un appareillage ;
- PR Conduite d'une analyse ;
- PR Validation biologique ;
- PR Comptes rendus.

3 Organisation du travail

3.1 Tableau de bord

Un tableau de bord (**Annexe 1**) a été réalisé à l'aide de la norme ISO 15189, afin de prévoir tout ce qu'il faut mettre en place dans le cadre de l'accréditation.

Ce tableau de bord a été créé en deux parties correspondant aux deux parties de la norme : « Exigences Management » et « Exigences techniques ». Il contient d'une part les exigences de la norme, et d'autre part les preuves à apporter pour y répondre.

Le tableau de bord est un élément qui permet de suivre l'avancement du projet.

3.2 Rétroplanning

A partir du tableau de bord réalisé précédemment, un rétroplanning (**Annexe 2**) a été établi à l'aide de Microsoft Project qui est un outil de planification. Dans un but d'amélioration continue et pour pouvoir prévoir les actions qui restent à réaliser, afin d'aboutir aux objectifs fixés, ce rétroplanning est un élément de suivi de l'avancement du travail.

Pour lancer la démarche d'accréditation à LGNA, il a été planifié de mettre en place :

- la maîtrise et la gestion des documents,
- la validation de la méthode de discrimination allèlique,
- la maîtrise et la gestion des non-conformités,
- le déclenchement d'actions correctives et/ou préventives,
- l'audit,
- la création d'indicateurs.

Le Manuel Qualité, la Politique Qualité, l'Organigramme et la Cartographie des processus ont été également réalisés avec la collaboration du responsable de laboratoire, du responsable technique, du responsable administratif et du responsable qualité.

En parallèle, le conseil génétique étant une exigence de la norme, des dossiers d'interprétation de certains résultats de pharmacogénétique ont été rédigés. En effet, il existe

une relation étroite entre certains gènes responsables de la métabolisation et les médicaments. En tant que pharmacien, mon rôle a été, à l'aide de mes connaissances d'actions pharmacologiques et des voies métaboliques, d'interpréter les conséquences cliniques de certaines mutations sur l'administration des traitements et d'adapter la posologie des traitements quand des études cliniques ont été réalisées.

Le rétroplanning a permis d'attribuer des délais à chaque phase du travail :

- Lecture et interprétation de la Norme ISO 15189
- Réalisation d'un tableau de bord
- Exigences Management
 - ✓ Rédaction de Manuel Qualité
 - ✓ Réalisation d'une cartographie des processus
 - ✓ Réalisation d'un Organigramme
 - ✓ Rédaction de la Politique qualité
 - ✓ Maitrise documentaire-GED :
 - Etat des lieux
 - Modification et création des documents
 - Intégration des documents dans la GED
 - Formation des utilisateurs
 - Lancement du circuit de signature des documents dans la GED
 - ✓ Identification et maîtrise des NC :
 - Création d'un formulaire de relevé des non-conformités
 - Intégration des fiches de non-conformités existantes dans la GED et création de nouvelles fiches
 - Formation des utilisateurs
 - ✓ Mise en place des actions correctives et préventives
 - ✓ Audit :

- Réalisation d'une grille d'audit
- Planification de l'audit
- ✓ Création d'indicateurs et suivi
- ✓ Prestations de conseil-rédaction des dossiers :
 - Polymorphisme TPMT/Azathioprine
 - Polymorphisme DPYD/5-FU
 - Polymorphisme MTHFR/5-FU+MTX
 - Polymorphisme CYP2D6, CYP3A5, SULT1A1, UGT2B15/Tamoxifène
 - Polymorphisme CDA/Gemcitabine
 - Polymorphisme UGT1A1/Irinotécan
- Exigences Techniques
 - ✓ Validation des méthodes :
 - Planification des essais
 - Réalisation des essais
 - Rédaction du dossier de validation

3.3 Intégration dans le SMQ

Le challenge de management dans une démarche d'accréditation est le personnel. La difficulté consiste dans l'adaptation de coordinateur à chaque personne. Tout le monde ne réagit pas de la même manière aux changements prévus. Le rôle de coordinateur est de sensibiliser à la nécessité et aux avantages que l'aboutissement apportera en termes de fonctionnement de laboratoire et en termes de prestations fournies.

Le projet doit être communiqué et bien expliqué à l'ensemble du personnel qui doit sentir son rôle dans cette démarche. Le coordinateur doit être à l'écoute et en même temps garder les objectifs en vue sans se laisser dépasser par les avis qui varient d'une personne à l'autre. Le rôle d'un meneur de projet est d'encourager quand l'avancement n'est pas assez visible ou quand ils existent des obstacles.

Dans le but d'intégrer le personnel dans la démarche d'accréditation, plusieurs réunions ont été programmées avec les différents acteurs concernés.

Des réunions de travail hebdomadaires ont été prévues avec le responsable technique et le responsable administratif du laboratoire.

Pour suivre l'avancement du travail des points en début, au milieu et à la fin de stage ont été organisés. Pendant ces trois réunions l'ensemble des items ont été abordés.

Des formations sur la gestion électronique des documents, sur la gestion des non-conformités et sur la mise en place des actions correctives et préventives ont été suivies par l'ensemble du personnel concerné.

Au cours des réunions j'ai présenté les actions réalisées à l'aide de schémas et de façon synthétique. Les termes utilisés ont été réfléchis pour qu'ils soient simples justes, précis et adaptés au domaine d'un laboratoire de génétique. L'objectif de ces réunions a été de démontrer le bon sens et la valeur ajoutée de cette démarche d'accréditation pour le personnel.

4 Construction et mise en place du Système de Management de la Qualité

4.1 Politique Qualité

La politique qualité (PQ) (**Annexe 3**) doit être rédigée par le responsable du laboratoire et doit comporter un certain nombre d'éléments. Dans ce but, une réunion de travail a été organisée et nous a permis de :

- Définir le domaine des prestations que le laboratoire a l'intention d'offrir ;
- Définir les objectifs de SMQ ;
- Définir l'exigence selon laquelle le personnel doit connaître la documentation qualité et appliquer la PQ et les procédures (PR) à tout moment ;
- Annoncer l'engagement du laboratoire à se conformer aux bonnes pratiques professionnelles, à pratiquer des analyses de qualité et respecter le SMQ ;

- Annoncer l'engagement du laboratoire, de la direction de se conformer à la norme internationale.

La confidentialité est un élément très important dans les analyses génétiques. Cet aspect doit être souligné dans la politique qualité.

Les responsabilités du personnel doivent être définies. Les conflits d'intérêts doivent aussi être identifiés.

Après la rédaction de la politique qualité cette dernière doit être affichée, visible est connue par l'ensemble du personnel.

En règle générale, la politique qualité d'un LBM doit comporter les vocations d'un établissement de santé et donc démontrer que les intérêts des patients sont placés au plus haut niveau d'importance.

4.2 Cartographie des processus

La cartographie des processus représente l'identification et les interactions entre les différents processus.

L'analyse de l'organisation d'un laboratoire doit se faire à partir de l'identification des processus. Chaque processus fournit un service à destination d'un autre processus interne au laboratoire. Le processus de réalisation de l'analyse fournit un résultat d'analyse à destination des prescripteurs.

Nous pouvons distinguer trois types de processus :

- Processus opérationnels,
- Processus organisationnels,
- Processus supports.

Les processus opérationnels reflètent l'activité du laboratoire. Ils sont liés la réalisation de l'analyse et permettent de fournir un résultat aux prescripteurs.

Les processus organisationnels ou encore de management définissent la politique de laboratoire à partir des informations issues des autres processus. Ces processus permettent, suite à l'analyse des données, de fixer les objectifs et les plans d'actions.

Les processus supports sont transversaux au laboratoire et impactent tous les autres processus du système. Ils assurent les ressources nécessaires au bon fonctionnement de l'ensemble des processus.

L'approche processus m'a permis de réaliser la cartographie des processus de LGNA (**Annexe 4**). Cette approche consiste à identifier les différentes activités, les hiérarchiser et ensuite déterminer les interactions qui existent entre les différents processus.

Une fois tous les processus identifiés et organisés, ils doivent être pilotés. Ainsi, des pilotes de chaque processus sont désignés et responsables de leur processus. Afin de faciliter le pilotage, les pilotes créent des indicateurs et se fixent des objectifs. Ces éléments sont utilisés ensuite comme donnée d'entrée pour le processus « Revue de direction ».

Une cartographie très communicative a été créée pour pouvoir faciliter l'identification rapide de tous les processus management, réalisation et support. Des codes couleurs ont été utilisés pour renforcer la lisibilité et pour permettre l'identification des macroprocessus. Les interactions entre les processus sont illustrées par des flèches, en sachant que la donnée de sortie d'un processus est la donnée d'entrée du suivant.

Les trois types de processus sont représentés par trois grandes flèches de trois couleurs différentes.

4.2.1 Processus Management

Les processus management sont globalement liés à la responsabilité du responsable de laboratoire. Cela concerne la PQ, la définition des objectifs et les revues de direction. Les processus management sont guidés par la veille réglementaire et technique et par l'écoute de personnel médical qui définit les besoins. Les objectifs fixés permettent de passer à la réalisation des analyses par le laboratoire. Le retour sur l'efficacité de fonctionnement mis en place par la direction est exprimé, d'une part en interne par les audits internes qui sont un bon reflet de l'efficacité, et d'autre part par la mesure de la satisfaction des prescripteurs. Toutes ces interactions permettent de se rapprocher au maximum de l'objectif d'amélioration continue.

4.2.2 Processus de réalisation « Etudes des variations génétiques »

Une analyse médicale de génétique se déroule en trois phases :

- La phase pré-analytique comprend le prélèvement d'un échantillon de sang ou de salive, le transport et la conservation de l'échantillon biologique jusqu'à l'endroit où il est analysé ;
- La phase analytique est le processus technique qui permet l'obtention d'un résultat d'analyse ;
- La phase post-analytique comprend la validation biologique et l'interprétation contextuelle des résultats, ainsi que la communication appropriée des résultats au prescripteur.

La phase de prélèvement à LGNA est dans la plupart des cas réalisée en dehors de laboratoire. Selon l'article L.6211-11 de l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, le biologiste est responsable de toutes les phases permettant à aboutir à une analyse. Afin d'assurer la phase de prélèvement, nous avons élaboré un guide de prélèvement et un protocole de prescription distribués aux prescripteurs.

4.2.3 Processus Supports

Les processus supports sont communs à IGNA et LGNA compte tenu de l'organisation commune et dans le but d'instaurer une cohérence de fonctionnement au sein d'un même laboratoire.

« Achats et approvisionnement » est un processus qui a pour objectif de définir des exigences sur les produits achetés, de sélectionner et évaluer les fournisseurs et de vérifier la conformité de produit acheté aux exigences spécifiés.

« Gestion des ressources humaines » est le processus qui assure la gestion du personnel en termes de qualification et compétence.

« Maîtrise des non-conformités » est le processus qui identifie et assure la gestion des écarts par rapport aux exigences définis dans la norme.

« Communication » est le processus qui assure la mise à disposition du personnel des informations internes pertinentes.

« Maîtrise de l'environnement de travail » est le processus qui s'assure l'adaptation des infrastructures à l'activité.

« Validation des méthodes » est le processus qui assure la fiabilité des résultats obtenus par une démarche de confirmation de la performance des méthodes utilisées au laboratoire.

« Maîtrise des documents et des enregistrements » est le processus qui assure la gestion de tous les documents qualité et des enregistrements au sein du laboratoire.

« Maintenance » est le processus qui assure la gestion de la maintenance des équipements afin d'assurer la disponibilité des moyens de production technique.

« Métrologie » est le processus qui assure la réception, la surveillance et l'aptitude de tous les moyens de mesure et de contrôle utilisés au laboratoire.

« Validation des applications informatiques » est le processus qui assure la validation des systèmes informatiques.

« Gestion et validation des évolutions techniques » est le processus qui a pour objectif de déterminer les besoins en équipements nécessaires à la réalisation des analyses et d'effectuer la qualification des équipements pour s'assurer qu'ils répondent bien aux besoins au sein de l'activité du laboratoire.

4.3 Manuel Qualité

Le SMQ doit être décrit dans le manuel qualité (MQ). Le MQ est le document qui est situé en haut de la pyramide documentaire qui décrit la politique de qualité, ainsi que les objectifs de l'organisation mise en place. Le MQ doit donner une vision claire et précise de l'organisation et des activités du laboratoire au personnel médical, aux évaluateurs et à tout visiteur du laboratoire.

Le MQ comprend :

- Le domaine d'application du SMQ,
- Les procédures documentées du système,
- La description des interactions entre les processus du SMQ.

Le chapitrage proposé dans la norme semble très approprié pour l'élaboration du MQ. En effet, dans les différents points de la norme ils existent des répétitions. Il est donc plus efficace de les regrouper. Les éléments suivants doivent y figurer, afin d'explicitier l'ensemble des points de l'organisation du laboratoire :

- La description du laboratoire et ses activités,
- La Politique qualité,
- La qualification et formation du personnel,
- Le SMQ,
- La maîtrise des documents,
- Les enregistrements, la conservation et l'archivage,
- Les locaux et l'environnement,
- La maîtrise des instruments, des réactifs et/ou des consommables,
- La validation des procédures analytiques,
- La sécurité,
- Les aspects environnementaux,
- Le protocole de prescription, le prélèvement des échantillons primaires, le recueil et le traitement des échantillons de laboratoires,
- La validation des résultats,
- Les contrôles de qualité,
- Le système informatique du laboratoire,
- Le compte rendu des résultats,
- Les actions correctives et le traitement des réclamations,
- La communication et les autres relations avec les patients, les professionnels de la santé, les laboratoires sous-traitants et les fournisseurs,
- Les audits internes,
- L'éthique.

L'élaboration du MQ a nécessité une bonne organisation et une communication pertinente. Ce qui est important c'est de bien connaître tous les aspects du laboratoire. En effet, l'audit de certification d'IGNA que j'ai eu l'occasion de suivre pendant trois jours m'a permis de connaître chaque activité du laboratoire.

Après avoir rédigé l'ensemble du MQ et noté les points qui sont spécifiques et nécessitent une réflexion plus approfondie, un exemplaire a été distribué au directeur du laboratoire, au responsable technique, au responsable administratif et au RQ. Une réunion avec tous ces acteurs m'a permis de noter les remarques et les précisions de chacun et ainsi d'aboutir à la version finale du MQ de LGNA.

4.4 Organigramme

La norme inscrit dans la partie « Exigence techniques » que le laboratoire doit posséder un organigramme associé à des fiches métiers.

L'organigramme de LGNA a été élaboré en collaboration avec le pilote du processus « Gestion des ressources humaines ». Il a été inclut dans le MQ.

L'organigramme de LGNA indique (**Annexe 5**) :

- Le responsable du laboratoire,
- Le RQ,
- Le cadre technique,
- Les techniciens,
- Le personnel impliqué dans le service administratif,
- Le responsable de la métrologie et de la maintenance,
- Les contrats clinico-biologiques.

Les fiches métiers associées à l'organigramme définissent les fonctions et les tâches associées au poste concerné. C'est au niveau des fiches métier qu'il est possible d'indiquer les autorisations, les délégations et les habilitations.

4.5 Maîtrise des documents

La maîtrise des documents est une exigence de la norme. A LGNA elle est assurée par une gestion électronique.

A mon arrivée le laboratoire venait de s'équiper avec le logiciel de gestion électronique SapaNet. Le point de départ pour choisir un système de gestion électronique est de définir ce qui est essentiel pour le laboratoire sur la base de ce qui existe déjà, la taille de laboratoire et les aboutissants attendus. Ces besoins doivent être définis à l'aide du personnel car son implication dans la prise de décision va permettre une meilleure acceptation de nouveau système.

Une formation externe m'a été dispensée, afin d'être opérationnelle sur les différents modules et de connaître les fonctionnalités de ce logiciel. Cette formation m'a permis de débiter la phase de paramétrage.

Le module Docalis m'a permis d'assurer la gestion documentaire à LGNA.

Les documents qualité sont hiérarchisés dans la pyramide documentaire définie ci-dessous (**Figure 2**). Chaque document peut faire référence à d'autres documents de niveau de détails supérieurs.

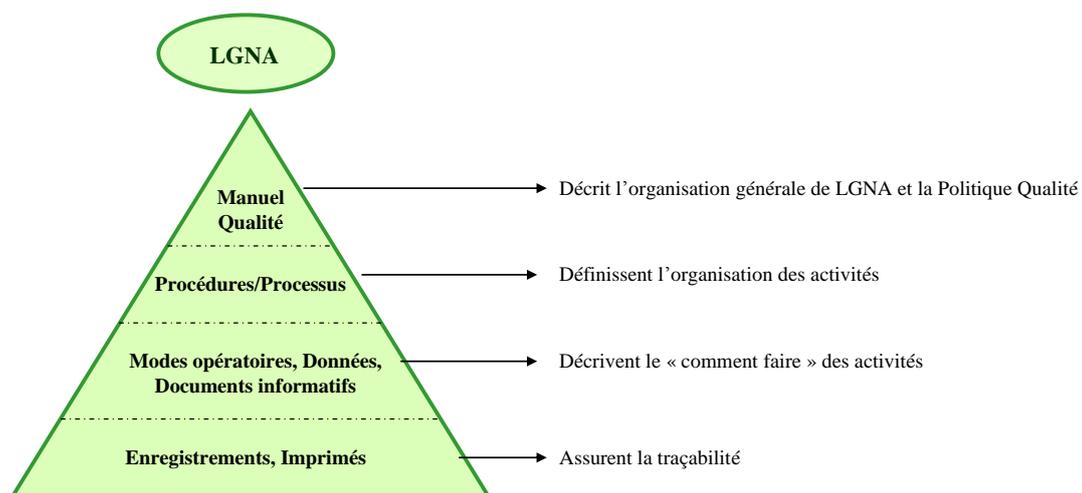


Figure 2 : « Pyramide documentaire de LGNA »

Les enregistrements assurent la traçabilité et démontrent la conformité aux exigences définies. Ils prouvent que le système de management de la qualité décrit dans le MQ est mis

en œuvre. Ils permettent d'analyser les dysfonctionnements et mettre en œuvre l'amélioration continue.

La maîtrise documentaire est le mécanisme par lequel les documents sont créés, approuvés, distribués, revus, révisés et archivés. Les documents applicables doivent être approuvés par la personne autorisée. Les documents obsolètes doivent être archivés de telle sorte que les utilisateurs utilisent uniquement les dernières versions à jour.

Le module Docalis de SapaNet permet :

- de favoriser l'accès aux informations,
- d'assurer la conservation sécurisée des documents,
- de gérer des bases documentaires,
- d'assurer la traçabilité des diffusions,
- de rationaliser les différentes étapes du cycle de vie des documents.

Il permet ainsi de réduire l'utilisation des documents papiers qui deviennent vite obsolètes et peuvent induire une utilisation de documents non valides.

Ainsi à LGNA :

- Chaque document est vérifié par le responsable en rapport au contenu du document, avant chaque diffusion ;
- Chaque document est approuvé par le responsable qualité dans le cadre de l'ensemble du système qualité ;
- Tout document technique qui est en relation directe avec la fiabilité du résultat rendu est validé par le biologiste de laboratoire ;
- Les documents sont identifiés par leur code, leur titre, leur date de mise en application et par leur version ;
- Une révision systématique des documents est définie et gérée par le logiciel de gestion électronique des documents (GED) ;
- Chaque document est conduit à une nouvelle version au moment d'une modification ;

- L'ancienne version est automatiquement archivée et par conséquent n'est plus disponible pour les utilisateurs ;
- Seule la version à jour peut être utilisée au poste de travail.

A l'aide de la GED les documents applicables sont à jour et consultables en temps réel à tous les postes de travail.

4.5.1 Etat des lieux

Afin d'assurer la maîtrise documentaire à LGNA, un état des lieux de la documentation existante a été effectué. Plusieurs catégories de documents ont été regroupées dans un tableau Excel :

- « MOD » : 44 documents à modifier. Il s'agit de l'ensemble des documents existants qui doivent être revus et mis à jour.
- « CREER » : 36 documents à créer. Il s'agit de l'ensemble des documents qui doivent être créés pour répondre aux exigences de la norme ISO 15189.
- « REV » : 68 documents à réviser. Il s'agit de l'ensemble des documents communs à IGNA et LGNA qui doivent être revus et adaptés aux deux structures. Plusieurs documents qualité sont communs à IGNA/LGNA car comme indiqué plus haut plusieurs processus sont communs à IGNA et LGNA.
- « SUPP » : 3 documents à supprimer.
- « ARCH » : 1 document à archiver.

L'ensemble des 148 documents doivent être ensuite intégrés dans le logiciel de gestion électronique des documents (GED) et supprimés du serveur local, afin de ne plus utiliser et gérer des versions papiers.

La liste se présente sous la forme suivante (**Figure 3**) :

Typ	Nom de document	Catégorie de document	Commentaires	Date création GEI	Référence
CRÉER	Analyse des réactions de séquence	MO			
CRÉER	Analyse des résultats de PCR fluorescente	MO	Actuellement en phase R et D		
REV	Maintenance puncher	MO	commun avec IGNA		
MOD	Analyse des résultats de discrimination allélique et lecture en point final	MO		15/12/2010	L101215-02
MOD	Discrimination allélique en lecture en point final	MO		16/12/2010	L101216-02
MOD	Elution manuelle de l'ADN des punchs	MO		15/12/2010	L101215-01
MOD	Préparation de l'amplification pour la discrimination allélique	MO		16/12/2010	L101216-06
MOD	Préparation des amorces pour PCR et du tampon "TE 10 : 1"	MO	Confusion!	16/12/2010	L101216-09
MOD	Préparation des amorces de séquençage	MO	A appeler "Préparation et suivi des amorces"	16/12/2010	L101216-09
MOD	Préparation des tubes d'Assay by design	MO		16/12/2010	L101216-07
MOD	Préparation et purification manuelle des réactions de séquence	MO		16/12/2010	L101216-08
MOD	Réalisation d'une feuille de route de discrimination allélique	MO	Rédaction MO pour ttes les feuilles de route	21/02/2011	L110221-01
MOD	Révélation et purification manuelle des produits d'amplification pour séquençage	MO		16/12/2010	L101216-13
MOD	Prélèvement sur carte FTA en punch	MO		16/12/2010	L101216-05
MOD	Enregistrement d'une demande d'analyse	PR	s'appelle Réception d'une demande d'analyse	21/02/2011	L110221-06
CRÉER	Enregistrement d'une demande d'analyse	MO		21/02/2011	L110221-08
REV	Formalisation de l'offre	PR			
REV	Formalisation des résultats	PR	Confusion?		
CRÉER	Maîtrise des documents, données et enregistrements	PR	GED commun avec IGNA		
MOD	Réception et revue de contrat	MO	s'appelle Validation d'une demande d'analyse	21/02/2011	L110221-05
REV	Saisie des exigences des clients	PR	chercher doc IGNA		
SUPP	Synoptique des Workflow de production LGNA	Synoptique	A intégrer dans un processus?		
MOD	Validation	PR	Confusion?		
MOD	Validation et communication des résultats au prescripteur	PR	Confusion?	21/02/2011	L110221-09
SUPP	Analyse du gène "RPE 65"	Synoptique	A intégrer dans un processus?		
SUPP	Analyse de LGNA	Synoptique	A intégrer dans un processus?		
CRÉER	Préparation des mix PCR et réaction d'amplification avant séquençage	MO		21/02/2011	L110221-04

Figure 3 : « Extrait de l'état des lieux de la documentation »

Pour assurer la traçabilité, j'ai ajouté au fur et à mesure des intégrations, la date de création de chaque document dans la GED et son code unique.

4.5.2 Méthodologie

La méthodologie du travail (**Figure 4**) est représentée ci-dessous sous forme d'un logigramme.

Il démontre la manière dont j'ai organisé le travail, afin d'assurer la maîtrise des documents au sein de LGNA.

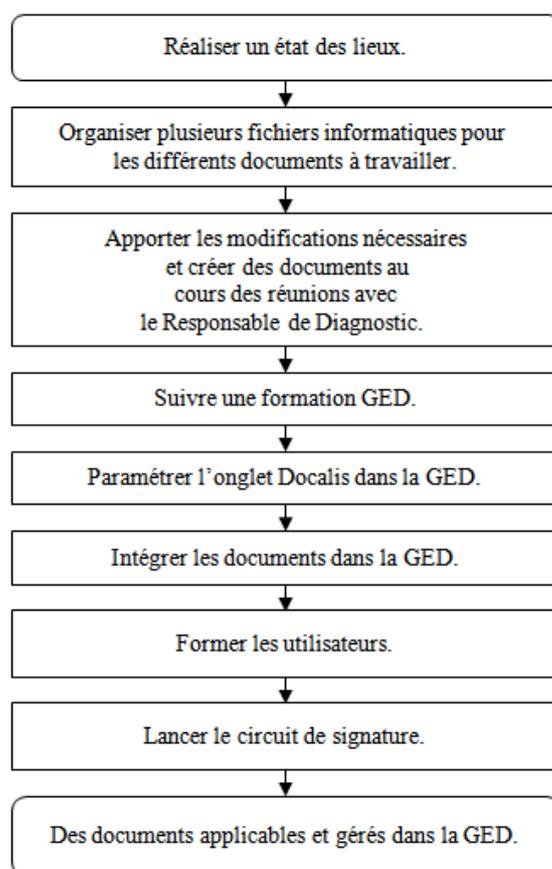


Figure 4 : « Méthodologie du travail »

4.5.3 Gestion des documents

Dans cette partie sont détaillées les étapes de travail dans la GED qui ont permis la maîtrise des documents à LGNA.

➤ Création de modèles

La création de modèles de documents est nécessaire, afin d'assurer un formalisme identique pour toute la documentation qualité.

Quatre types de modèles ont été créés correspondant aux quatre types de documents, notamment les procédures (PR), les modes opératoires (MO), les données (DON) et les imprimés (IMP) (**Figure 5**).

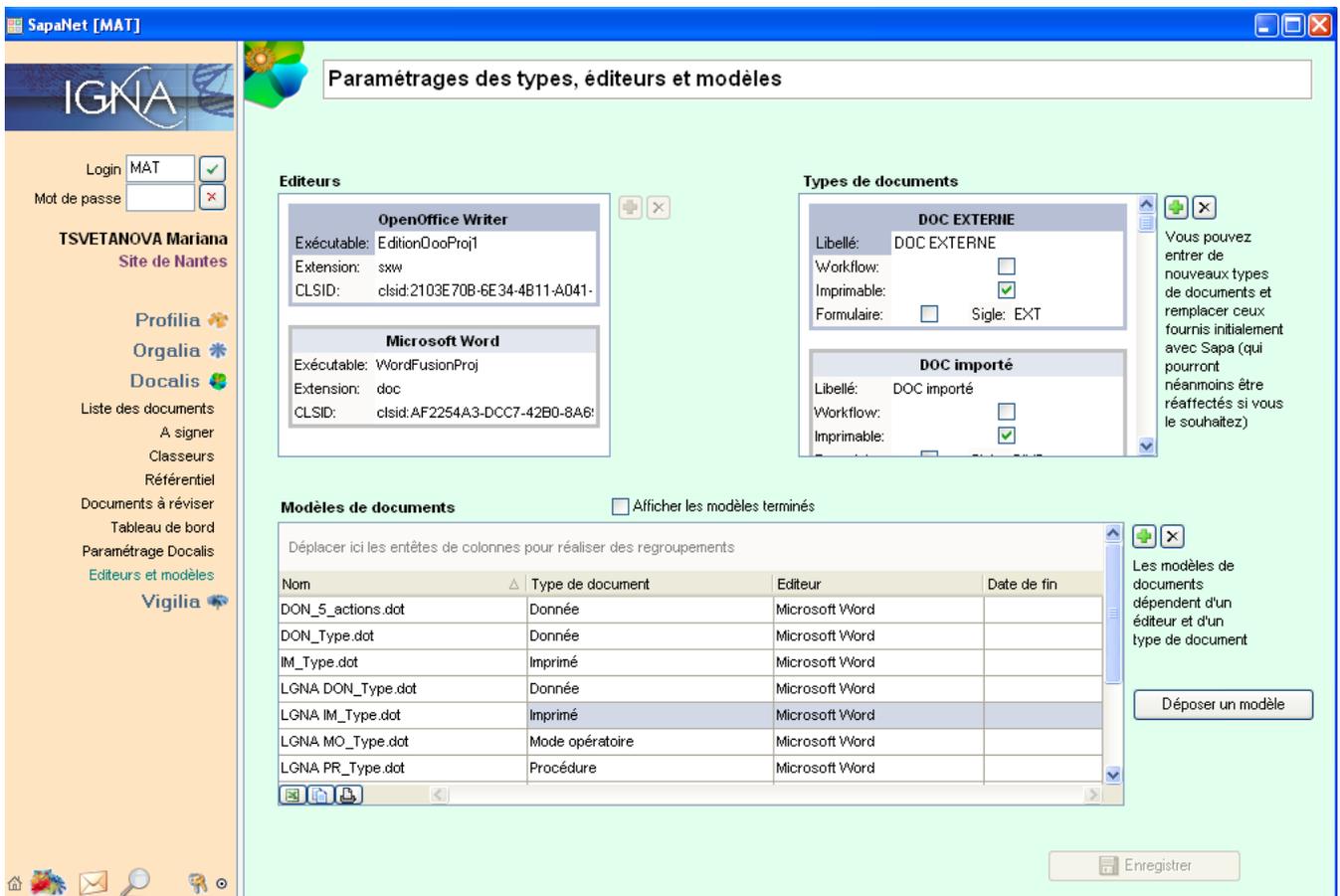


Figure 5: « Création des modèles de documents »

Les MO, les PR et les DON possèdent deux cartouches (**Figure 6**) :

 LABORATOIRE GÉNÉTIQUE NANTES ATLANTIQUE	Production-technique		Code ^o : L110221-02
	Procédure	Révision ^o : 0	Version ^o : 001 Date d'application ^o :
			Page: 1 sur 3

Objet de la modification ^o :		
		
	Intervenants	Dates
Rédaction	TSVETANOVA-MARIANA	
Vérification	HERBERT-ODILE	
Approbation	FRUCHARD-LAURENT	
Validation	MOISAN-JEAN-PAUL	

Figure 6 : « Cartouches des procédures, des modes opératoires et des données »

Les IMP sont des documents qui doivent être instruits, afin d'assurer la traçabilité. Ils deviennent alors des enregistrements. Ils comportent donc le cartouche suivant (**Figure 7**) :

INSTRUIT-PAR^o:	DATE^o:
☐	☐

Figure 7 : « Cartouche des imprimés »

➤ Paramétrage

Chaque type de modèle a été paramétré, afin que certaines informations constantes puissent être renseignées automatiquement. Il s'agit du numéro de version par défaut, de la zone de rangement par défaut, de la fréquence de révision par défaut (**Figure 8**).

Paramétrages généraux de la production de documents

Options générales | Gestion des alertes

Afficher les modèles

Type de document: LGNA PR_Type.dot (Procédure)

Paramétrez ici les options générales pour la production de documents

Référénts du module: FRUCHARD Laurent...

Composition du code document personnalisé: Typedentifiant/Version

Séparateur code document: []

Type de document par défaut: Mode opératoire

Options par défaut pour le modèle "LGNA PR_Type.dot (Procédure)"

Type(s) de zone de rangement à présenter: Document

Numéro de version par défaut: 001

Référént par défaut: FRUCHARD Laurent...

Zone de rangement par défaut: Bureau "Diagnostic" :: Armoire "Diagnostic"

Fréquence de révision (en mois): 12

Délai maximum avant révision (mois): 24

Supprimer | Enregistrer

Figure 8 : « Paramétrages généraux »

Le WorkFlow est le moyen qui assure la signature électronique de chaque document. Le paramétrage du WorkFlow par défaut permet d'avoir des étapes de signature identiques pour l'ensemble des documents gérés dans la GED (**Figure 9**).

Les étapes « Approbation » et « Validation » sont systématiquement assurées par les RQ et le responsable du laboratoire. La dernière étape de la production d'un document est la validation qui consiste dans la signature de la personne appropriée. Dans le cadre d'un laboratoire d'analyses médicales c'est le biologiste. Il conserve la responsabilité de l'ensemble des phases de l'examen de biologie médicale.

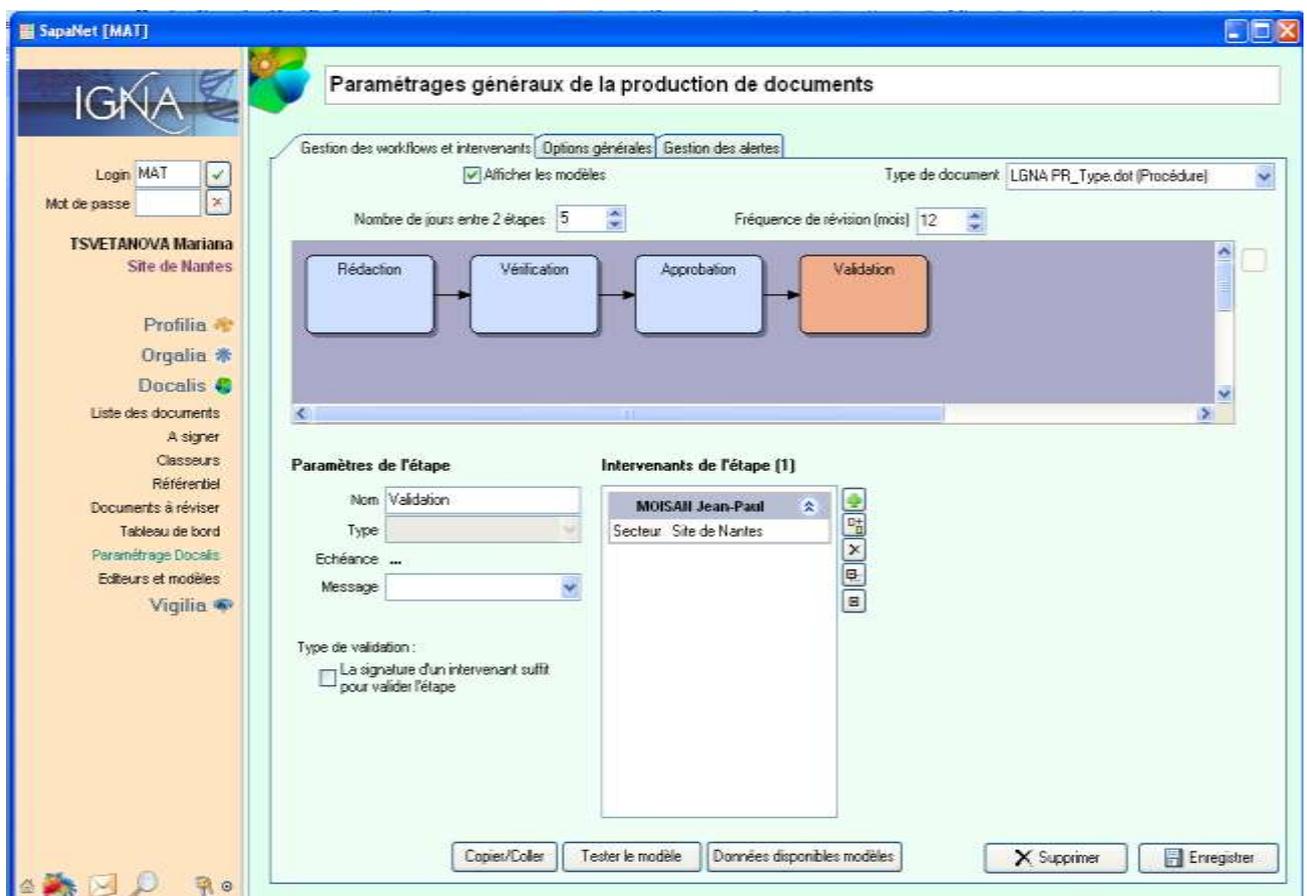


Figure 9 : « Paramétrage du WorkFlow »

➤ Création d'un nouveau document

Pour créer un nouveau document dans la GED les différents onglets de la fiche signalétique doivent être renseignés (Figure 10, 11, 12). Le document peut ensuite être intégré.

Informations principales	Affectations	Référentiel	Workflow de production
Renseignez ici les informations générales du nouveau document ou de la nouvelle version * Champs obligatoires			
Outil de production	Type du document <input type="radio"/> Document sur modèle <input type="radio"/> Document fourni Mode opératoire * LGNA MO_Type.dot *		
Information classement	Code du document ### * Version 001 * Titre ### Zone de rangement Armoire "Diagnostic" *		
Echéance	Mise en application	Date de fin	
Référent(s)	Production FRUCHARD Laurent... *		
Révision	<input checked="" type="radio"/> Avec cycle de révisions <input type="radio"/> Sans cycle de révisions	Responsable	Fréquence de révision (mois) 12
Commentaires	Commentaire Evolution version		
Accès	Lecture <input checked="" type="radio"/> Libre (toute personne même sans login) <input type="radio"/> Interne, restreinte aux utilisateurs des secteurs : Tous les secteurs <input type="radio"/> Confidential	Modification Secteur(s), autres que le secteur de création : 0 Secteur(s)	
<input type="button" value="Lancer le workflow"/> <input type="button" value="Validation immédiate"/> <input type="button" value="Fermer"/> <input type="button" value="Enregistrer"/>			

Figure 10 : « Informations principales concernant le document »

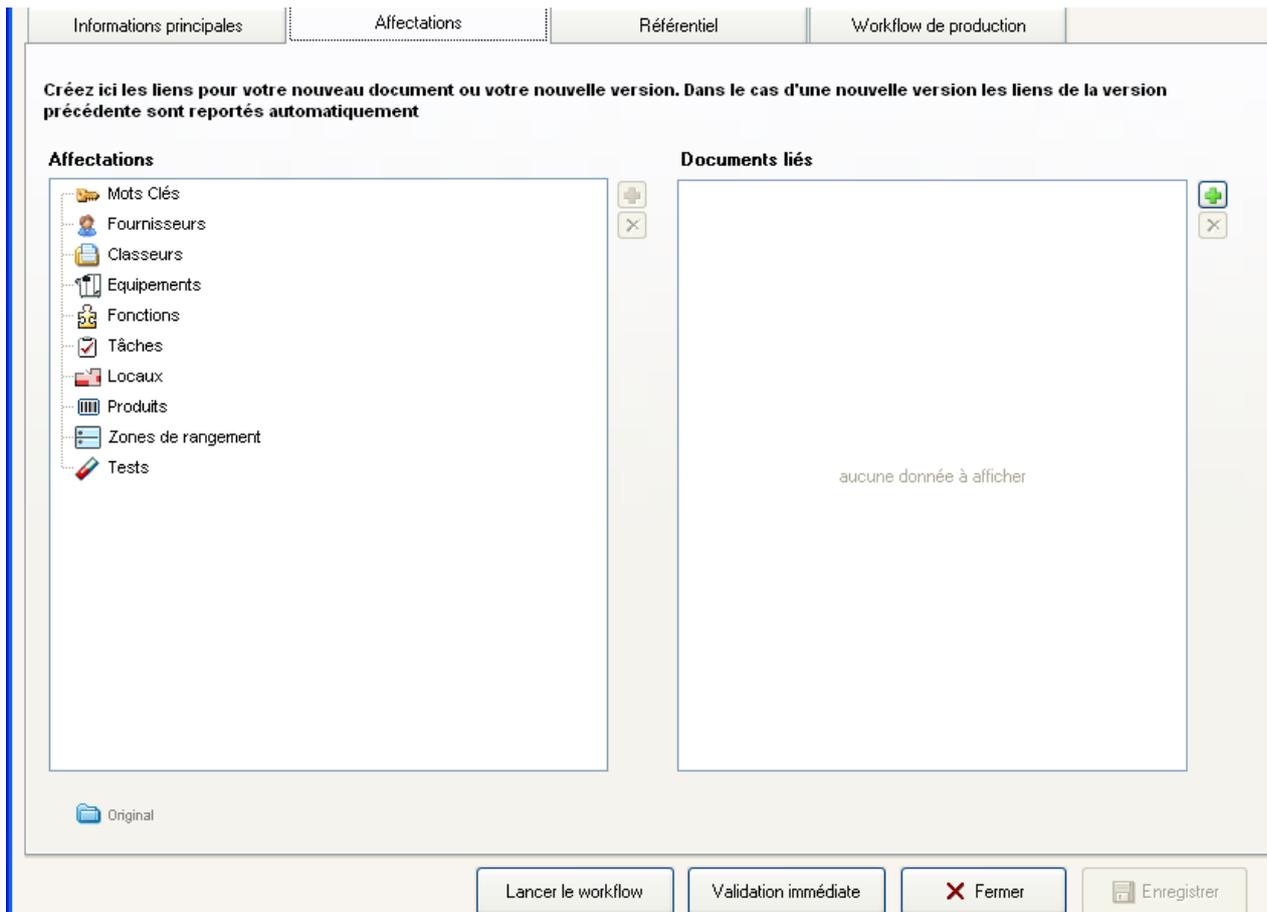


Figure 11 : « Affectation du document »

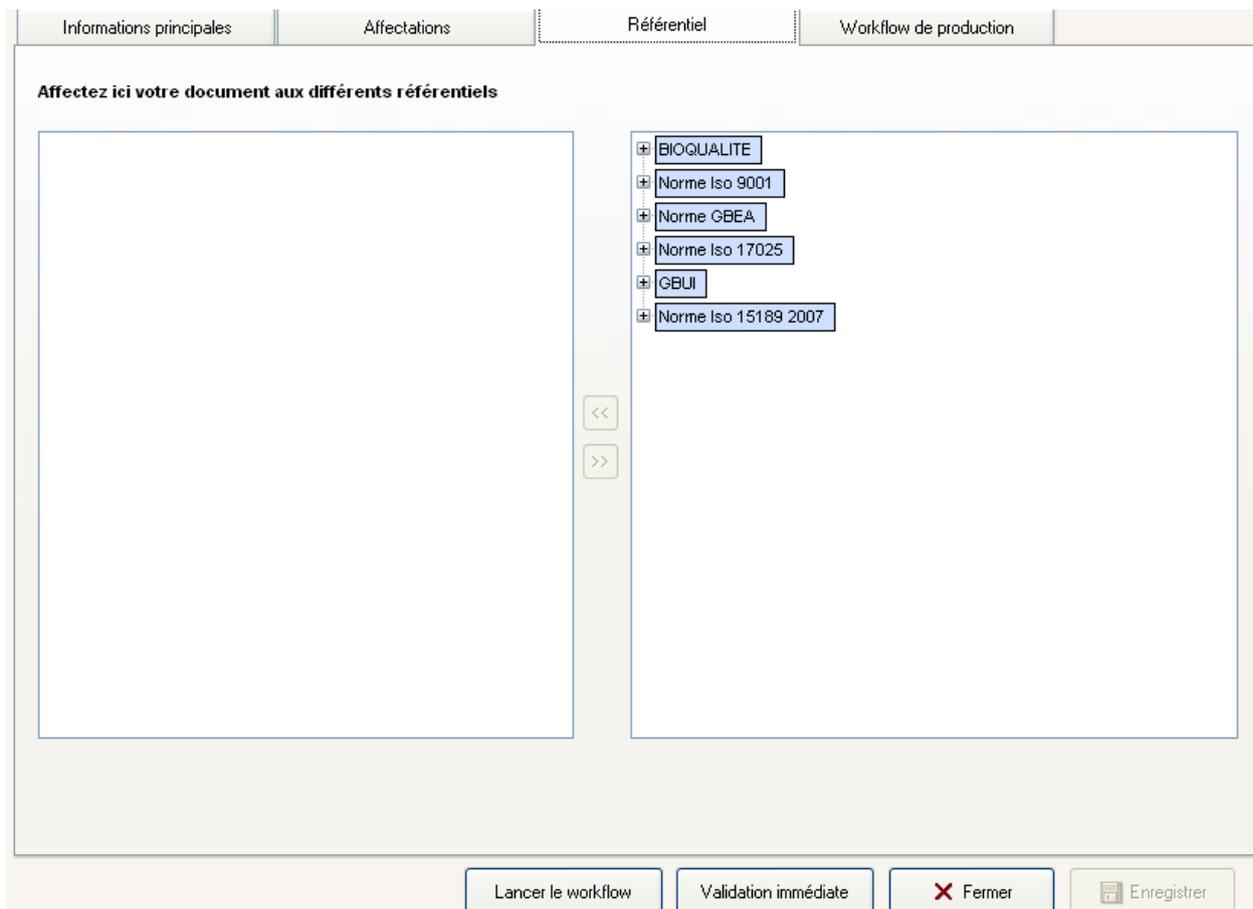


Figure 12 : « Normes liées au document »

➤ **Signature des documents dans la GED**

Une fois le document créé, il se trouve dans la liste des documents « En préparation ». La signature électronique est nécessaire pour que le document soit applicable et visible par les utilisateurs.

Pour lancer le WorkFlow, il faut d'abord sélectionner le document et choisir « Lancer le WorkFlow » (**Figure 13**). Le document sera alors envoyé au premier intervenant pour la signature électronique de l'étape « Rédaction ».



Figure 13 : « Lancement du WorkFlow »

L'intervenant de l'étape correspondante reçoit un message qui lui indique l'action à effectuer (**Figure 14**). L'intervenant doit éditer le document et ensuite le valider (**Figure 15**).

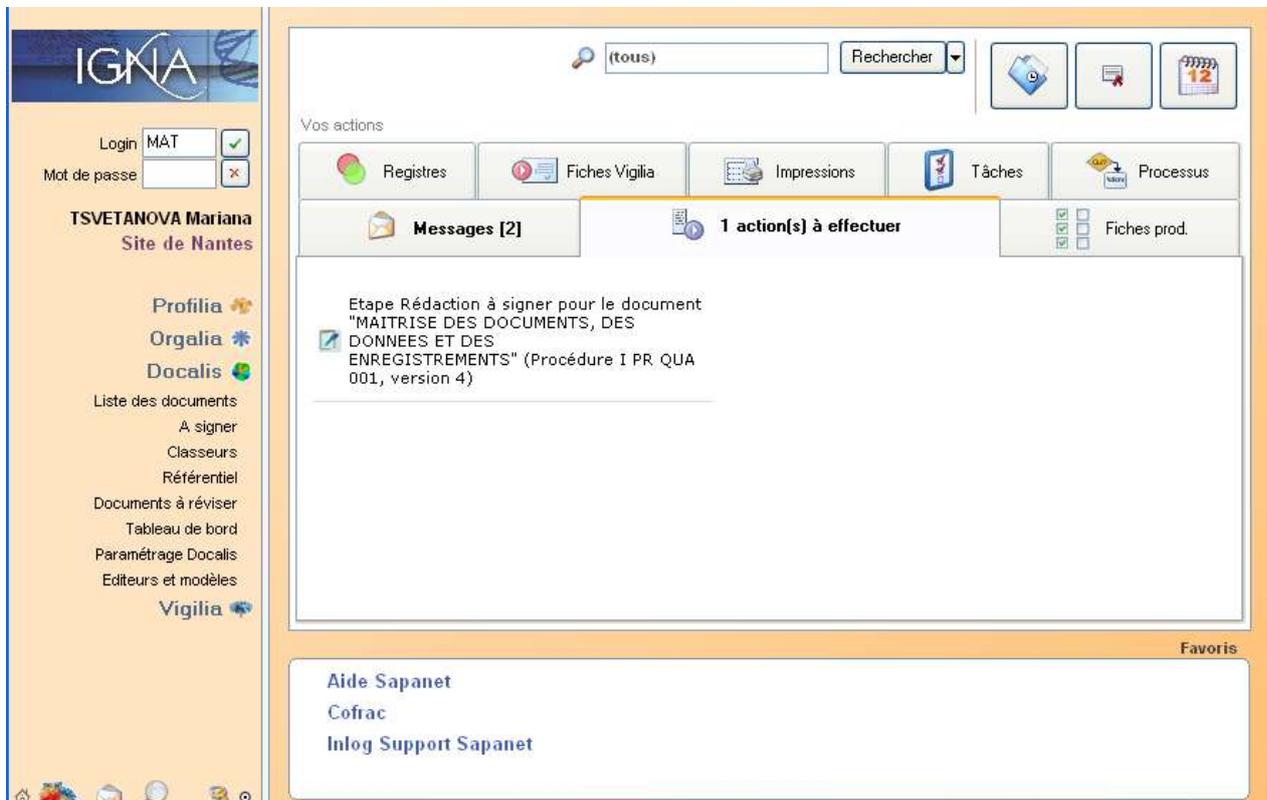


Figure 14 : « Actions à effectuer »

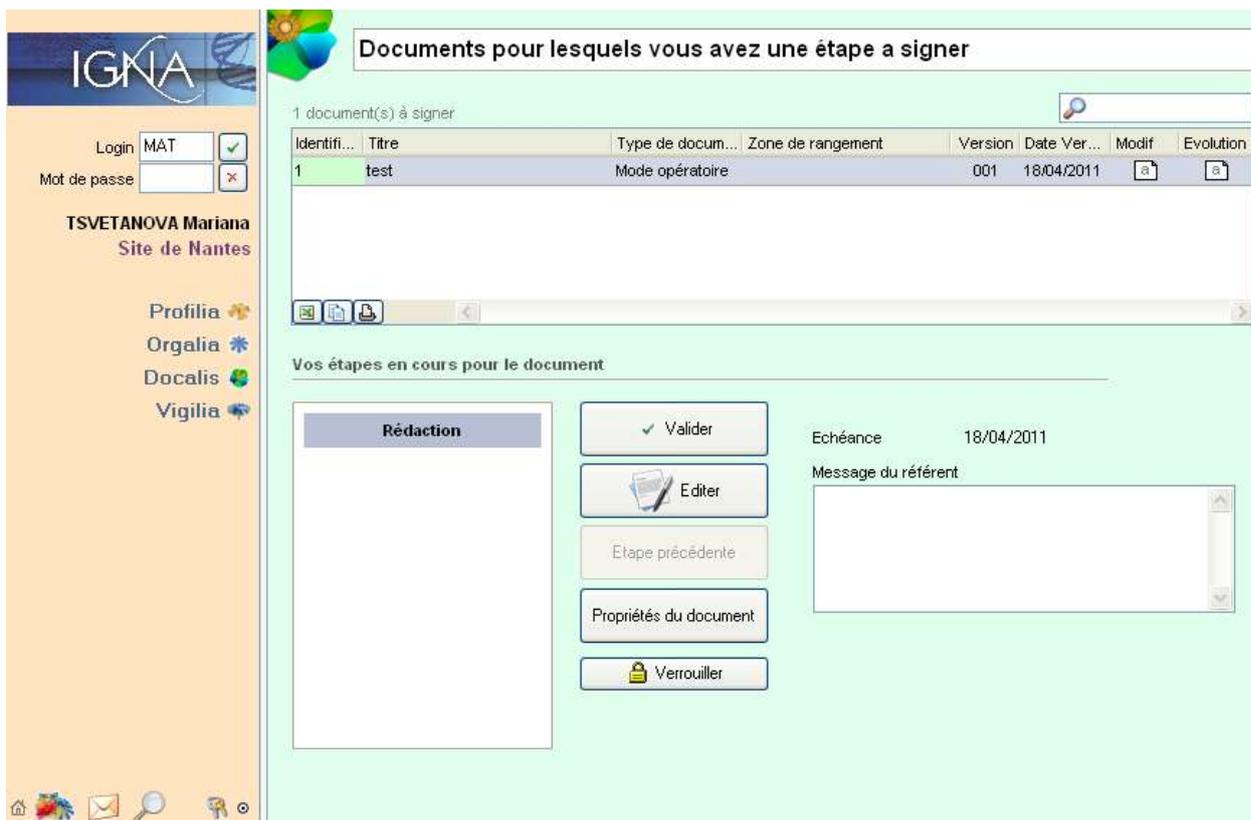


Figure 15 : « Signature électronique d'un document »

A la fin du circuit de signature, le document est converti en PDF et transféré automatiquement dans documents « Applicables ». La liste des documents intégrés dans la GED est présentée en annexe (**Annexe 6**).

➤ Recherche d'un document

La recherche des documents s'effectue par le moteur de recherche général (**Figure 16**) ou par la liste des documents (**Figure 17**).

Cette dernière est réservée aux pilotes de processus car elle donne accès à la modification des documents. Pour assurer la sécurité, les utilisateurs peuvent consulter les documents applicables sur le poste de travail uniquement à l'aide du moteur de recherche général.

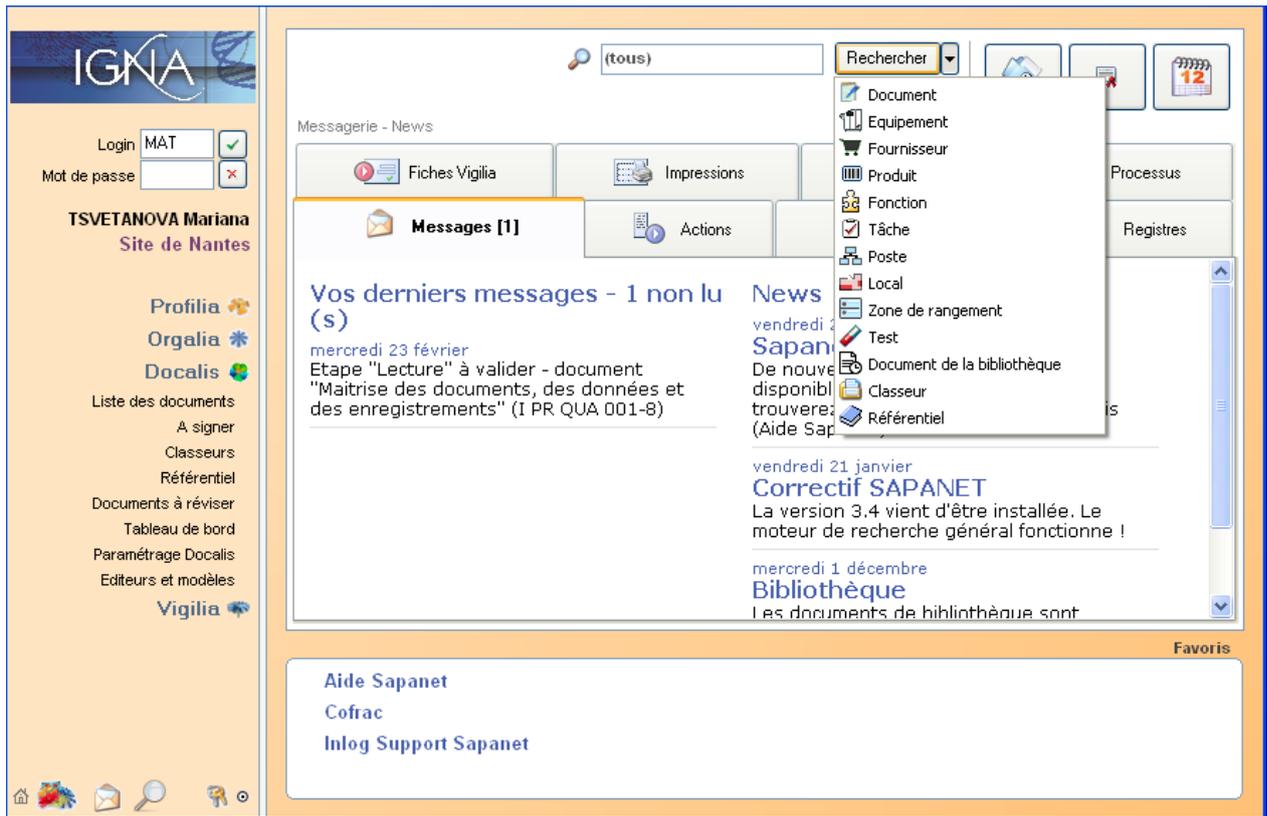


Figure 16 : « Moteur de recherche générale »

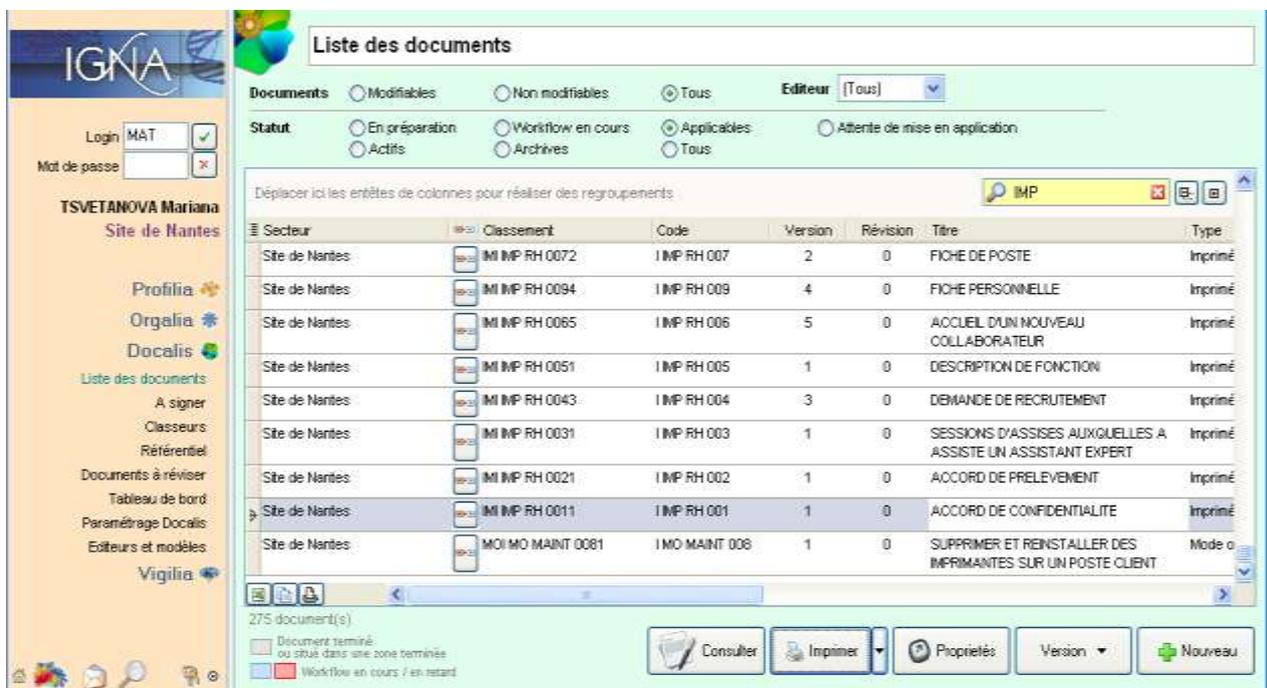


Figure 17 : « Liste des documents »

Pendant la consultation, les documents sont présentés sous format PDF et ne peuvent pas être imprimés, sauf en cas d'autorisation du service qualité. Seuls les IMP peuvent être imprimés. Certains d'entre eux se présentent sous format Excel et ne sont pas converti en PDF. Il s'agit des feuilles de calcul qui ne sont pas créées sur un modèle mais importées directement du serveur local. Ils sont tout de même non modifiables après la mise en application.

➤ **Changement de version d'un document**

Le changement de version est nécessaire pour chaque modification d'un document applicable (**Figure 18**).

Pour ce faire, il faut sélectionner le document dans la liste des documents et choisir l'option « Nouvelle version ».

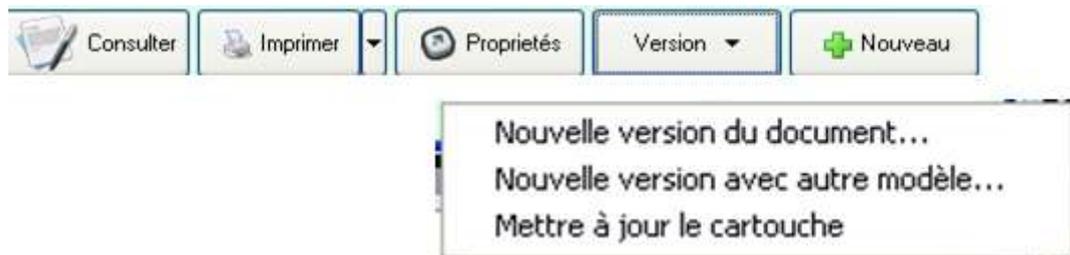


Figure 18 : « Changement de version d'un document »

➤ **Archivage d'un document**

L'archivage des documents dans la GED est automatique en cas de changement de version. Il existe la possibilité d'archiver un document qui ne sera plus utilisé par l'instruction d'une date de fin d'application.

La liste des documents archivés n'est visible que par les pilotes des processus.

4.6 Maîtrise des non-conformités. Actions correctives et préventives

Les non-conformités (NC) sont des écarts qui peuvent être constatés pendant un audit, mais également à n'importe quel moment. Afin de pouvoir agir sur ces écarts, les non-conformités doivent être relevées et ensuite gérées.

D'une manière générale devant une NC il faut :

- Isoler le produit ;
- Relever la NC ;
- Analyser l'impact ;
- Mettre en place une action curative (immédiate) ;
- Evaluer l'efficacité de l'action curative ;
- Analyser les causes ;
- Analyser la criticité en fonction des critères fréquence et gravité ;
- Enclencher des actions correctives et/ou préventives ou clôturer la fiche.

Le module Vigilia de SapaNet permet :

- la gestion des non-conformités ou des événements indésirables par :
 - ✓ enregistrement des fiches de non-conformités,
 - ✓ rejet ou la qualification de ces fiches,
 - ✓ analyse des causes,
 - ✓ lancement d'un plan d'action,
 - ✓ vérification de l'efficacité des plans d'action,
 - ✓ suivi et analyses statistiques.
- la gestion des écarts identifiés lors des audits ;
- la gestion des objectifs définis au cours des réunions et des revues de direction ;
- la gestion des plans d'actions.

4.6.1 Etat des lieux

Jusqu'à ce jour les NC à LGNA ont été relevées sur des formulaires papiers et stockés dans des classeurs prévus à cet effet.

La mise en place de la gestion électronique des NC a permis le suivi régulier des dysfonctionnements en mettant en place des actions correctives et préventives.

Le logiciel de gestion électronique a des nombreux avantages, non seulement pour le relevé des NC, mais également pour la traçabilité et l'exploitation des données.

4.6.2 Méthodologie

La méthodologie du travail concernant la maîtrise des NC est présentée ci-dessous sous forme de logigramme (**Figure 19**).

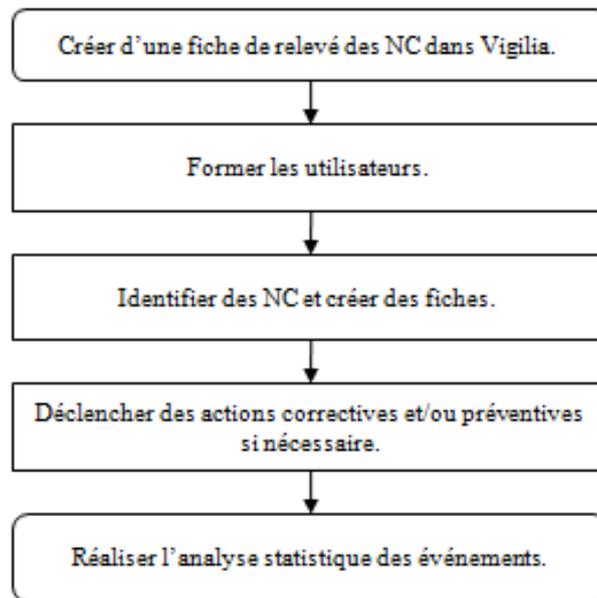


Figure 19 : « Méthodologie du travail »

4.6.3 Gestion des NC

Plusieurs étapes ont été nécessaires afin d'assurer la maîtrise des NC :

- Concevoir une fiche « LGNA FICHE DE RELEVÉ »

Un formulaire a été conçu afin de permettre au personnel de relever les NC constatées. Les éléments suivants y figurent et sont à renseigner :

- ✓ Date,
- ✓ Identificateur,
- ✓ Type de la NC (Réclamation des prescripteurs, Défaillance de communication, Défaut de traçabilité, Identovigilance, Défaillance analytique, Hygiène, Défaillance du système informatique, Manque d'information, Transport/Réception/Facturation et Réactovigilance),
- ✓ Description de la NC,
- ✓ Action curative mise en place,
- ✓ Efficacité de l'action curative,
- ✓ Fréquence,
- ✓ Gravité,
- ✓ Responsable du suivi des actions,
- ✓ Information sur une éventuelle discussion en réunion du laboratoire.

Au moment de la création de la fiche une variable calculée a été définie. Il s'agit de l'indice de criticité ($IC = \text{Fréquence} * \text{Gravité}$). Il est, par conséquent, automatiquement calculé pour chaque fiche soumise pour laquelle la fréquence et la gravité ont été indiquées.

La détermination des critères de fréquence et gravité est une étape très importante, car c'est l'IC qui indiquera quelles NC seront traitées et lesquelles seront rejetées.

Dans le cas d'un laboratoire de génétique dont l'activité est très spécifique, la notion de fréquence est exprimée en nombre de demandes d'analyses et non par mois. Pour être le plus exhaustif possible, le nombre d'analyses réalisées à LGNA pendant l'année 2010 a été calculé. Par la suite la signification des notions suivantes a été définie :

- ✓ Rare : 1 fois sur 100 analyses
- ✓ Occasionnel : 1 fois sur 40 analyses
- ✓ Fréquent : 1 fois sur 10 analyses
- ✓ Très fréquent : 1 fois sur 2 analyses

Il est de même pour le critère gravité. La gravité de l'événement dans un LBM se traduit par l'impact sur le résultat rendu au patient. Il a ainsi été possible de définir la signification de :

- ✓ Négligeable : Pas d'impact sur le résultat
- ✓ Tolérable : Impact possible sur le résultat mais réparable
- ✓ Indésirable : Non réparable ou impact sur l'image et/ou impact financier important
- ✓ Intolérable : Impact sur le résultat non détecté à temps

Une NC traitée en priorité, par exemple, sera un événement qui survient une fois sur deux analyses et qui a un impact sur le résultat, non détecté à temps et qui porte préjudice au patient.

- Relever les NC sur la fiche créée précédemment

Après avoir créé la fiche de relevé des NC cette dernière est accessible par tous les utilisateurs du personnel LGNA (**Figure 20**). Elle peut être soumise après instruction.

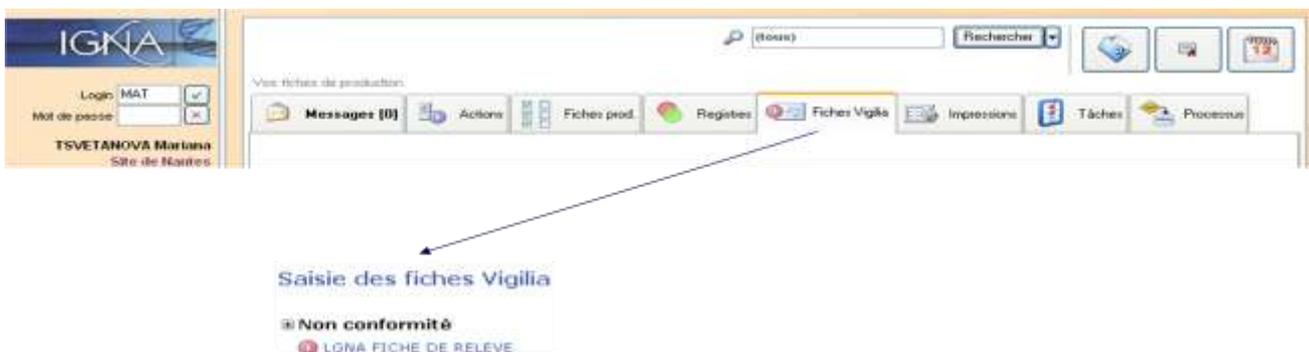


Figure 20 : « Accès à la fiche de relevé »

La fiche de relevé des NC comporte deux parties (**Figure 21**). Une première, est à remplir au moment de constat d'une NC et une deuxième, est à renseigner au cours des réunions de gestion des NC qui ont été organisées avec le responsable de LGNA, le responsable technique et le responsable administratif.

Figure 21 : « Fiche de relevé des NC »

➤ Gérer les NC

La gestion des NC relevées par le personnel se fait au cours de réunions prévues à cet effet et se déroule en plusieurs étapes.

✓ Qualification ou rejet d'une fiche

Dans la liste des événements (**Figure 22**) sont présentes toutes les fiches soumises avec leur résumé. C'est à partir de cette liste qu'elles sont toutes traitées une par une. Nous avons défini que les fiches qui seront qualifiées sont celles dont l'IC est supérieur à 4. Celles dont l'IC est inférieur à 4 seront rejetées car elles sont peu fréquentes et leur gravité n'est pas

considérable. Toutefois une NC peut ne pas être traitée dans un premier temps et traitée au moment de l'augmentation de son IC.

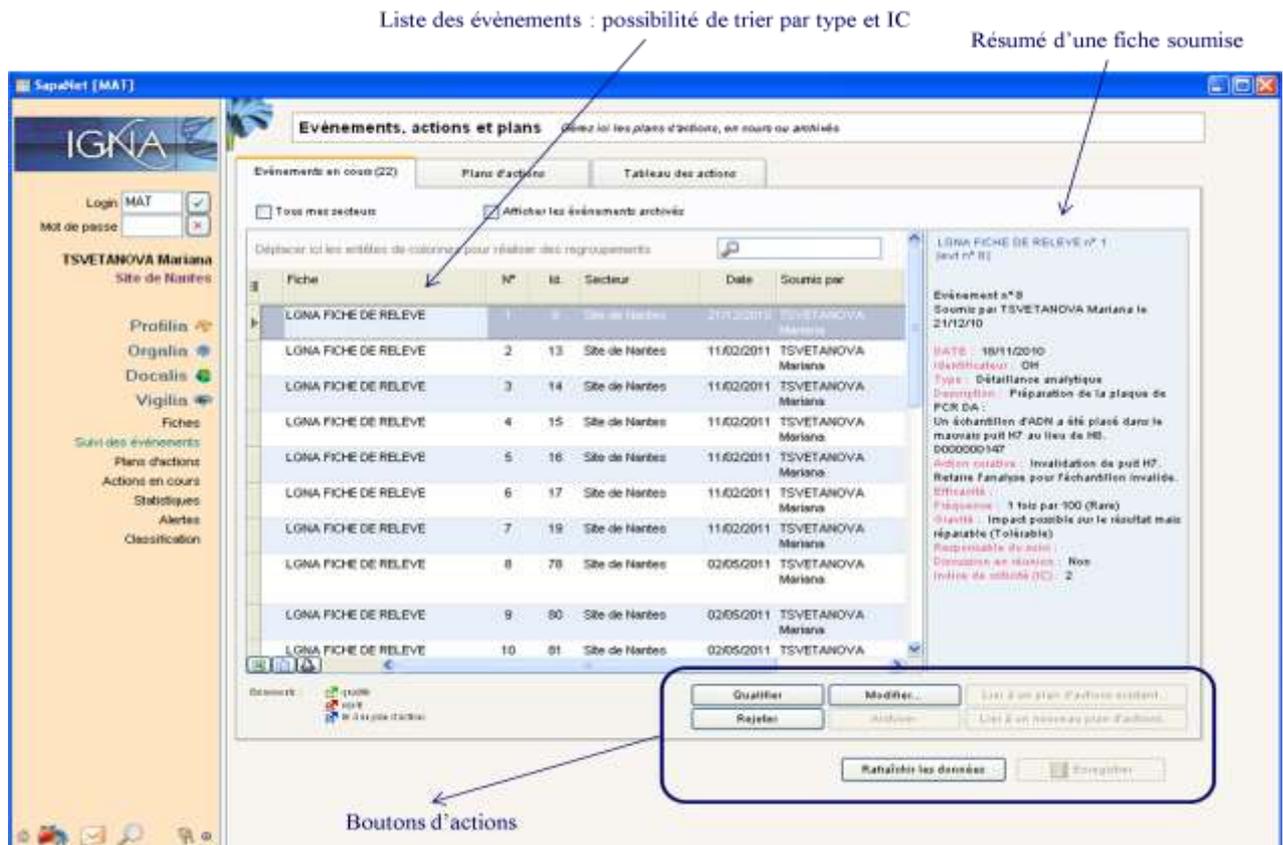


Figure 22 : « Liste des événements »

✓ Déclenchement des actions correctives et/ou préventives

Des plans d'actions (Figure 23) sont associés pour les fiches qui ont été qualifiée. Un plan d'action comporte :

- les causes de la NC ;
- l'action curative mise en place ;
- les actions correctives et/ou préventives mis en place ;
- la description de chaque action ;
- le responsable des actions ;
- la date prédictive et effective de la résolution ;
- le bilan et la vérification de plan d'action.

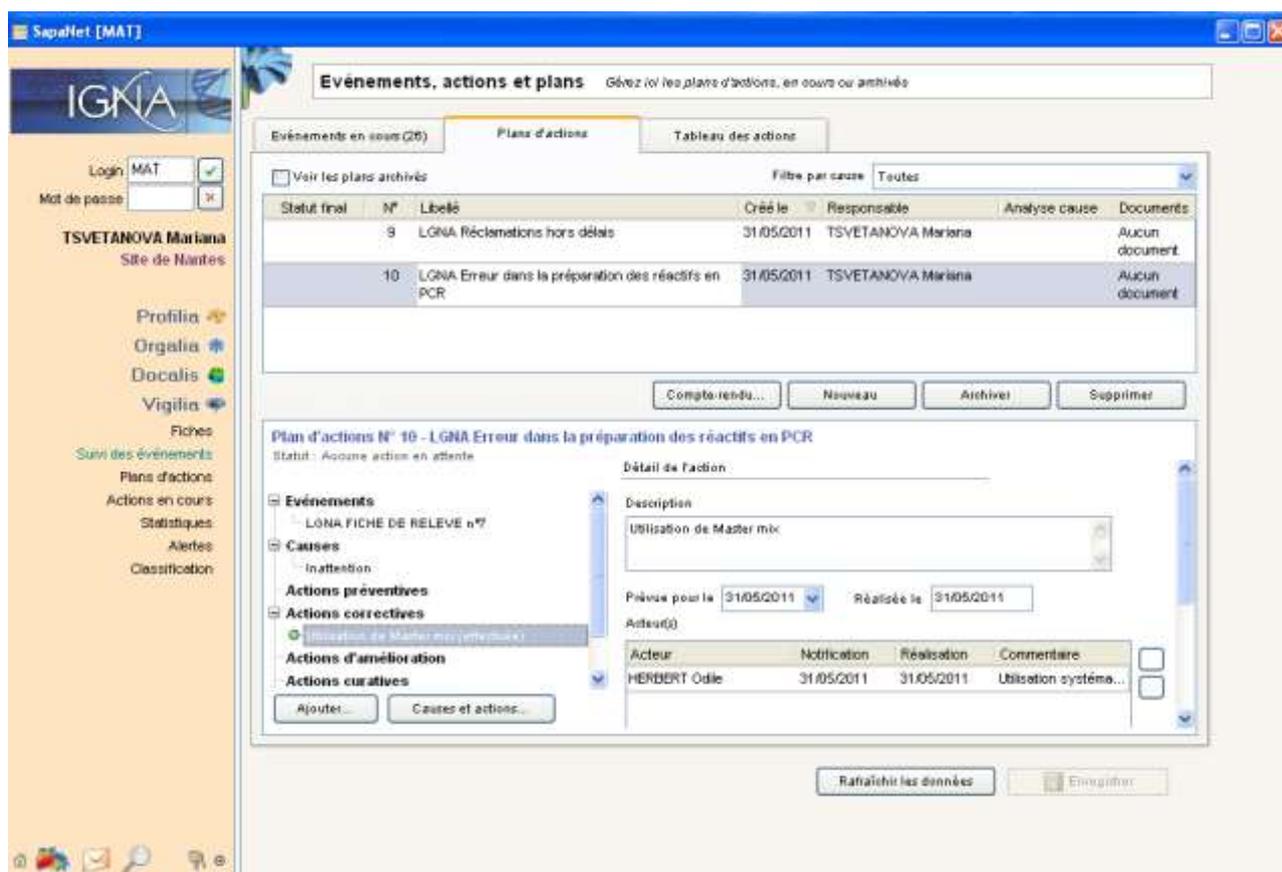


Figure 23 : « Plans d'action »

Plusieurs NC de même type peuvent être liées à un plan d'action commun.

Il est également possible d'imprimer un compte-rendu des plans d'action directement à partir du logiciel. Ces comptes rendus peuvent être discutés au cours des revues de directions.

✓ Analyses statistiques

Un autre élément peut aussi être considéré en revue de direction. Il s'agit de l'analyse statistique des NC relevées.

Il est en effet possible de réaliser plusieurs présentations graphiques en fonction de différents critères sélectionnés. Un graphique du nombre de fiches par mois en fonction de type des NC est représenté ci-dessous (**Figure 24**).

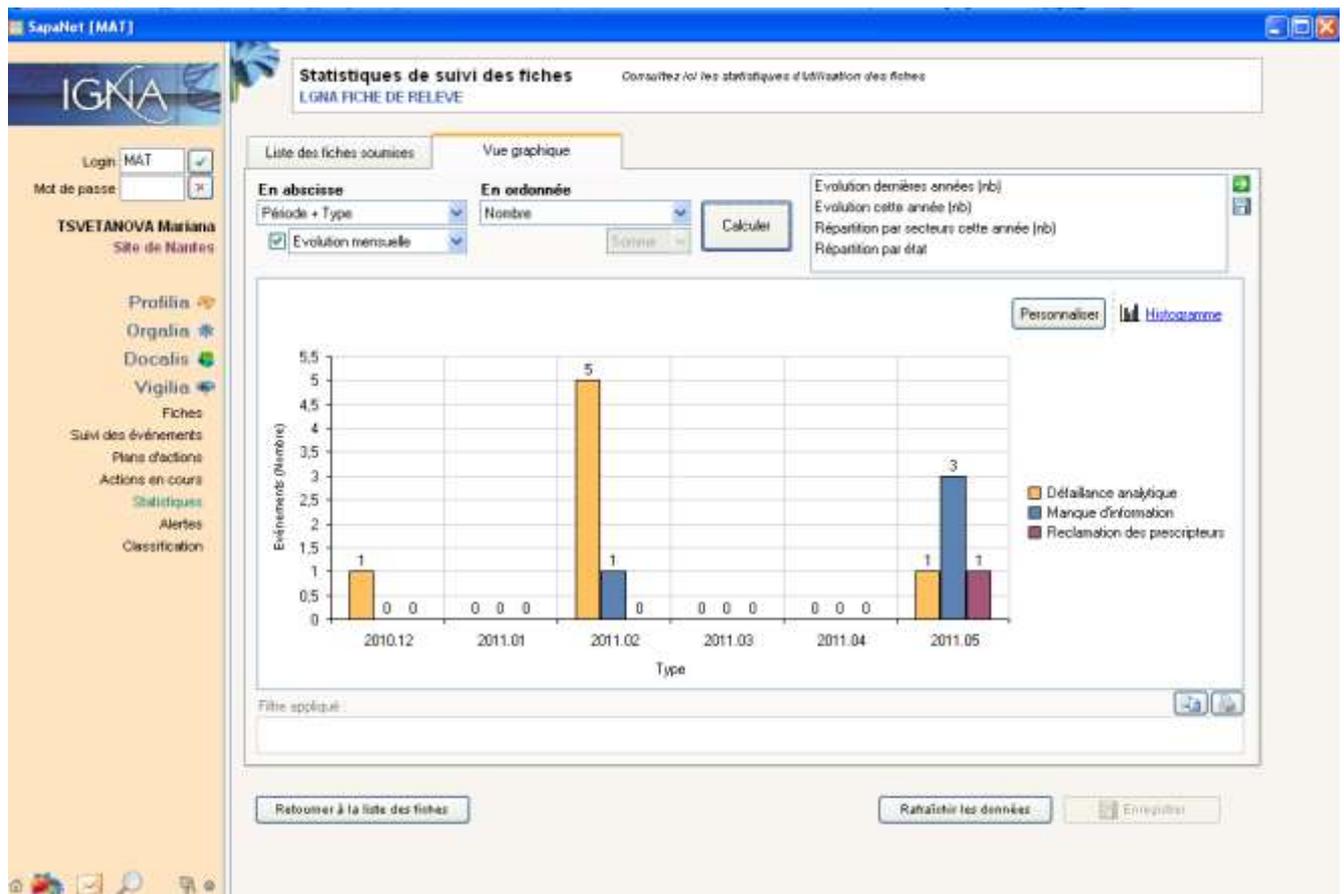


Figure 24 : « Nombre de fiches soumises par mois en fonction du type des NC »

4.7 Audit

Une formation d’audit m’a été dispensée afin d’être qualifiée et m’a permis d’organiser un audit interne à LGNA.

L’audit interne est un élément essentiel du système qualité et doit être considéré comme une révision des processus. L’audit interne est réalisé par le laboratoire lui-même dans un but d’amélioration et ne doit pas être considéré comme une inspection.

La norme ISO 15189 demande aux laboratoires accrédités d’auditer les principaux éléments de leurs systèmes qualité une fois par an. En pratique cela signifie d’organiser continuellement des audits internes des différents éléments du système qualité.

Ils existent deux types d’audits internes : horizontal et vertical. L’audit horizontal évalue des aspects précis de la documentation ou d’un processus. L’audit vertical évalue tous

les éléments d'un processus. Il est très important que l'auditeur connaisse et comprenne les exigences de la norme. L'auditeur doit également avoir des connaissances sur les méthodes utilisées, les équipements et la calibration pour être capable de juger sur la compétence de laboratoire.

Le laboratoire doit continuellement évaluer les différentes activités pour maintenir et améliorer le niveau de qualité. L'audit interne est un des moyens pour évaluer et améliorer le système de qualité, ainsi que pour détecter les non-conformités.

A la suite de chaque non-conformité identifiée au cours de l'audit, des actions correctives et préventives doivent être mises en place pour pouvoir éliminer la non-conformité. Au cours de prochain audit interne ces éléments doivent être évalués, afin de juger de l'efficacité des actions mise en place.

Un audit interne est constitué de trois phases :

- la préparation d'audit,
- la réalisation d'audit,
- la rédaction de rapport d'audit.

4.7.1 Préparation de l'audit

La phase de préparation est importante car elle permet d'élaborer un plan d'audit qui doit être flexible pour permettre des changements, mais doit couvrir le champ d'audit et les objectifs. Pendant la phase de préparation l'auditeur doit identifier tous les documents de références qui se rapportent à l'audit.

Dans un premier temps une grille d'audit a été réalisée (**Annexe 7**). Par la suite avec la collaboration du personnel LGNA, nous avons planifié l'audit interne à LGNA et nous avons désigné la personne auditrice. Je n'ai pas pu réaliser l'audit moi-même car mon objectivité aurait été compromise de fait de ma participation active à la construction du SMQ de LGNA. De ce fait, nous avons choisi un collaborateur qualifié d'IGNA.

4.7.2 Réalisation de l'audit

Pendant la réalisation, l'auditeur doit expliquer la planification de l'audit et rappeler que ce n'est pas la personne mais le système qui est audité. L'auditeur doit rester objectif et indépendant. Il doit s'adapter au comportement de l'audité. L'auditeur doit mentionner quand un élément n'est pas conforme à la procédure. A la fin de l'audit, l'auditeur doit proposer des solutions et des améliorations.

4.7.3 Rapport de l'audit

Il est important de prendre des notes tout au long de l'audit car cela permettra d'élaborer un rapport d'audit structuré. Le rapport doit contenir les non-conformités mineures, les non-conformités majeures et les points positifs à souligner. Après le rapport d'audit un plan d'action doit être élaboré.

4.8 Amélioration continue

L'audit détaillé plus haut fait partie des objectifs d'amélioration continue.

Le relevé des non-conformités, la mise en place d'actions correctives et préventives et l'évaluation de leur efficacités sont le principe de PDCA (Plan-Do-Check-Act) ou encore la roue de Deming. Ce concept aide à la coordination des efforts d'amélioration de la qualité d'un établissement.

Ce cercle n'a pas de fin car la démarche d'amélioration doit être continue. Il démontre que la démarche d'amélioration doit être attentivement planifiée, l'action doit être efficace et ceci en cycle continu.

D'autres approches consistent dans la participation à des contrôles qualités externes, dans la réalisation d'enquêtes de satisfaction auprès des prescripteurs et dans l'organisation d'un audit externe conduit par un organisme indépendant.

LGNA participe à des CQE :

- AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
- EMQN : European Molecular Genetics Quality Network

Pendant la conception de l'enquête de satisfaction des prescripteurs (**Annexe 8**) les items suivants ont été abordés:

- L'aspect relationnel,
- L'aspect de communication et présentation des comptes rendus,
- L'aspect technique.

L'enquête de satisfaction permet de mesurer la satisfaction des prescripteurs. L'analyse des réponses au cours des revues de direction permet de guider la politique d'un laboratoire.

Dans ce même but d'amélioration continue, des indicateurs ont été mis en place. Ces indicateurs doivent être suivis par les pilotes de processus et au cours des revues de direction.

4.8.1 Création et suivi des indicateurs

Ils existent deux types d'indicateurs :

- Les indicateurs d'activité
- Les indicateurs de performance

Les indicateurs d'activité se réfèrent à la qualité des prestations. Ils indiquent une valeur à un moment donné et reflètent la réalité dans la durée.

Exemple : Nombre d'analyses non-conformes à la réception par mois

Les indicateurs de performance donnent à un moment donné un niveau d'activité par rapport à un objectif, sur une période déterminée.

Exemple : Nombre d'analyses réalisées/Nombre d'analyses reçues par mois

Les indicateurs que nous avons mis en place ont été élaborés suite à une réflexion commune et très attentive car les indicateurs choisis doivent être :

- Précis,
- Fiables,
- Pertinents,
- Rapides à collecter et à trier,

- Synthétiques,
- Reproductibles.

A LGNA comme dans tout LBM les délais sont un paramètre important. Les délais à communiquer à l'ensemble des prescripteurs ont été définis en collaboration avec le responsable du laboratoire. Parmi les réclamations des prescripteurs, le non respect des délais est une cause fréquente. Pour cette raison, nous avons mis en place *les indicateurs* « *Nombre d'analyses non rendues dans les délais définis/Nombre d'analyses reçues* » et « *Nombre de réclamations par mois* ».

Pour suivre le processus « Réception d'une demande d'analyse », nous avons mis en place *l'indicateur* « *Nombre d'analyses conformes à la réceptions* ».

Afin d'avoir un reflet de la production technique, nous avons mis en place *les indicateurs* « *Nombre d'analyses réalisées/Nombre d'analyses reçues par mois* ». Ces indicateurs vont permettre de constater un problème au niveau de la réalisation technique des analyses ce qui peut avoir comme conséquence un non respect des délais.

L'indicateur « *Nombre de demandes d'analyses reçues par mois* » permet d'estimer la charge de travail par mois.

Nous avons décidé de suivre un nombre limité d'indicateurs car il est important de choisir les plus pertinents.

Ces indicateurs sont suivis dans un tableau de bord (**Figure 25**) qui reflète l'ensemble des activités d'intérêt majeur pour les patients. Pendant les revues de direction ce tableau de bord doit être analysé afin de comparer la situation réelle par rapport aux objectifs fixés.

	Non respect des délais			Conformité des analyses à la réception			Productivité des analyses de DA			Productivité des analyses de Séquence			Nombre de réclamations
	Nombre de demandes d'analyse non rendus dans les délais		%	Nombre d'analyses conformes à la réception	Nombre de demandes d'analyse reçues	%	Nombre d'analyses de DA réalisées	Nombre de demandes d'analyse DA reçues	%	Nombre d'analyses de séquence réalisées	Nombre de demandes d'analyse séquence reçues	%	
	Genyca	LGNA											
Juin													
Juillet													
Août													
Septembre													
Octobre													
Novembre													
Decembre													

Cible

Figure 25 : «Suivi des indicateurs »

Les indicateurs ont pour objectif de suivre certains éléments des différentes activités et permettent la fixation d’objectifs et une volonté de les atteindre.

5 Interprétation des résultats de pharmacogénétique en réponse à l’exigence de la norme « 4.7 Prestations de conseil »

Dans le cas des analyses génétiques réalisées à LGNA, un résultat de test génétique est en tant que tel une information médicale et non une simple mesure d’activité métabolique, ce qui justifie la nécessité d’associer systématiquement l’examen de génétique moléculaire et le conseil médical compétent, qualifié de conseil génétique. Pour cette raison une partie de mon travail a consisté dans l’analyse des voies métaboliques des médicaments et l’analyse des conséquences des changements du métabolisme à cause des polymorphismes génétiques.

Après l’administration orale, le médicament subit plusieurs phases – une absorption intestinale, une transformation hépatique et un effet sur la cible. Ces étapes sont assurées par des transporteurs et des enzymes dont l’expression peut varier en raison de la présence de polymorphisme génétique. Le médicament peut d’abord avoir un effet et ensuite être métabolisé par le foie, ou l’inverse. Ceci va jouer dans l’interprétation des résultats des

polymorphismes génétiques, d'où la nécessité de connaître précisément les mécanismes d'action et les voies métaboliques des médicaments.

L'interprétation d'un résultat génétique demande à être restituée dans un contexte clinique et biologique plus large. Pour cette raison les dossiers constitués ne peuvent pas aboutir à une conclusion d'une prise en charge thérapeutique précise. Ils constituent une aide à la prédiction de l'efficacité de traitement qui doit être ensuite revue dans le contexte des dossiers des patients.

Les molécules utilisées en chimiothérapie sont des médicaments à haut risque et nécessitent une recherche des variations alléliques dans les gènes concernés, avant toute prescription. Ces médicaments sont à l'origine d'effets secondaires graves ou leur métabolisme peut être modifié par des polymorphismes génétiques connus touchant une fraction élevée de la population. Dans cette catégorie sont présents également les anti-vitamines K et les immunodépresseurs.

Après une phase de recherche bibliographique les dossiers suivants ont été rédigés :

- Polymorphisme du gène TPMT et Azathioprine
- Polymorphisme du gène DPYD et 5-FU
- Polymorphisme du gène MTHFR et 5-FU, Méthotrexate
- Polymorphisme des gènes CYP2D6, CYP3A5, SULT1A1, UGT2B15 et Tamoxifène
- Polymorphisme du gène CDA et Gemcitabine
- Polymorphisme du gène UGT1A1 et Irinotécan

Dans les dossiers ci-dessous sont présentées l'étude et l'interprétation des conséquences des mutations de certains gènes sur l'efficacité et/ou la toxicité des anticancéreux qui sont des médicaments avec une marge thérapeutique étroite.

5.1 Polymorphisme génétique du gène TPMT et traitement par Azathioprine

1) Indications de l'Azathioprine (immunosuppresseur) :

- Prévention du rejet de la greffe chez les personnes ayant bénéficié d'une transplantation d'organe.
- Traitement des maladies dues à une anomalie du fonctionnement du système immunitaire : polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn et rectocolite hémorragique.
- Leucémie lymphoblastique aiguë.

2) Mode d'action :

Dans l'organisme l'Azathioprine est transformée en 6-mercaptopurine (6-MP) (**Figure 26**). L'effet immunosuppresseur provient de la métabolisation de la 6-MP par l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). La xanthine oxydase et la thiopurine S-méthyltransferase (TPMT) transforment la 6-MP en deux composés inactifs hépatotoxiques.

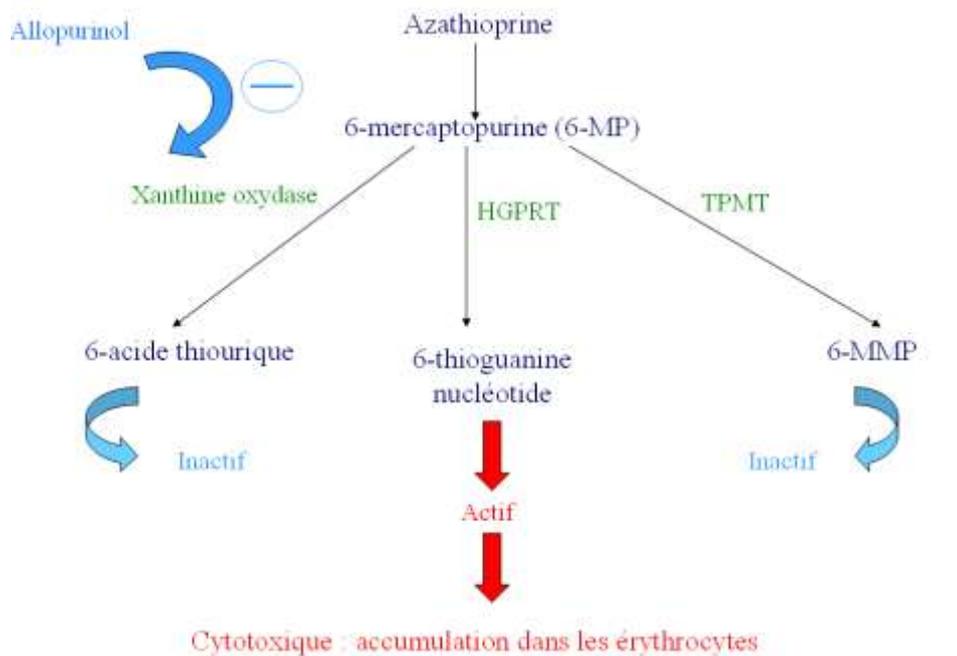


Figure 26 : « Mécanisme d'action de l'Azathioprine »

3) Caractéristiques pharmacogénétiques :

La TPMT est une enzyme qui métabolise les thiopurines. 88,6 % des sujets ont une activité élevée de TPMT ; 11,6% des sujets ont une activité intermédiaire (hétérozygotes) et chez 0,3% des sujets l'activité n'est pas détectée (homozygotes mutés) (9, 10).

La réduction d'activité de cette enzyme est causée, à 95%, par trois allèles : TPMT 2 (G238C), TPMT 3A (G460A et A719G) et TPMT 3C (A719G).

Ce type de polymorphisme génétique a été détecté parmi 80% des caucasiens métaboliseurs intermédiaires ou métaboliseurs lents. L'allèle TPMT 3C a été reporté en étant le plus commun dans la population japonaise (8).

4) Conséquences de la mutation :

Dans les tissus hématopoïétiques, la TPMT est la voie prédominante d'inactivation. Les patients qui présentent une déficience en TPMT accumulent des quantités excessives de thioguanine nucléotide après l'administration de doses standards d'azathioprine.

Plusieurs études ont démontré que les patients déficitaires en TPMT ont un risque élevé d'une toxicité hématologique sévère parfois fatale (11, 12).

Le déficit en TPMT a été associé à un risque élevé de tumeur cérébrale induit de l'irradiation, quand le traitement par thiopurines est concomitant avec une radiothérapie (13).

5) Adaptation posologique de l'Azathioprine :

La concordance entre le génotype et le phénotype de TPMT est de 98%. Le génotypage est sensible à 90% et spécifique à 99% dans l'identification des patients possédant un ou deux allèles non fonctionnels (14). Cette méthode permet de guider la thérapie par azathioprine.

Une activité basse ou nulle de TPMT peut provoquer, à un dosage conventionnel, une myélosuppression sévère, ce qui exige une réduction de la dose pour éviter la toxicité (6).

Le polymorphisme génétique de la TPMT est responsable chez les métaboliseurs lents des accidents myélotoxiques et chez les métaboliseurs rapides des rechutes et de l'hépatotoxicité.

Les patients déficitaires en TPMT peuvent développer des effets toxiques graves (aplasie médullaire) car la concentration des métabolites phosphorylés dans les tissus

hématopoïétiques augmente. L'association avec l'allopurinol peut provoquer des effets similaires de fait de son effet inhibiteur de la xanthine oxydase. Il est donc nécessaire de diminuer les doses d'Azathioprine des 2/3 ou des 3/4 de façon à ne pas dévier le métabolisme de l'azathioprine vers les composés toxiques.

Les patients métaboliseurs intermédiaires hétérozygotes peuvent recevoir 65% de la dose standard et les patients métaboliseurs lents homozygotes mutés peuvent recevoir 10% de la dose standard (7).

Les patients métaboliseurs rapides pour le TPMT présentent une diminution des métabolites actifs. Dans 10% des cas il y a un échappement thérapeutique. Malgré le faible effet immunosuppresseur, ces patients présentent une hépatotoxicité due à la 6-MMT(l'un des métabolites inactifs hépatotoxique).

5.2 Polymorphisme génétique du gène DPYD et traitement par 5-Fluorouracile

1) Indications du 5-fluorouracile (anti-métabolite) :

- Traitement de nombreux cancers.

2) Mode d'action :

La capécitabine est une prodrogue du 5-FU. Après administration le 5-FU s'engage dans deux voies : l'anabolisme et le catabolisme (**Figure 27**). L'anabolisme représente environ 10% à 20%. La majorité de la drogue (60% à 90%) est catabolisée par la DPD (dihydropyrimidine déshydrogénase) (18).

Ils existent trois voies anaboliques responsables de la cytotoxicité de 5-FU.

La principale voie de la cytotoxicité est l'inhibition de la synthèse endogène de la thymidine. Le 5-FU est transformé en 5-FdUMP (5-fluorodésoxyuridine monophosphate) qui inhibe la TS (thymidilate synthétase). Un radical méthyl, le 5,10-MTHF (5,10-méthylène-tetrahydrofolate) est nécessaire pour stabiliser le complexe 5-FdUMP-TS.

L'action cytotoxique des deux autres voies n'est pas très bien démontrée. L'une est l'incorporation du 5-FUTP (5-fluorouridine triphosphate) dans l'ARN ce qui empêche sa

3) Caractéristiques pharmacogénétiques :

L'incidence des mutations hétérozygotes dans la population serait de 3%, les homozygotes étant plus rares (0,1%) (26).

Plus de 40 mutations du gène DPYD liées à une faible activité enzymatique ont été décrites dans la littérature. Le manque de corrélation entre ces variations et le manque de données cliniques, limitent la connaissance de la corrélation génotype/phénotype. Il est nécessaire d'établir cette corrélation, afin d'apporter une réponse aux cliniciens concernant le risque de toxicité.

Une étude menée sur des patients caucasiens traités pour un cancer colorectal avancé par le 5-FU a permis d'enregistrer les principales mutations de DPYD (27) :

- IVS14+1G>A (DPYD*2A) est considérée comme étant la mutation la plus fréquente ;
- 2846A>T (D949V) est rarement cité dans la littérature ;
- Del TCAT295-298 (DPYD*7) ;
- 1156 G>T (E386Ter) ;
- 2657G>A (DPYD*9B) est responsable d'une fonction DPD à 25% par rapport à la normale ;
- G2983 (DPYD*10) ;
- -1590T>C est responsable d'une diminution de l'expression de DPYD.

L'analyse de la prévalence des différentes mutations démontre que le point de mutation G>A est le plus commun (52%). De plus 1,8% de la population allemande est hétérozygote pour l'allèle DPYD*2D (29).

L'analyse du gène DPYD de 14 patients déficients en DPD démontre la présence d'une mutation dans 11 des cas, dont 6 présentent la mutation IVS14+1G>A. (30).

Par ailleurs, une étude de Mattison et al. a démontré que la prévalence de déficit en DPD est supérieur dans la population afro-américaine par rapport à la population caucasienne (8% et 2,8% respectivement). De plus, la prévalence de déficit en DPD est supérieure chez les femmes afro-américaines comparée aux hommes afro-américains, aux femmes caucasiennes et aux hommes caucasiens (12.3%, 4.0%, 3.5%, et 1.9% respectivement) (33).

4) Conséquences de la mutation :

Certains malades atteints d'un déficit congénital partiel en DPD peuvent développer des toxicités sévères hématologiques et muqueuses avec parfois une atteinte neurologique qui peut aller jusqu'au coma (21,22,23). Parmi les toxicités graves, 10% à 20% sont des toxicités sévères (neutropénies, mucites, diarrhées), 35% à 70% sont des surtoxicités et 0,5% à 3% sont des décès toxiques. Une étude démontre que 55% des patients participants, avec un déficit partiel en DPD, souffrent d'une toxicité de stade IV (neutropénie) en comparaison avec les 13% des patients ayant une activité normale en DPD (30). La toxicité neurologique est causée par la toxicité directe d'un des métabolites actifs du 5-FU sur le tissu nerveux (24). La toxicité est due à une surexposition plasmatique : la demi-vie de 5-FU passe de 0,25h à 4h, d'où cette exacerbation de la toxicité iatrogène.

De plus une étude de Milano et al. démontre que 79% des patients qui présentent un déficit partiel en DPD et une toxicité sévère au 5-FU sont des femmes (31).

Remarque : Certaines mutations sont responsables de la surexpression de la DPD ce qui va provoquer la dégradation précoce de 5-FU avant sa transformation en drogue active efficace (25). Cette raison peut être liée à un échappement thérapeutique.

5) Adaptation posologique de 5-Fluorouracile :

Après un diagnostic de déficit complet en DPD, le traitement par 5-FU est une contre-indication absolue.

Chez les sujets hétérozygotes qui présentent un déficit partiel en DPD, l'adaptation individuelle de la dose du 5-FU est nécessaire. Un suivi pharmacocinétique peut être proposé, afin d'approcher la dose appropriée.

Si le ratio UH_2/U est :

- >6 : le dosage de 5-FU reste inchangé.
- Entre 3 et 6 : le dosage de 5-FU doit être réduit de 50% par rapport à la posologie standard et un suivi pharmacocinétique est proposé.

- Entre 1,5 et 3 : le dosage de 5-FU doit être réduit de 70% par rapport à la posologie standard et un suivi pharmacocinétique est proposé.
- <1,5 : l'administration de 5-FU n'est pas recommandée. Un traitement alternatif doit être discuté. Si toutefois il existe une obligation de l'administrer, il faut réduire la dose de 5-FU d'au moins 80% par rapport à la posologie standard. Il est nécessaire de contrôler la concentration plasmatique de 5-FU dans l'heure qui suit l'administration (28).

Le mode d'administration du 5-FU est également lié au développement de la toxicité. Une analyse des toxicités présentées par des patients atteints de cancer et traités par le 5-FU montre que les patients traités par de fortes doses de 5-FU développent plus souvent une toxicité de type neurologique que ceux recevant le 5-FU en perfusion continue. Les diarrhées, les nausées et les vomissements semblent indépendants du mode d'administration (32).

5.3 Polymorphisme génétique du gène UGT1A1 et traitement par Irinotécan

1) Indications de l'Irinotécan (inhibiteur de la topoisomérase) :

L'irinotécan est indiqué dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal avancé :

- en association avec le 5-fluorouracile et l'acide folinique chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie antérieure pour le stade avancé de leur maladie.
- en monothérapie après échec d'un traitement ayant comporté du 5-fluorouracile.

L'irinotécan en association avec le cetuximab est indiqué dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) après échec d'une chimiothérapie incluant de l'irinotécan.

L'irinotécan en association avec le 5-fluorouracile, l'acide folinique et le bevacizumab est indiqué dans le traitement de première ligne des patients présentant un carcinome métastatique du colon ou du rectum.

2) Mode d'action :

L'irinotécan est une prodrogue dont le métabolite SN-38 inhibe la topoisomérase I (**Figure 28**). L'irinotécan est tout d'abord métabolisé par plusieurs carboxyestérases en métabolite actif qui est le SN-38 (7-éthyl-10-hydroxycamptothécine) et qui est 1000 fois plus actif que la molécule mère. Environ 15 % de l'irinotécan sont éliminés sous forme inchangée par voie rénale. Le CYP3A4 transforme l'irinotécan en composé inactif qui est l'APC (acide aminopentanoïque).

L'activité cytotoxique de l'irinotécan est la conséquence de l'inhibition spécifique de l'ADN topoisomérase 1 qui est une enzyme essentielle dans la réplication de l'ADN. La toxicité est augmentée en phase S du cycle cellulaire. Le SN-38 possède une composante inhibitrice de l'acétylcholinestérase. Ceci peut être à l'origine d'un syndrome cholinergique aigu.

Les effets indésirables les plus fréquents liés aux concentrations circulantes de SN-38 sont la diarrhée et la neutropénie.

L'uridine-diphosphate glucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1) est la principale enzyme impliquée dans la détoxification du SN-38. D'autres isoformes de l'UGT sont impliquées dans la glucuroconjugaison du SN-38. Les dérivés glucuroconjugés sont par la suite éliminés par voie biliaire. Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) sont impliqués dans l'élimination biliaire de l'irinotécan. Les polymorphismes de ces enzymes et de ces transporteurs se traduisent par une hyperbilirubinémie.

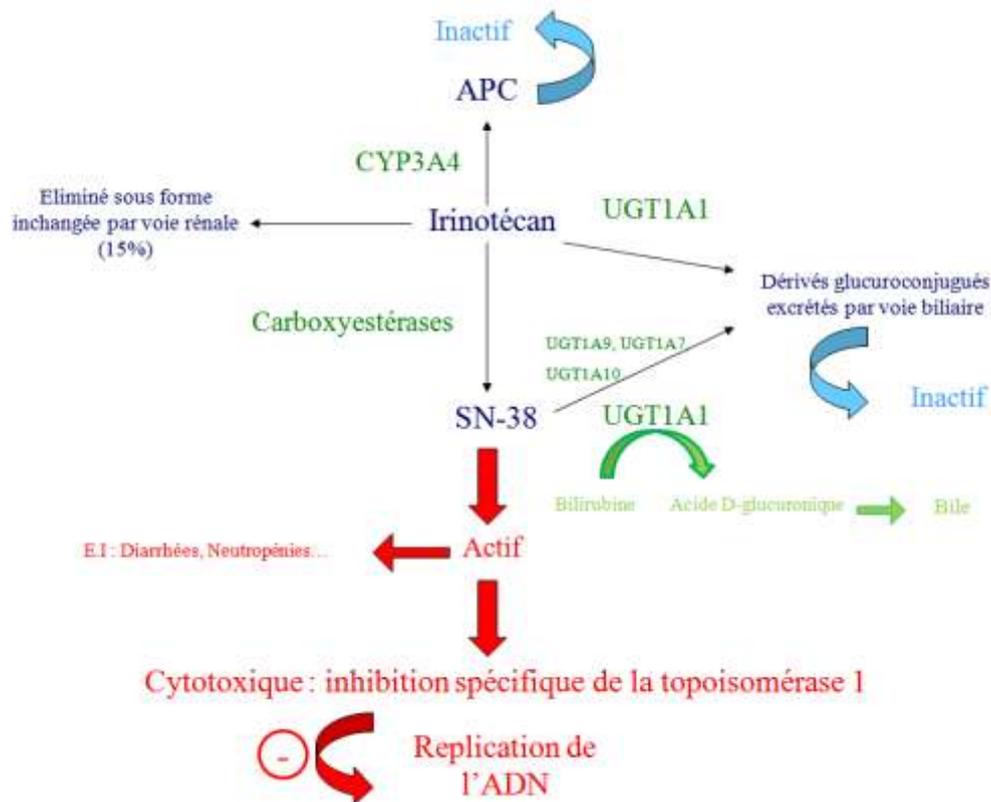


Figure 28 : « Mécanisme d'action de l'Irinotécan »

3) Caractéristiques pharmacogénétiques :

La présence d'un polymorphisme a été détectée au cours des premières études. En effet, la toxicité semble plus fréquente chez les sujets présentant une hyperbilirubinémie (34).

L'allèle sauvage est dénommé UGT1A1*1. L'allèle UGT1A1*28 possède 7 répétitions de TA au niveau de la séquence promotrice du gène « TATA box ». Dans la population caucasienne 50% des sujets sont homozygotes pour l'allèle UGT1A1*1. La proportion des sujets hétérozygotes pour l'allèle UGT1A1*28 est de l'ordre de 40 % et la proportion des sujets homozygotes mutés est d'environ 10% (35,38). Dans la population africaine la fréquence des sujets homozygotes pour l'allèle UGT1A1*28 s'élève à 20% et dans la population asiatique elle est de moins de 5% (36).

D'autres polymorphismes ont été identifiés en étant responsables de l'altération de l'activité de l'enzyme UGT1A1. Il s'agit des allèles UGT1A1*6, UGT1A1*27, UGT1A1*7 et UGT1A1*60.

La fréquence de l'allèle UGT1A1*6 dans la population asiatique est de l'ordre de 15%-24% avec une majorité de sujets homozygotes (36,48). Cet allèle est très rare dans la population caucasienne (36).

La fréquence de l'UGT1A1*60 dans la population asiatique est de 30% et dans la population caucasienne d'environ 50% (53).

4) Conséquences des mutations :

Les conséquences cliniques des mutations dépendent des différents génotypes et des haplotypes.

Les deux variants les plus étudiés sont UGT1A1*28 et UGT1A1*6.

Les différents polymorphismes sont à l'origine d'une diminution de l'expression de l'enzyme et par conséquent d'une diminution de l'activité de glucuroconjugaison. Dans ces cas, la concentration de SN-38 circulant augmente car son élimination diminue. Au niveau clinique l'effet se traduit par la majoration des effets secondaires tels que la neutropénie et la diarrhée.

L'UGT1A1*28 possède 7 répétitions de TA. L'activité de l'enzyme est diminuée de 70% par rapport à l'allèle sauvage UGT1A1*1 qui possède 6 TA (37). Le variant allélique possédant 8 TA a une diminution de l'activité de l'enzyme encore plus marquée que l'UGT1A1*28. De même, le variant possédant 5 TA (une répétition de moins par rapport à l'allèle sauvage) a une activité de l'enzyme plus forte que l'UGT1A1*1 (37). Cette constatation démontre une diminution de l'activité de l'UGT1A1 avec l'augmentation des répétitions de TA au niveau de la « TATA box ».

Avec la diminution de l'activité de l'UGT1A1 la conséquence directe est l'augmentation de la concentration plasmatique de la bilirubine non conjuguée. Cette perturbation biologique est connue sous le nom de la maladie de Gilbert. Des toxicités sévères suite à l'administration de l'irinotécan ont été notées chez les patients présentant une hyperbilirubinémie.

En effet, le risque relatif de neutropénie de grade 4, suite à l'administration de 350 mg/m² toutes les 3 semaines, a été de 9,3 pour les patients homozygotes pour l'allèle UGT1A1*28 (38). Plusieurs études ont démontré le lien direct entre la toxicité induite par l'irinotécan et la présence de l'allèle UGT1A1*28 (39,40,41). Il s'agit d'une exploration

pharmacocinétique qui démontre une augmentation significative de l'aire sous la courbe de la concentration de SN-38 en fonction de temps.

La présence de l'allèle UGT1A1*6 diminue l'activité de l'enzyme d'environ 50% (46,47). La prévalence de neutropénie de grade 4, suite à l'administration de 375 mg/m² toutes les trois semaines à des sujets asiatiques, a été de 100% (2/2), 25% (2/8) et 23% (8/35) chez les patients homozygotes pour l'allèle UGT1A1*6, hétérozygotes et homozygotes pour l'allèle UGT1A1*1 respectivement (49). La présence de l'allèle UGT1A1*28 chez des sujets asiatiques traités par l'irinotécan n'a pas démontré une augmentation de la sévérité de la neutropénie. Ceci peut être lié à la très basse fréquence de cet allèle dans la population asiatique. Par contre, l'association des deux allèles UGT1A1*28 et UGT1A1*6 est associée à une augmentation de la toxicité (50,51).

Une étude de Sai et al. (36) a démontré une liaison entre les différents allèles. Plusieurs combinaisons d'allèles ont été établies et n'ont pas la même probabilité d'apparition. Il est intéressant de connaître les associations, afin de guider le génotypage. Par exemple, le rapport AUC (area under the curve) SN-38 glucuronjugué/AUC SN-38 plasmatique est particulièrement diminué en présence des haplotypes *6/*28 et *6/*60. Pour cette raison il est important, au moment du diagnostic de la mutation *6, de rechercher celles qui lui sont associées.

5) Adaptation posologique :

Des recommandations précises en termes d'individualisation des doses restent à établir. Comme présenté plus haut le métabolisme de l'irinotécan est très complexe. Le SN-38 est également substrat d'autres isoenzymes de la super-famille des UDP-glucosyltransférases comme de l'UGT1A7 (42). La survenue de diarrhées semble être corrélée à l'existence non pas de l'UGT1A1, mais de l'UGT1A7. Cette enzyme est présente au niveau digestif mais non au niveau hépatique (43). Ceci laisse supposer qu'en cas de toxicité digestive il est préférable de rechercher le polymorphisme génétique au niveau d'UGT1A7 alors qu'en cas de toxicité systémique il est préférable d'orienter le diagnostic vers le polymorphisme d'UGT1A1. En effet, dans les études la diarrhée sévère et la neutropénie sévère sont souvent dissociées. Certaines mutations au niveau d'UGT1A7 ont pour conséquence une diminution de la

concentration plasmatique de SN-38 et donc une augmentation de la toxicité au niveau gastrique (56).

Par ailleurs, le métabolisme de SN-38 est lié à la super-famille des transporteurs membranaires ABC (ATP Binding Cassette). Des mutations au niveau de ces transporteurs ont été mises en évidence. Il s'agit, par exemple, de la protéine MDR1 (gène ABCB1) étudiée en relation avec la pharmacocinétique du SN-38 (44).

Des polymorphismes d'autres gènes sont liés à la toxicité de l'irinotécan comme XRCC1 et TDP1 (52).

Un polymorphisme de l'UGT1A9 est associé à une augmentation de l'activité de cette enzyme et à une augmentation de la glucuronidation de SN-38 (54). L'association des deux polymorphismes de l'UGT1A9 et de l'UGT1A1 pourrait avoir comme conséquence une élimination normale de SN-38. Ceci reste à prouver par des études cliniques car les conclusions des différentes études ne sont pas similaires à ce propos. Une étude incluant des sujets japonais n'a pas démontré d'influence de la mutation I399C>T au niveau d'UGT1A9 sur le risque de neutropénie de grade 4 après l'administration de l'irinotécan (55).

Tous ces paramètres doivent être pris en compte pour l'adaptation posologique de l'irinotécan.

En ce qui concerne l'UGT1A1*28, il est possible d'adapter les doses en fonction du génotype. La dose d'irinotécan devra être diminuée de 40% chez les patients homozygotes mutés (UGT1A1*28/ UGT1A1*28) et diminuée de 25 % chez les patients hétérozygotes (UGT1A1*28/UGT1A1*1).

Cette adaptation des doses concerne le premier cycle d'administration. Les modifications ultérieures devront être effectuées en fonction de la tolérance observée (45).

Il est important de prendre en compte, dans l'adaptation posologique de l'irinotécan, l'origine ethnique, les génotypes, les haplotypes et les polymorphismes de tous les gènes impliqués. Ces éléments constituent la difficulté d'adapter le traitement par irinotécan.

La population asiatique semble avoir une majoration de la neutropénie en présence de l'allèle UGT1A1*6, tandis que dans la population caucasienne il s'agit de l'allèle UGT1A1*28.

La neutropénie est encore plus sévère en présence des deux allèles. Dans ce cas il serait justifié de diminuer d'avantage les doses d'irinotécan.

La concentration du métabolite actif SN-38 dépend non seulement de l'activité de l'UGT1A1, mais aussi des transporteurs membranaires, des autres enzymes de glucuroconjugaison et de leurs polymorphismes respectifs.

Ci-dessous sont représentés les gènes qui interviennent dans le mécanisme d'action de l'irinotécan au niveau de la cellule cancéreuse (**Figure 29**).

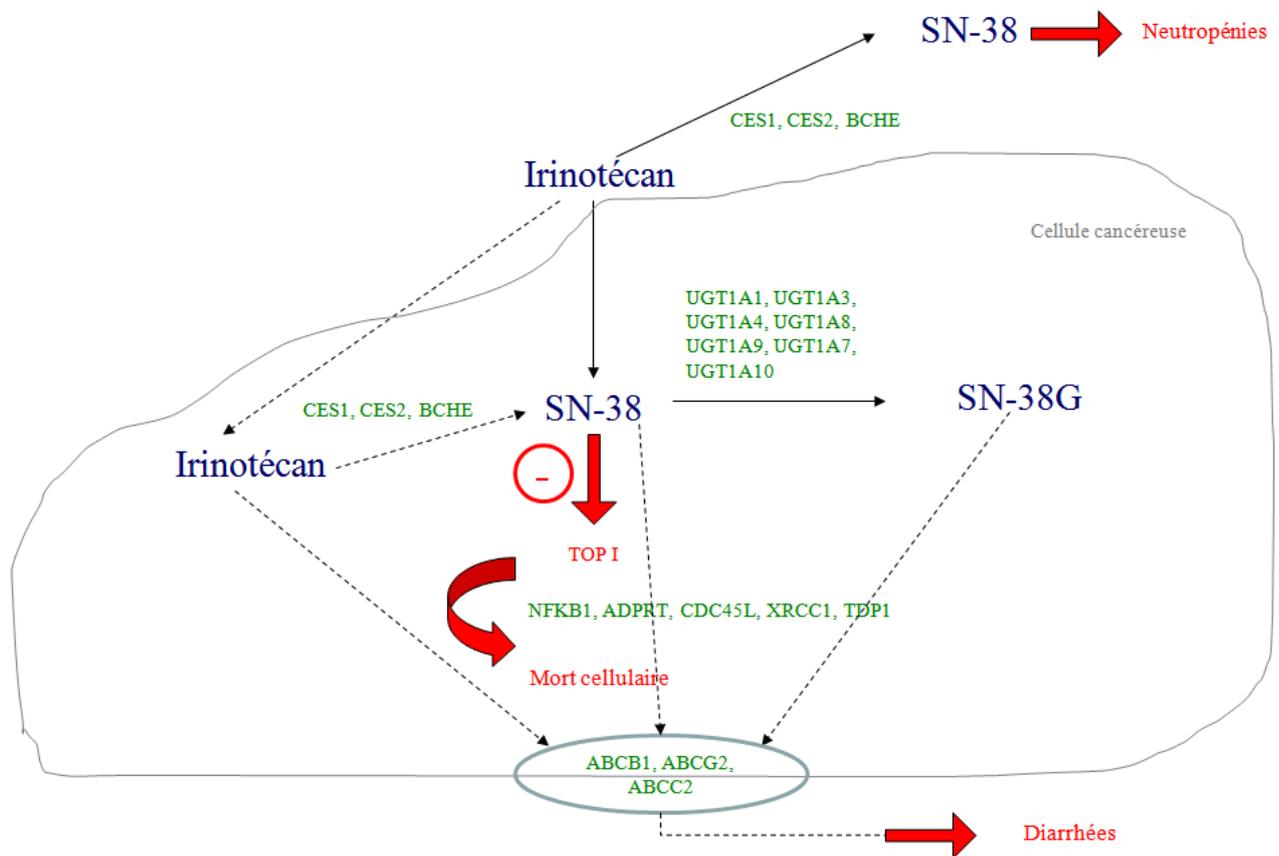


Figure 29 : « Gènes intervenant dans le mécanisme d'action de l'irinotécan »

L'influence des différentes variations au niveau de ces gènes sur l'administration de l'irinotécan ont été décrites (52). Enfin, pour pouvoir individualiser la traitement il faut tenir compte de toutes ces variations et de leurs conséquences.

5.4 Polymorphisme génétique du gène MTHFR et traitement par 5-Fluorouracile et Méthotrexate

1) Indications du 5-FU et du méthotrexate :

Les principales indications du méthotrexate sont les suivantes :

- Choriocarcinomes placentaires
- Adénocarcinomes mammaires et ovariens : traitement adjuvant ou après rechute
- Carcinomes des voies aérodigestives supérieures
- Carcinomes vésicaux
- Carcinomes bronchiques à petites cellules
- Leucémies aiguës lymphoblastiques : traitement d'entretien

A HAUTE DOSE ESSENTIELLEMENT :

- Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant (traitement de consolidation et prophylaxie de l'atteinte du système nerveux central)
- Lymphomes malins non hodgkiniens
- Ostéosarcomes

Le 5-FU est utilisé dans le traitement de nombreux cancers.

Le 5-FU et le méthotrexate sont utilisés en association dans le traitement de cancer colorectal et de cancer de sein.

2) Mode d'action :

Le métabolisme des folates est régulé par l'enzyme MTHFR (5,10-méthylènetetrahydrofolate réductase) (**Figure 30**). Cette enzyme est responsable de la conversion irréversible de 5,10-méthylènetetrahydrofolate (5,10-méthylèneTHF) en 5-méthyltetrahydrofolate (5-méthylTHF). Le 5,10-méthylèneTHF est nécessaire à la synthèse

d'ADN et le 5-méthylTHF est nécessaire aux réactions de méthylation de l'homocystéine en méthionine et au maintien de la méthylation de l'ADN (57,58).

Le 5,10-méthylèneTHF est un donneur de groupements méthyl et intervient dans la méthylation irréversible, catalysée par la TS (thymidilate synthétase), de dUMP (déoxyuridine-5'-monophosphate) en dTMP (déoxythymidine-5'-monophosphate). Ce dernier est un précurseur de la synthèse d'ADN. Le 5,10-méthylèneTHF est aussi impliqué dans la biosynthèse *de novo* des purines.

Le 5-FU est un antimétabolite. Plus haut sont détaillés les mécanismes d'action du 5-FU (« 5.2 Polymorphisme du gène *DPYD* et traitement par 5-Fluorouracile »). La voie cytotoxique principale étant l'inhibition de la TS (**Figure 30**). En effet, le 5FdUMP (5-fluoro-2'-déoxyuridine-5'-monophosphate) inhibe la conversion de dUMP en dTMP en inhibant la TS, ceci en présence de 5,10-méthylèneTHF (formation d'un complexe tertiaire).

Le MTX (méthotrexate) inhibe la DHFR (dihydrofolate reductase) et diminue ainsi la quantité du 5,10-méthylène THF ce qui inhibe directement la synthèse des purines. Le dihydrofolate accumulé peut inhiber la TS et les enzymes impliquées dans la synthèse des purines (59).

L'action des deux traitements est synergique. Le MTX inhibe la synthèse des purines, ce qui provoque une accumulation de PRPP (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate). Cette accumulation stimule l'orotate-phosphoribosyl-transférase qui transforme le 5-FU en 5-FUMP. Le 5-FUMP est phosphorylé en 5-FUTP et incorporé à l'ARN. Une méta-analyse de huit essais dans le cancer colorectal a démontré une augmentation de taux des réponses quand les deux traitements sont associés par rapport au 5-FU seul. L'association fréquente de l'acide folinique au MTX rend difficile l'interprétation des résultats (78).

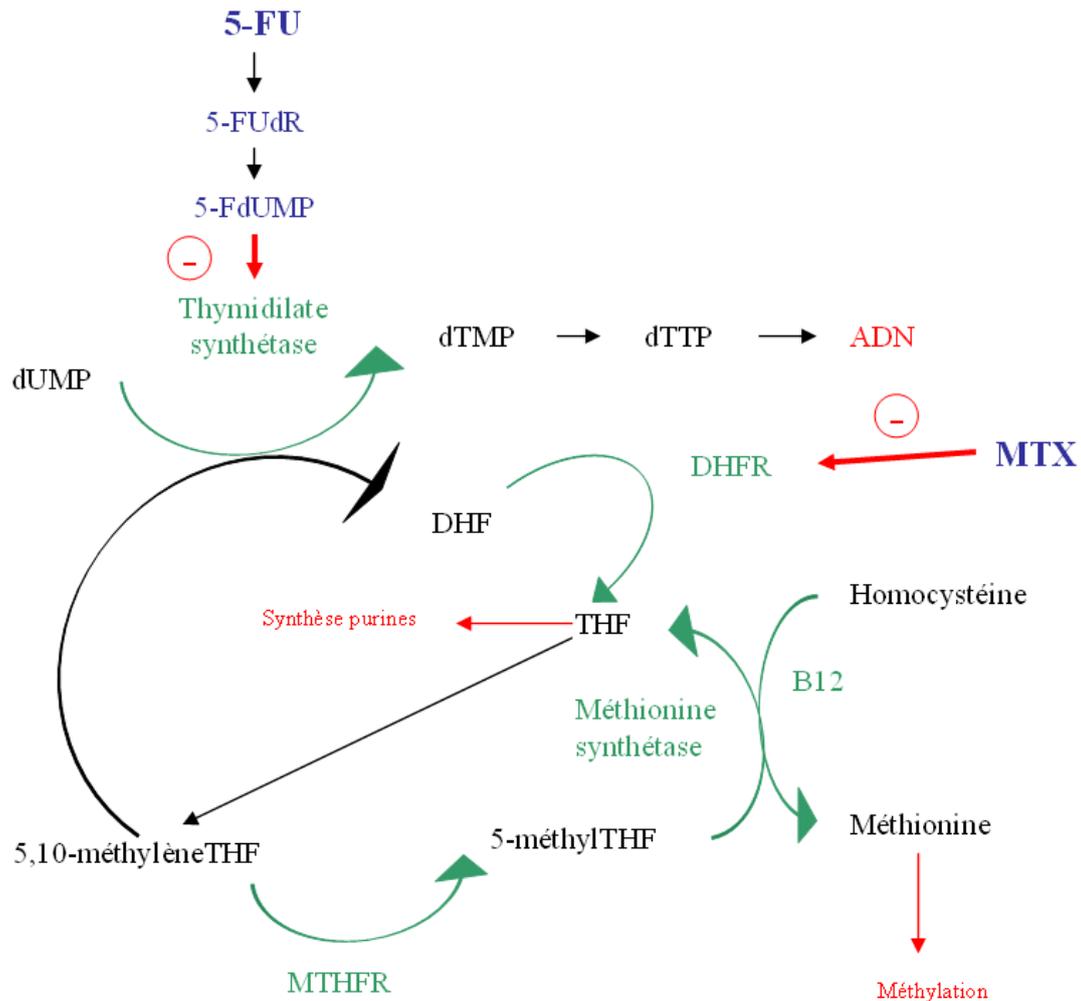


Figure 30 : « Mécanismes d'action du 5-FU et du méthotrexate »

3) Caractéristiques pharmacogénétiques :

Le polymorphisme génétique du gène MTHFR est présenté par deux allèles : 677C>T et 1298A>C. Ces deux polymorphismes ont été associés avec des phénotypes altérés et des effets indésirables. Les deux mutations sont responsables d'une baisse de l'activité de l'enzyme.

L'allèle 677C>T rend l'enzyme thermolabile et augmente les concentrations plasmiqes d'homocystéine. La fréquence de l'allèle C677T affecte 35% de la population de l'Amérique de nord. Le variant homozygote TT avec 30% de fonctionnalité de l'enzyme est présent dans 8%-10% de la population générale, principalement les caucasiens. Le variant hétérozygote

(CT) avec 60% de fonctionnalité de l'enzyme est présent dans 40% de la population (70,71,72,73).

L'allèle 1298A>C a été moins étudié. La fréquence des homozygotes (CC) approche les 12% des caucasiens et 3% des japonais (74,75).

4) Conséquences des mutations :

Les modes d'action du 5-FU et du méthotrexate dépendent de la concentration intracellulaire en folates.

La mutation 677T MTHFR provoque une diminution du 5-méthylTHF et une accumulation du 5,10-méthylèneTHF. Par conséquent, la concentration plasmatique en homocystéine augmente. Ces changements peuvent provoquer une hypométhylation de l'ADN et un risque de cancer colorectal (61, 62, 63, 64, 65).

L'accumulation du 5,10-méthylèneTHF stabilise le complexe tertiaire formé par l'action du 5-FU et potentialise l'inhibition de la TS. De même l'acide folinique (5'-formylTHF) est le précurseur du 5,10-méthylèneTHF et potentialise l'effet cytotoxique de 5-FU (60).

En ce qui concerne les effets des polymorphismes du gène MTHFR sur l'action du MTX, les avis sont très partagés.

L'effet cytotoxique de MTX peut être compromis par l'accumulation du 5,10-méthylèneTHF car la mutation interagit directement avec le mode d'action du MTX. L'augmentation de 5,10-méthylèneTHF est responsable de l'augmentation de la synthèse de TS et des purines, ce qui diminue l'action de MTX. Une étude de *Kyoung-Jin Sohn and al.* a démontré que la mutation C677T diminue la chimiosensibilité au MTX des cellules cancéreuses du sein, tandis qu'elle n'affecte pas la sensibilité au MTX des cellules cancéreuses du colon (76).

Une étude réalisée sur l'homme a démontré que le génotype MTHFR homozygote TT peut augmenter la toxicité de MTX seul ou en association administré chez les patients présentant une transplantation de la moëlle osseuse, une leucémie, un cancer de l'ovaire et un cancer de sein (66,67,68,69). Dans une étude retrospective de *Urano and al.* 106 patients qui souffrent d'arthrite rhumatoïde ont subi un génotypage. Tous ces patients ont reçu du MTX. Les patients avec l'allèle 1298C ont nécessité des doses moins élevées de MTX, tandis que les

patients avec l'allèle 677T ont été sujets d'effets indésirables (symptômes gastro-intestinaux, hépatotoxicité) (75).

Dans l'étude de *Morgan and al.* la supplémentation en acide folique permet de diminuer les effets indésirables liés à l'administration de MTX sans réduire son efficacité (77).

Nous pouvons supposer que si les deux traitements sont administrés en association et en présence d'un polymorphisme du gène MTHFR, leur action peut être synergique. En effet, l'accumulation de 5,10-méthylèneTHF peut diminuer l'action de MTX, mais cette diminution pourrait être compensée par l'action inhibitrice de 5-FU sur la TS.

5) Adaptation posologique :

En raison des informations différentes contenues dans la littérature, il n'est pas possible de donner une adaptation posologique de ces deux anticancéreux.

Plusieurs études ont été menées in vitro et in vivo. Toutefois l'effet de polymorphisme du gène MTHFR sur la sensibilité et les effets secondaires du 5-FU et du MTX doit être confirmé dans des essais cliniques avec un large groupe de patients.

Plusieurs paramètres doivent être pris en compte comme la TS, la DHFR, la méthionine synthétase et la concentration physiologique en folates.

5.5 Polymorphisme génétique du gène CDA et traitement par Gemcitabine

1) Indications de la Gemcitabine (analogues nucléosidique pyrimidique) :

- Cancer bronchique non à petites cellules, localement avancé ou métastatique
- Adénocarcinome du pancréas localement avancé ou métastatique
- Cancer de la vessie au stade invasif
- Cancer du sein métastatique, en rechute après une chimiothérapie adjuvante/néoadjuvante, en association au paclitaxel. La chimiothérapie antérieure doit avoir comporté une anthracycline sauf si celle-ci est cliniquement contre-indiquée

2) Modes d'action :

La Gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) subit une activation après sa pénétration dans la cellule (**Figure 31**). La deoxycytidine kinase (DCK) transforme la gemcitabine en forme monophosphate qui est ensuite transformée en forme diphosphate par la deoxycytidylate kinase (UMP-CMPK). La forme active est la forme triphosphate qui s'incorpore dans l'ADN et inhibe sa synthèse (79). Deux enzymes sont impliquées dans l'inactivation de la gemcitabine et de la gemcitabine monophosphate. Il s'agit de la cytidine désaminase (CDA) et de la deoxycytidylate désaminase (DCTD).

En cas d'une diminution de la concentration de la gemcitabine triphosphate active, il y a une activation de la DCK qui va accélérer la phosphorylation de la gemcitabine.

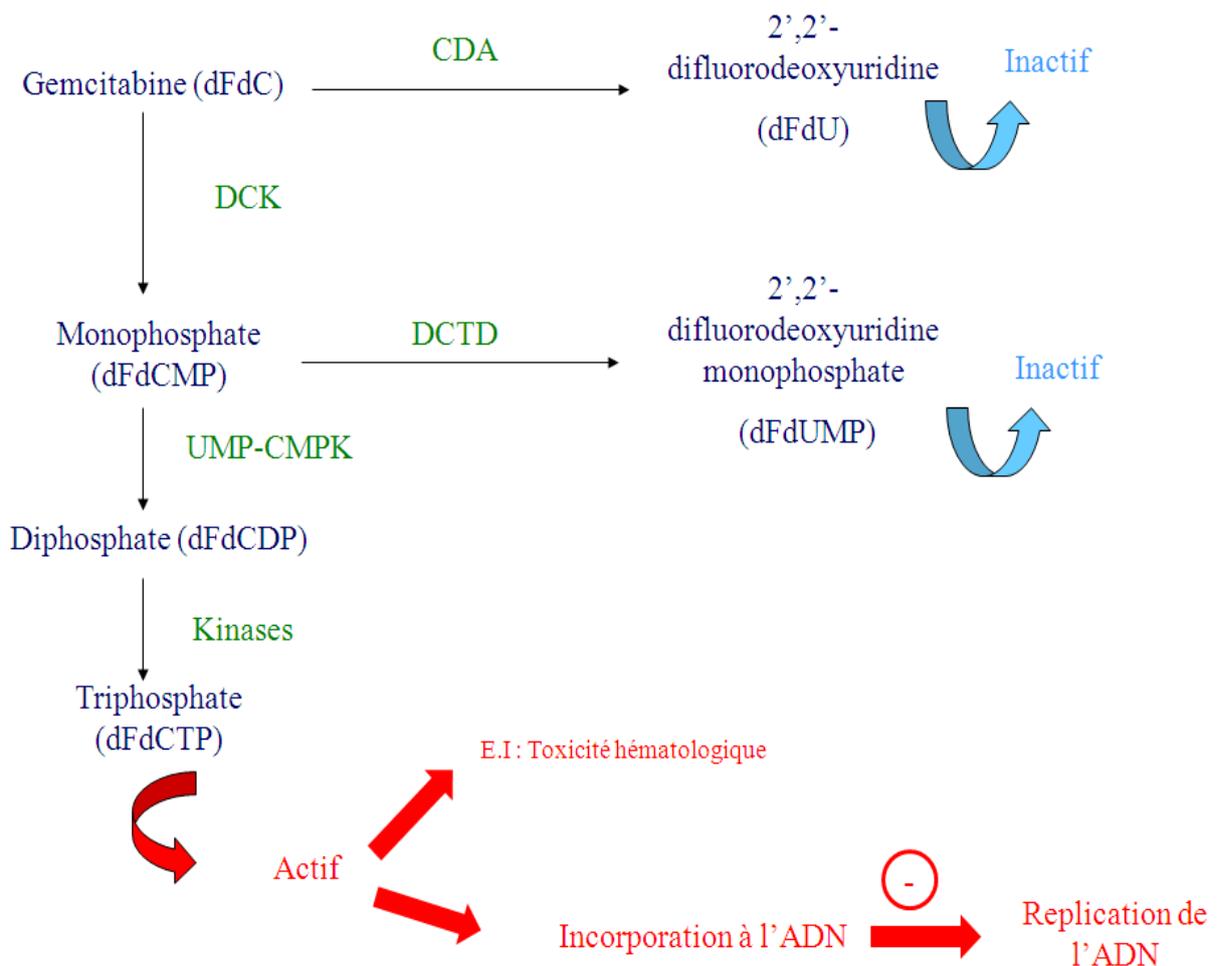


Figure 31 : « Mécanisme d'action de la Gemcitabine »

3) Caractéristiques pharmacogénétiques :

Dans une étude (80) réalisée avec des participants de la population africaine et caucasienne, 17 polymorphismes de gène CDA ont été observés. Un polymorphisme commun a été repéré. Il s'agit du 79 A>C (Lys27Gln). La fréquence de ce polymorphisme dans cette même étude a été de 10,8% parmi les sujets africains et de 29,8% parmi les sujets caucasiens.

Un autre polymorphisme a été mis en évidence au cours d'une étude sur des sujets japonais (81). Ce polymorphisme est le 208 G>A qui a une fréquence de 4,3% dans la population japonaise (83). C'est un polymorphisme qui n'a pas été détecté chez les européens mais sa fréquence est de 0,125 dans la population africaine (84).

La fréquence des sujets homozygotes pour la mutation 208 G>A est de 0,18% dans la population japonaise et de 1,56% dans la population africaine (83,84).

4) Conséquences des mutations :

La CDA est l'enzyme qui permet l'élimination de la gemcitabine. Le polymorphisme génétique au niveau du gène CDA a pour conséquence une diminution de l'activité de cette enzyme et donc une augmentation de la toxicité. Ceci est dû d'une part à une augmentation de la formation de la gemcitabine triphosphate, et d'autre part à une diminution de l'élimination de la gemcitabine.

Les polymorphismes au niveau du gène CDA, et plus particulièrement le 79 A>C, sont caractérisés par une baisse d'activité de cette enzyme d'environ 30%-40% par rapport au type sauvage (80).

Les sujets homozygotes mutés pour la mutation 208 G>A au niveau du gène CDA dans la population japonaise sont susceptibles de présenter une toxicité sévère suite à l'administration de la gemcitabine (81). L'étude a été réalisée seulement sur 6 sujets et n'est pas très représentative mais elle démontre que la toxicité peut être hématologique ou non hématologique. La présence de ce polymorphisme est responsable d'une perte d'activité enzymatique de 40% par rapport au type sauvage (83).

La toxicité hématologique est dose-dépendante et se présente sous forme d'une leucopénie, une anémie et une thrombocytopenie (82).

Une autre étude (85) a été menée afin d'évaluer les conséquences cliniques de la mutation 79 A>C du gène CDA chez les patients atteints d'un cancer de poumons recevant

une association de gemcitabine et cisplatine. Dans cette étude il a été démontré que la clairance des patients qui sont sujets de cette mutation est diminuée de 21 % en comparaison de celle des patients présentant l'allèle sauvage. Ceci n'a pas eu comme conséquence l'augmentation de risque de neutropénie chez ces patients. Plusieurs études sont à mener afin d'établir le lien direct entre le polymorphisme du gène CDA, l'activité plasmatique de cette enzyme et les conséquences cliniques des mutations.

5) Adaptation posologique :

Des études sur l'adaptation posologique de la gemcitabine en cas de polymorphisme du gène CDA n'ont pas été publiées.

Plusieurs études doivent être réalisées pour permettre l'ajustement du traitement par les cliniciens en cas de polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme de la gemcitabine.

Il a été démontré qu'il existe un risque d'augmentation de la toxicité d'où la nécessité d'effectuer le génotypage et d'utiliser cette molécule avec précaution chez les patients qui présentent des mutations.

Pour pouvoir adapter la posologie de la gemcitabine plusieurs éléments interviennent. Le métabolisme de cette molécule est complexe car plusieurs enzymes sont impliquées. Elle est également prescrite souvent en association dans une chimiothérapie. Des études doivent être réalisées afin d'élucider l'impact de tous les éléments sur l'administration de la gemcitabine.

Un autre polymorphisme doit être étudié en parallèle de celui du gène CDA. En effet, le DCTD présente 29 polymorphismes (80). La présence de la mutation 172 A>G (Asn58Asp) a pour conséquence une diminution de 90% de l'activité de cette enzyme par rapport au type sauvage.

5.6 Polymorphisme génétique des gènes CYP2D6, CYP3A5, SULT1A1, UGT2B15 et traitement par Tamoxifène

1) Indications du tamoxifène (anti-estrogène) :

- Traitement du carcinome mammaire :
 - ✓ soit en traitement adjuvant (traitement préventif des récurrences)
 - ✓ soit des formes évoluées avec progression locale et/ou métastatique

L'efficacité de cette thérapeutique est plus importante chez les femmes dont la tumeur contient des récepteurs de l'estradiol et/ou de la progestérone.

2) Mode d'action :

Le tamoxifène est une prodrogue. L'action principale est le blocage des récepteurs oestrogéniques. Le complexe formé inhibe la synthèse de l'ARN dans la cellule tumorale (**Figure 32**). Il inhibe la sécrétion des facteurs de croissance TGF et EGF médiés par les estrogènes. Le CYP2D6 participe à la synthèse du métabolite actif du tamoxifène.

Le TAM a une affinité très faible pour les récepteurs aux oestrogènes. Il est métabolisé principalement en N-desméthyl-tamoxifène (N-desméthylTAM) par le CYP3A5 et CYP3A4 et ensuite par le CYP2D6 en endoxifène (4-hydroxy-N-desméthyl-tamoxifène). Le TAM est directement métabolisé en 4-hydroxy-tamoxifène (4-hydroxyTAM) par le CYP2D6 qui à son tour est métabolisé en endoxifène par le CYP3A4 et le CYP3A5. Le 4-hydroxyTAM et l'endoxifène ont une affinité similaire à celle de l'estradiol (88,89). Ces deux métabolites de TAM se fixent sur les récepteurs aux oestrogènes et arrêtent la croissance des cellules (90,91). Les composés d'élimination biliaire sont obtenus par les enzymes SULT1A1 et UGT2B15 (92).

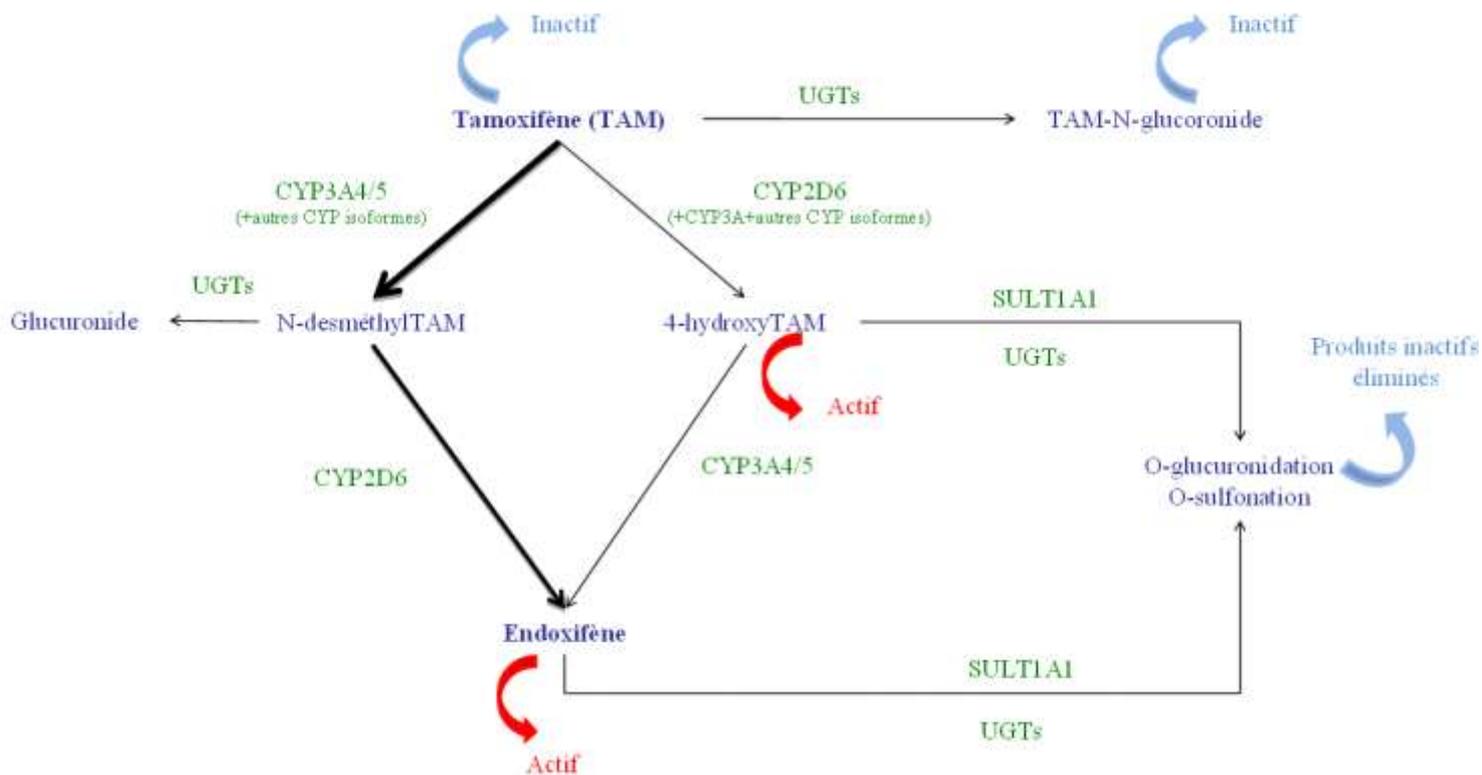


Figure 32 : « Mécanisme du tamoxifène »

3) Caractéristiques pharmacogénétiques :

Ils existent de très nombreux polymorphismes du CYP2D6 (plus de 40).

En routine, afin d'identifier plus de 90% des métaboliseurs lents, 4 principaux allèles déficients sont recherchés : CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 et CYP2D6*6. Il convient également de prendre en compte que le gène CYP2D6 peut être dupliqué (voir répliqué jusqu'à 13 copies) ce qui caractérise le phénotype de métaboliseur ultrarapide.

La fréquence des duplications/multiplications est de l'ordre de 1% à 5% chez les Caucasiens, de 2% chez les Africains, de 0% à 2% chez les asiatiques et de 10% à 16% chez les populations d'Éthiopie et Arabie Saoudite (96).

La fréquence allélique des métaboliseurs lents pour le CYP2D6 est de 5% à 10% dans la population caucasienne, de 0,7% dans la population chinoise et japonaise, de 2% dans le Moyen Orient et de 6,1% dans la population afro-américaine (86,87).

La fréquence allélique du variant génétique CYP2D6*4 est de 12% à 30% dans la population caucasienne et d'environ 2% dans la population asiatique et africaine. C'est le variant le plus rencontré dans la population caucasienne. Dans la population africaine le variant le plus fréquent (20% à 35%) est le CYP2D6*17 et dans la population asiatique le CYP2D6*10 (38% à 70%). L'allèle le plus commun responsable du statut ML est le CYP2D6*4 (99).

Ce qui concerne la fréquence allélique de CYP3A5*3, elle est de 88% dans la population caucasienne, de 75% dans la population asiatique et de 35 % dans la population africaine.

La fréquence allélique de SULT1A1*2 est de 33% dans la population caucasienne, de 0% à 8% dans la population asiatique et de 30% à 40% dans la population africaine.

4) Conséquences des mutations :

Les conséquences des mutations les plus étudiées sont celles de CYP2D6*4 et SULT1A1*2.

Les conséquences des mutations sont annoncées théoriquement et en se basant sur le mécanisme d'action du tamoxifène. Des études cliniques ne suffisent pas à affirmer avec certitude l'impact des différentes mutations.

Le résultat des mutations au niveau des gènes CYP3A5, CYP2D6 et SULT1A1 est la baisse d'activité de ces enzymes. La mutation au niveau du gène UGT2B15 est à l'origine de l'augmentation de l'activité de cette enzyme.

Un déficit en CYP3A5 et/ou CYP2D6 provoque une diminution des concentrations des métabolites actifs. Un déficit en SULT1A1 provoque une diminution de l'élimination des métabolites actifs et par conséquent une augmentation de leurs concentrations plasmatiques.

Une augmentation de l'activité de l'enzyme UGT2B15 a pour conséquence une augmentation de l'élimination du tamoxifène et donc une diminution de la formation des métabolites actifs.

La mutation du gène SULT1A1 diminue la sulfoconjugaison des métabolites actifs, mais n'a pas d'influence sur leurs concentrations plasmatiques si UGT2B15 est active car c'est l'autre voie alternative qui prendra en charge l'élimination des métabolites actifs (93,94,95).

Les ML, donc à faible activité CYP2D6, ont une concentration plasmatique d'endoxifène diminuée.

Pour les sujets ML pour le CYP2D6 il existe un risque d'échappement thérapeutique et par conséquent, une augmentation du risque de rechute. Si au contraire le sujet est MUR il va se produire un blocage renforcé des récepteurs aux oestrogènes.

L'endoxifène va non seulement être responsable de l'effet thérapeutique mais également des effets secondaires. Ceci laisse supposer que les sujets MUR auront une majoration des bouffées de chaleur.

5) Adaptation posologique :

Il est nécessaire de réaliser le diagnostic du polymorphisme génétique concernant le CYP2D6 avant d'instaurer le traitement par Tamoxifène.

Le tamoxifène est parfois prescrit avec des antidépresseurs, tels que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et la norépinephrine. Il a été démontré que la prescription concomitante de ces molécules diminue la concentration plasmatique de l'endoxifène. L'inhibition de CYP2D6 est responsable de la diminution de l'efficacité du tamoxifène par un mécanisme d'inhibition de l'activation du tamoxifène. Les effets de cette inhibition sont d'encore plus accentués quand le polymorphisme du gène CYP2D6, à l'origine des ML, est associé à la prise de paroxétine et fluoxétine (97).

Les ML et les MUR nécessitent un ajustement des doses. Les patients homozygotes porteurs de deux allèles mutés ont une concentration significativement diminuée d'endoxifène par rapport aux patients portant un ou deux allèles fonctionnels (98). Les sujets qui possèdent 1 allèle actif et 1 allèle inactif de gène CYP2D6 devraient avoir un métabolisme normal, mais avec des effets secondaires accentués comparés aux sujets avec deux allèles actifs.

En effet, le génotypage peut prédire la réponse au tamoxifène. Une étude (100) a démontré que le bénéfice du traitement est augmenté chez les sujets possédant l'allèle CYP2D6*4 et/ou qui sont homozygotes pour le SULT1A1*1 comparés aux sujets homozygotes pour le CYP2D6*1 et qui possèdent l'allèle SULT1A1*2. Ceci laisse supposer que l'allèle SULT1A1*1 contribue à l'amélioration de la réponse au tamoxifène. Les sujets dont le génotype correspond à ce premier groupe de patients peuvent en effet avoir une

réponse au tamoxifène. En revanche, il est préférable de prescrire un inhibiteur d'aromatase si les patients sont traités par tamoxifène et sont ML pour le CYP2D6 (homozygotes).

Si les patients sont MUR pour le CYP2D6, il est possible de jouer sur les intervalles de temps entre les administrations.

6 Validation de la méthode analytique de discrimination allélique

Les tests génétiques et le matériel utilisé doivent être validés avant le diagnostic réalisé en vue de fournir des résultats d'analyses aux prescripteurs. La validation des méthodes analytiques fait partie des « Exigences techniques » de la norme ISO 15189.

Le laboratoire doit démontrer que les méthodes d'analyse utilisées sont adaptées et fiables avant d'utiliser les échantillons fournis par les patients.

Le comité technique ISO/TC 212 (analyses cliniques et analyses de diagnostic in vitro) travaille sur la révision de la norme ISO 15189. La version de 2012 a détaillé un peu plus les exigences de validation WG1 ISO/TC 212) :

- Le laboratoire doit valider les méthodes non standardisées, les méthodes développées par le laboratoire lui-même, les méthodes standardisées mais utilisées en dehors leur champ d'application et les méthodes validées mais qui sont modifiées par le laboratoire.
- Quand la méthode a été validée par le fabricant ou par l'auteur d'une publication, le laboratoire doit obtenir toute l'information qui confirme que les performances de la méthode sont appropriées à l'utilisation prévue. En cas de changement de certains paramètres de la méthode, l'impact de ces changements doit être documenté et peut nécessiter une nouvelle validation.
- Les méthodes validées utilisées à l'identique au laboratoire doivent faire l'objet d'une vérification sur site avant leur utilisation en vue de fournir des résultats d'analyse. La vérification de la performance de la méthode confirme l'obtention des résultats attendus dans les conditions d'utilisation au laboratoire.

La validation et la vérification sont deux procédures distinctes. A LGNA les méthodes sont développées en interne et nécessitent une validation.

Plusieurs paramètres mesurables doivent être pris en compte pendant la validation et la vérification de performance. L'évaluation de l'exactitude d'une méthode est différente en fonction du type de la méthode. Il existe deux types de méthodes :

- Quantitatives
- Qualitatives

Les méthodes qualitatives n'apportent pas d'information sur la quantité de l'analyte, mais seulement sur sa présence ou absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée. Les paramètres à évaluer pour ce type de méthodes sont :

- Spécificité
- Sensibilité
- Contamination
- Stabilité
- Robustesse
- Comparaison avec une autre méthode (de référence et/ou utilisée au laboratoire)

Les méthodes quantitatives fournissent un résultat chiffré. Les paramètres à évaluer pendant la validation de ce type de méthodes sont :

- Spécificité
- Fidélité
- Justesse
- Intervalle de mesure
- Incertitude
- Contamination
- Stabilité des réactifs
- Robustesse

- Interférences
- Intervalle de référence et la comparaison avec une autre méthode (de référence et/ou utilisée au laboratoire)

Dans la validation des méthodes il est très important de documenter les essais. Dans un dossier de validation il est impératif de conclure sur l'aptitude de la méthode.

La norme ISO 15189 n'a pas détaillé comment la validation doit être effectuée précisément, donc il est important d'avoir une approche pragmatique. C'est le laboratoire qui doit décider de la manière par laquelle il va démontrer la fiabilité et la performance des méthodes utilisées.

6.1 Etat des lieux

A LGNA les trois méthodes d'analyses utilisées sont (**Figure 33**):

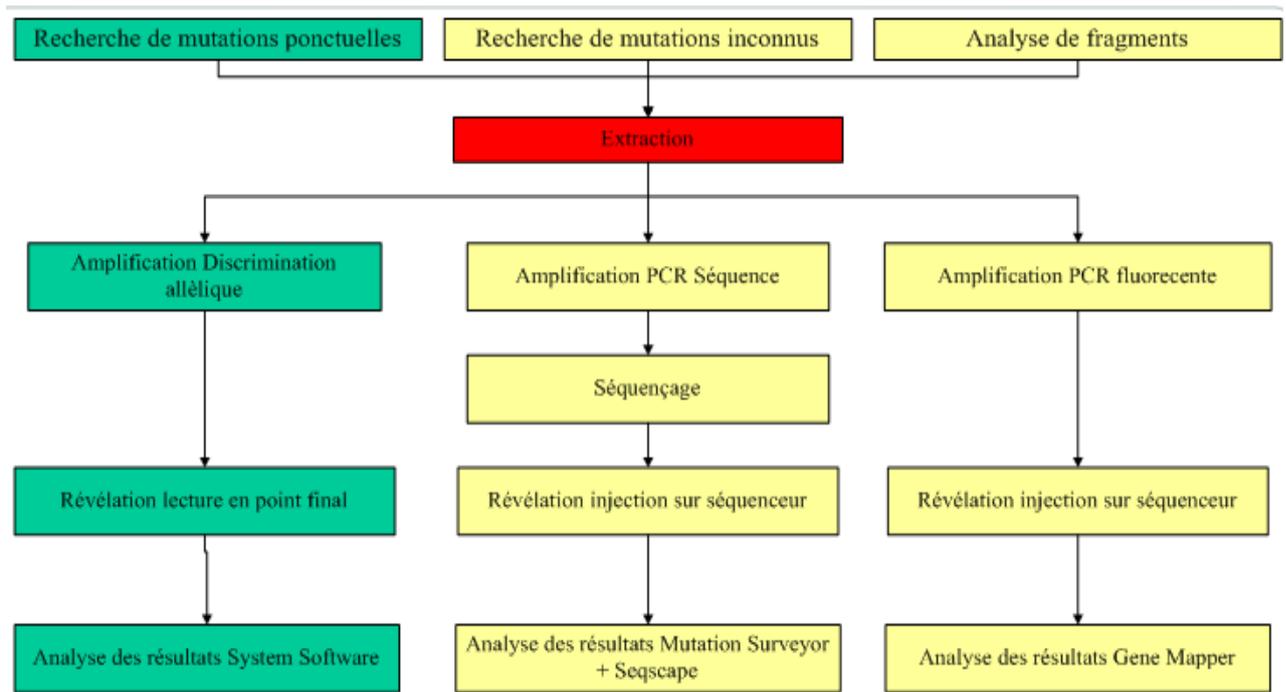
- Discrimination allélique : méthode utilisée pour la recherche de mutations ponctuelles ;
- Séquence : méthode utilisée pour la recherche de mutations inconnues ;
- PCR fluorescente : méthode utilisée pour l'analyse des fragments.

Douze demandes, dont les analyses de pharmacogénétique, sont réalisées par la méthode de Discrimination allélique. Dans le but d'inclure ces analyses dans le champ d'accréditation, la performance de la méthode doit être confirmée.

La validation de méthode dans un laboratoire de génétique est une partie très délicate à aborder et nécessite une réflexion. Avant de commencer la réalisation des essais la validation doit être attentivement planifiée.

Chaque analyse peut comporter plusieurs gènes à analyser et plusieurs couples d'amorces spécifiques des mutations étudiées peuvent intervenir.

La discrimination allélique est une méthode qui fournit un résultat de type qualitatif.



Recherche mutations ponctuelles	Recherche mutations inconnus	Analyse des fragments
DMLA (2 gènes, 2 couples d'amorces)	Béta-thalas sémie (1 gène, 4 couples d'amorces)	Chromosome Y (8 couples d'amorces)
Drépanocytose (1 gène, 1 couple d'amorces)	Glaucome (4 gènes, 49 couples d'amorces)	TS (1 couple d'amorces)
Hémochromatose (1 gènes, 2 couples d'amorces)	Mucoviscidose (1 gène, 8 couples d'amorces)	UGT1A1 (1 couple d'amorces)
Thrombose (3 gènes, 3 couples d'amorces)	Rétinite pigmentaire (7 gènes, 86 couples d'amorces)	
CDA (3 couples d'amorces)		
CYP2D6*4 (1 couple d'amorces)		
CYP3A5*3 (1 couple d'amorces)		
DPYD (4 couples d'amorces)		
MTHFR (2 couples d'amorces)		
SULT1A1*2 (1 couple d'amorces)		
TPMT (3 couples d'amorces)		
UGT2B15*2 (1 couple d'amorces)		

Figure 33 : « Etat des lieux des méthodes d'analyses utilisées pour l'ensemble des analyses réalisées à LGNA »

Les échantillons utilisés pour l'analyse sont soit des extractions faites à partir de la salive ou de sang sur carte FTA, soit de l'ADN extrait par d'autres laboratoires. L'étape de l'extraction d'ADN est commune aux trois méthodes. Les prélèvements sont déposés sur carte FTA, l'ADN est extrait avec un kit de billes magnétiques. L'extraction fera donc l'objet d'une seule validation commune aux trois méthodes.

Pour la réalisation de la discrimination allélique, les extraits d'ADN sont amplifiés en présence de deux sondes spécifiques – une de l'allèle normal et une de l'allèle muté, ainsi qu'avec des amorces spécifiques du fragment étudié. Chaque sonde, couplée à un fluorophore, s'hybride sur la séquence complémentaire.

L'appareil utilisé est l'*Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System*. La méthode est basée sur la PCR en temps réel. Celle-ci nécessite une Taq Polymerase avec une activité 5'-3' exonuclease et une sonde : oligonucléotide spécifique d'un fragment interne à la séquence amplifiée. La sonde est marquée en 5' par un fluorophore appelé « reporter » et en 3' par un autre type de fluorophore appelé « quencher ». Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du reporter est alors atténué ou « quenché » (éteint) quant les deux fluorophores sont proches (sonde entière).

Quand la sonde est dégradée par l'activité exonuclease de la Taq (lors de la phase d'élongation : **Figure 34**), les fluorophores ne sont plus assez proches. L'émission du reporter est alors augmentée. Cette augmentation de signal sera proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de PCR.

Dans le cas de la méthode de discrimination allélique, il faut différencier les ADN « sains » ou « mutés ». Pour cela, deux sondes sont utilisées : l'une couplée au fluorophore VIC[®] reconnaît spécifiquement l'allèle 1 et l'autre couplée au fluorophore FAM[™] reconnaît spécifiquement l'allèle 2. L'augmentation d'un ou l'autre des signaux indique alors la présence ou l'absence de la mutation recherchée. Si les intensités des deux signaux sont proportionnelles, cela signifie que le sujet est hétérozygote pour la mutation étudiée et possède les deux allèles.

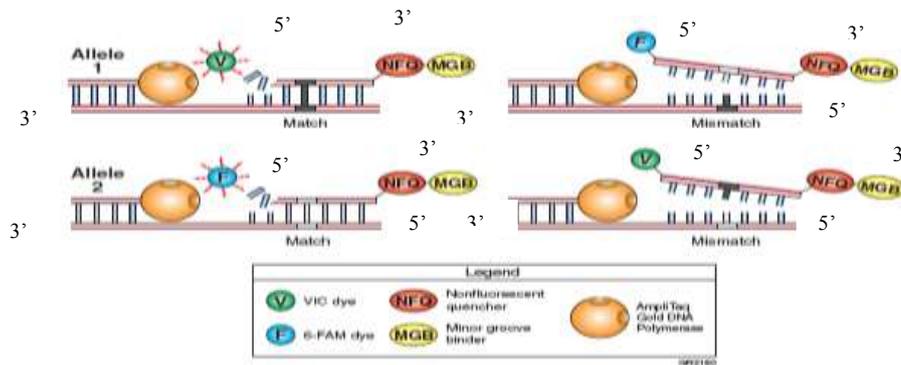


Figure 34 : « Technique de Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System »

Après plusieurs réunions les objectifs ont été clairement identifiés et les paramètres suivants ont été évalués :

➤ Spécificité et corrélation avec la méthode de référence

Les essais de spécificité ont pour objectif de démontrer la spécificité de chaque amorce.

Les essais ont été réalisés sur l'ensemble des couples d'amorces utilisées en discrimination allélique. Les résultats obtenus sont à comparer avec les résultats obtenus en séquence réalisée par un laboratoire déjà accrédité.

➤ Sensibilité

Les essais de sensibilité ont été réalisés pour démontrer la capacité de la méthode à détecter la mutation quand elle est présente. Pour ce faire les témoins hétérozygotes ont été dilués en faisant des gammes pour vérifier qu'à des concentrations très basses la méthode détecte les mutations et qu'à des concentrations très élevées il n'y a pas de phénomène de saturation.

Les témoins ont été d'abord quantifiés pour savoir leurs concentrations exactes.

➤ Stabilité

Les essais de stabilité concernent les réactifs critiques. Après avoir identifié ces réactifs leur stabilité a été vérifiée dans les conditions de conservation à LGNA. Les amorces, le mix PCR et les produits d'amplification ont fait l'objet d'une validation de la stabilité.

➤ Robustesse

Analyser la robustesse de la méthode consiste à faire varier volontairement et de manière mesurée un ou plusieurs paramètres limitants et mesurer les répercussions sur la qualité des résultats obtenus.

Le premier paramètre à faire varier est l'erreur maximale tolérée des pipettes qui peuvent intervenir lors de la préparation du mix de PCR et lors de la distribution du mix, des amorces et de l'ADN dans la plaque d'amplification. Tous les couples d'amorces ont été considérés en étant un kit, car nous utilisons les mêmes volumes et les mêmes conditions opératoires pour toutes les analyses en discrimination allélique. Les volumes utilisés ne dépendent pas de la nature des amorces. Par conséquent, cet essai a été réalisé sur un couple d'amorces et les conclusions ont été extrapolées à tous les couples d'amorces.

Le deuxième paramètre à faire varier est la température, ceci en intégrant les écarts maximaux et minimaux des thermocycleurs pour démontrer que cela n'affecte pas la qualité des résultats. Les conditions de température sont identiques pour tous les couples d'amorces. Les températures d'hybridation des amorces sont un facteur intrinsèque. Par conséquent, cet essai a été réalisé sur tous les couples d'amorces utilisés en discrimination allélique. De plus, pour tester l'influence de la variation des températures sur l'hybridation des 2 sondes nous avons choisi de réaliser cet essai sur les 3 témoins (homozygote muté, homozygote normal, hétérozygote).

➤ Contamination

Les essais de contamination inter-échantillon doivent être réalisés à condition que la méthode soit automatisée. La discrimination allélique étant réalisée manuellement cet essai n'a pas été réalisé.

6.2 Méthodologie

Le guide technique d'accréditation SH GTA 04 version 2007 (Guide technique d'accréditation de vérification (Portée A)/Validation (Portée B) des méthodes en biologie médicale) m'a aidé à la réalisation des essais.

Ce guide a été conçu pour expliciter les exigences des paragraphes 5.3 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15189.

Avant de commencer la validation un état des lieux des méthodes utilisées à LGNA a été réalisé. Un plan d'action a été élaboré pour organiser l'ordre des essais à réaliser ainsi que les plages horaires de déroulement des essais. Après la réalisation des essais en collaboration avec le responsable technique, les résultats ont été analysés et le dossier de validation a été rédigé.

La méthodologie du travail a été représentée ci-dessous sous forme de logigramme (Figure 35).

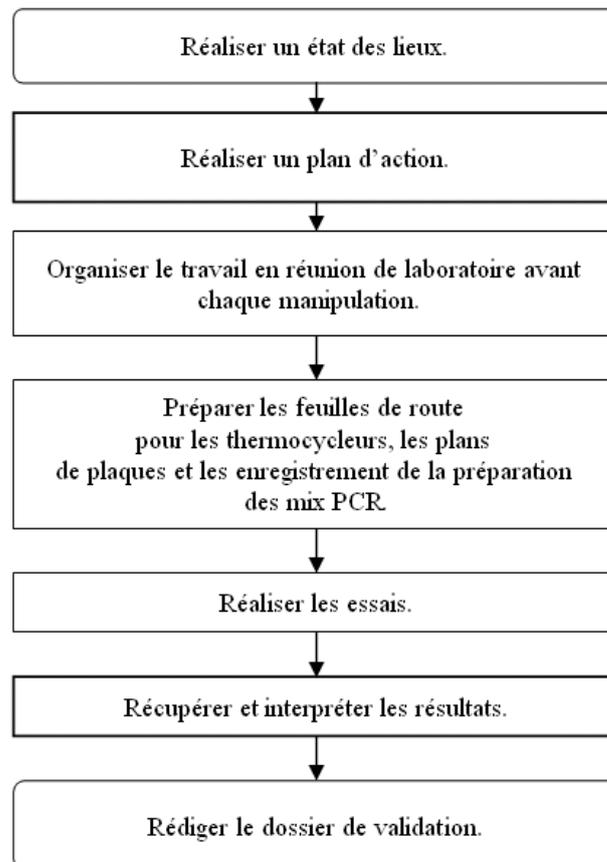


Figure 35 : « Méthodologie du travail »

Dans le dossier de validation, pour chaque essai, les éléments suivants ont été décrits :

- Objectif de l'essai,
- Echantillonnage,
- Mise en œuvre de l'essai,
- Résultats,
- Conclusion sur la validité des résultats.

7 Difficultés rencontrés

La manière d'aborder la norme est une étape difficile au départ. Elle ne contient pas des exigences très précises. Elle fournit plusieurs listes d'items sur lesquels le laboratoire doit avoir des exigences, dans un but d'être la plus largement applicable et la plus internationale. Il est nécessaire donc de commencer par un travail concentré d'interprétation de la norme et ensuite de positionnement propre de la part du laboratoire. Il est, en effet, difficile au démarrage de prendre la décision de se positionner et accepter la part entière des responsabilités. La norme fournit une méthode de travail pour la préparation d'un Système de Management de la Qualité mais reste vague sur son contenu. Donc le point de départ pour le laboratoire est de statuer sur ce qui est acceptable ou non avec toutes les responsabilités que cela implique. Il est primordial de le faire pour commencer le travail concernant l'accréditation. C'est le moyen d'aborder le sujet, en attendant que le COFRAC apporte les précisions manquantes. Cela peut d'un autre côté être un point positif car le laboratoire peut adapter les exigences à ses activités spécifiques comme est le cas des laboratoires de génétique. L'important c'est de pouvoir argumenter ses choix et d'aborder le sujet d'une façon pragmatique et logique.

V CONCLUSION ET OUVERTURES A LA DISCUSSION

L'accréditation provoque des inquiétudes et des questionnements de la part des biologistes, tel que la perte d'identité des sites, le refus d'accréditation et les recours possibles. Deux principaux problèmes se posent pour les LBM : le coût et l'éventuel refus.

La perte d'identité des sites peut survenir à cause du coût de l'accréditation. En effet les petits laboratoires d'analyses médicales des quartiers sont généralement constitués de 2 ou 3 personnes et doivent se regrouper pour faire face aux frais engagés pour l'accréditation.

L'accréditation peut être refusée pour des écarts critiques à la norme. Il s'agit d'écarts qui ont une conséquence directe sur la qualité des résultats et pour lesquels aucune action corrective n'est mise en place dans le délai défini par le COFRAC.

L'accréditation est une démarche logique et généralement les exigences de la norme sont respectés mais sans la documentation appropriée. Si toutefois l'accréditation est refusée, le laboratoire peut corriger les écarts et demander une nouvelle évaluation.

L'accréditation d'un laboratoire de génétique nécessite beaucoup d'énergie et de temps de tout le personnel. Cependant l'investissement personnel et financier du laboratoire conduit à une meilleure qualité des résultats d'analyse. L'avantage est aussi visible au niveau de l'efficacité et de la traçabilité.

A la différence des laboratoires d'analyses médicales classiques, la démarche d'accréditation est encore plus complexe dans les laboratoires réalisant des analyses génétiques. Ceci est dû à la discipline de biologie moléculaire elle-même, dont les méthodes d'analyses sont développées en interne. Peu d'informations et de précisions sont disponibles de la part des fournisseurs.

Mon apport personnel a permis à LGNA d'avancer dans sa demande d'accréditation. Les dispositifs mis en place afin de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, doivent être efficaces et simples à appliquer. Ceci permettra de les respecter à long terme et maintenir la qualité des prestations fournies.

Il est important d'avoir un sens de l'organisation afin de manager une équipe et de l'impliquer dans la démarche d'accréditation.

Généralement, pour aider la compréhension du personnel il faut adapter le langage qualité à un laboratoire d'analyses médicales et démontrer que « se mettre à faire de la qualité » n'est qu'une démarche logique, car je crois que cette dernière se fait tous les jours dans les LBM par conscience professionnelle, mais il suffit de le formaliser. Il n'y a pas de modèle de système de management de la qualité, il s'agit ici d'une proposition.

Enfin, cette expérience professionnelle m'a été très bénéfique. J'ai acquis des connaissances sur le management de la qualité et sur la compétence technique nécessaires à l'accréditation d'un laboratoire, utilisables dans de nombreux secteurs d'activité et complétant ma formation initiale.

Compte-tenu de la durée relativement courte, toutes les exigences de la norme ISO 15189 n'ont pas été traitées. La finalisation et la mise en place de l'ensemble des éléments du SMQ ainsi que l'accréditation de LGNA valoriseront ce travail.

J'ai aussi acquis des connaissances dans le domaine de la pharmacogénétique. Les médicaments issus d'une approche pharmacogénétique pourraient améliorer le rapport coût-efficacité des traitements. Il serait d'un grand intérêt d'intégrer les données pharmacogénétiques dans la notice de certaines molécules par les industriels. En outre, des essais cliniques pourraient être menés dans la phase de développement des médicaments, afin de conclure sur le traitement adapté aux profils génétiques.

Les études de polymorphisme génétique et le diagnostic des profils des sujets permettent un meilleur calcul bénéfice/risque des médicaments administrés.

Plusieurs études de polymorphismes génétiques sont disponibles dans la littérature. Le manque de recommandations pratiques de l'application clinique est dû principalement au manque d'études cliniques à grande échelle.

ANNEXES

Annexe 1 : « Tableau de bord »

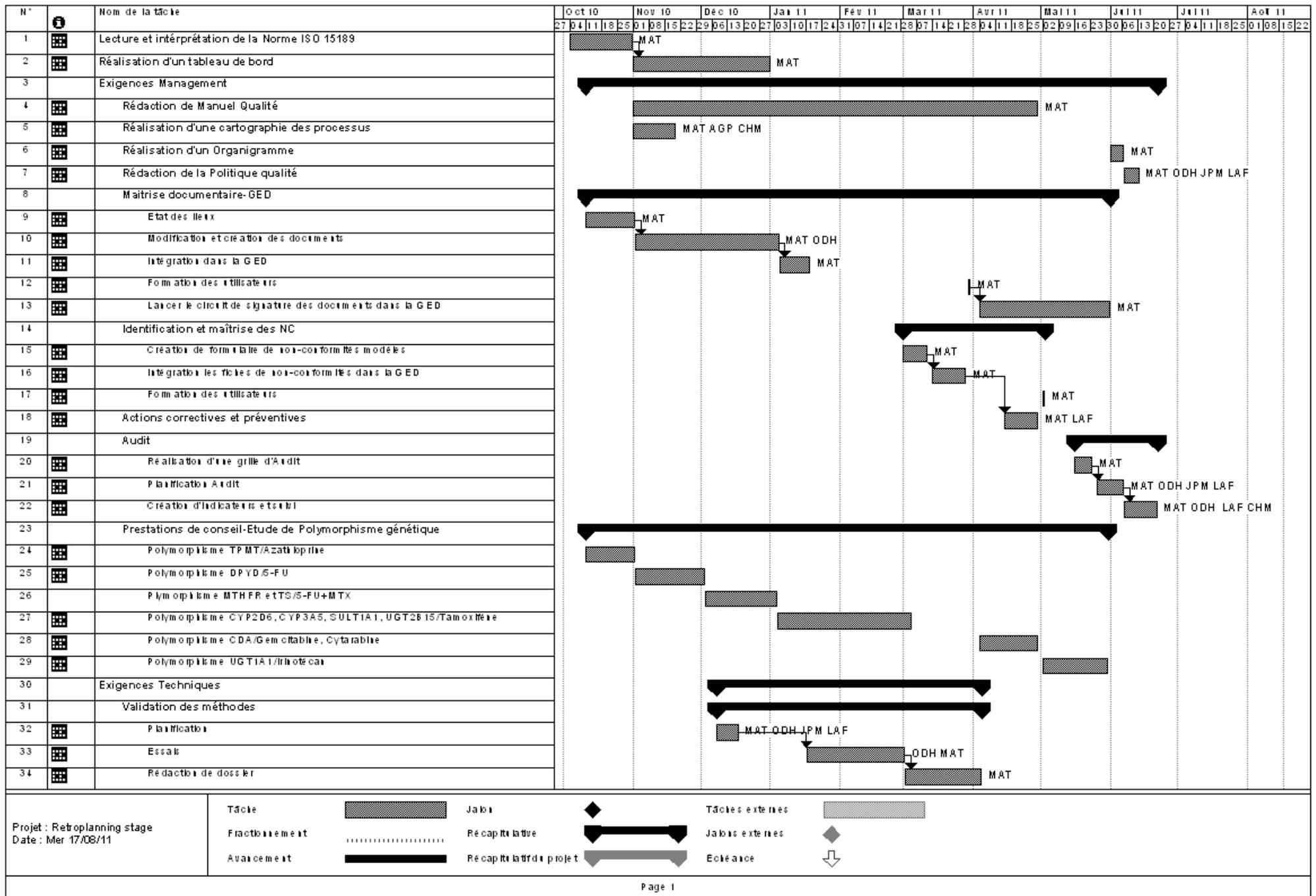
	Exigences Management	Preuves	Suivi des réalisations		
			Fait	En cours	A faire
4.1 ORGANISATION	Prestation=besoins clients	Enquêtes satisfaction, contats clinicobiologiques			
	Direction responsable du SMQ	Engagement, politique, missions : organigramme, fiches métier			
	Communication interne	Plan de communication, traces			
4.2 SMQ	Maitrise système documentaire	Processus, procédures (connus, à jour et appliqués)			
	Politique du SMQ/déclaration/implications	Déclaration dans le MQ -liste des examens faits -définition des limites (jour, nuit, urgences...) -indicateurs et suivi (amélioration) -traces de tous les enregistrements -déclaration dans MQ engagement de respect de la norme			
	Manuel Qualité à jour et décrit le SMQ	Liste des PR... Voir modèle table des matières dans la norme			
	Respect recommandations fabricant+ métrologie	Traçabilité calibrage, raccordements au SI, certificat fournisseurs			
4.3 MAITRISE DOCUMENTAIRE	PR de maitrise de tous les documents	Revue de direction annuelle+audits internes			
	Les PR doivent être aux normes	N° version, validées, diffusées, toujours utilisation des versions actuelles, PR de gestion des documents obsolètes et marquer "Ne plus utiliser", PR de modification d'un document			
	Tout document du SMQ identifié de façon univoque (titre, objectif, date édition, date application, N° révision, nombre pages, identifiées)	PR de création d'un document			
4.4 REVUE DE CONTRATS	Conserver des PR de revue	PR écrites, à jour, comprises, respectées			
	Enregistrer les revues; Revue des actes sous-traités	Conserver conclusions des revues			
	Si écart, informer tous les clients	Traces			
	Si modification contrat, répéter processus de revue	Traces du processus répété de revue			
4.5 ANALYSES TRANSMISES A DES LBM SOUS TRAITANTS	Procédure de sélection; Prouver la pertinence du choix	PR de sélection écrite+PR surveillance (ex. délai)			
	Accords conclus garantis	Contrats, déclaration du sous-traitant que respecte-les exigences, liste des méthodes disponibles, responsabilités à désigner dans le contrat			
	Registres	Avoir registres sous-traitants et analyses transmises. Conserver les comptes-rendus en double			
	LBM doit s'assurer que les résultats et les conclusions sont transmises au prescripteur	PR de transmission des comptes rendus. Dispositif de vérification de la réception par le prescripteur			
4.6 SERVICES EXTERNES ET APPROVI- SIONNEMENT	LBM doit rédiger sa politique de sélection des approvisionnements, contrôler et tracer	PR des marchés, PR contrôle à réception, enregistrements, relevé des NC et suivi			
	Vérifier avant d'utiliser	Traces contrôles qualité et engagement fournisseur			
	Système de contrôle de l'inventaire, N° lots, matériaux de contrôle et calibrateurs maitrisé	Enregistrements			
	Evaluation des fournisseurs, liste fournisseurs approuvés	Traces d'évaluation+indicateurs de performance			
4.7 PRESTATIONS DE CONSEIL	Biologistes doivent conseiller	Contrôler des prescriptions, participer aux staffs cliniques, activités de conseil			
4.8 TRAITEMENT DES RECLAMATIONS	LBM doit avoir une politique de gestion des réclamations clients et les enregistrer	PR gestion des réclamations (identification, analyse, mesures correctives) Enquêtes satisfaction			

4.9 IDENTIFICATION ET MAITRISE DES NC	Mettre en place une gestion des NC	Fiches métier du personnel désigné PR conduite à tenir en cas de NC Fiches de relevé+PR Enregistrements et traces des actions préventives			
4.10 ACTIONS CORRECTIVES	Mettre en place une enquête	PR d'analyse des NC incluse dans PR gestion des NC			
	Surveiller la pertinence des actions correctives	Indicateurs de suivi			
	Si doute sur pertinence, réaliser un audit ciblé	Traces d'analyse des causes et compte rendu d'audit			
4.11 ACTIONS PREVENTIVES	Identifier les risques a priori	Analyse des risques(Ishikawa),plans d'actions, indicateurs de suivi			
	Evaluer les actions préventives	PR actions préventives			
4.12 AMELIORATION CONTINUE	Revoir les PR opérationnelles+plans d'amélioration appropriés	Revue de direction régulières inscrites dans le MQ et tracées (modifications, suivi, indicateurs)			
	Suivi d'amélioration	Relevés des indicateurs, traces d'audits ciblés			
	Résultats soumis à la direction	Revue de direction et décision tracée			
	Indicateurs qualité	Actions d'évaluation(délai de réponse, enquêtes satisfaction, audits ciblé)			
	Programmes de formation	Gestion RH, comptes rendus, attestations			
4.13 ENREGISTREMENTS QUALITE ET TECHNIQUES	PR identification, accès, conservation (sécurisée), élimination Durée conservation conforme à la réglementation et à la liste de la norme	PR gestion des enregistrements conforme à GBEA à la liste de la norme Stockage locaux ad hoc			
4.14 AUDITS INTERNES	Audits internes annuels	Définir dans le SMQ la fréquence et les modes de réalisation (qui, où, comment...)			
	Réaliser par RQ ou personne habilitée	PR Audit interne et traces des conclusions et des actions			
	Revue d'audit par la direction	Traces			
4.15 REVUE DE DIRECTION	Au moins une fois par an	Traces			
	Evaluation de la qualité et de la pertinence de la contribution	Analyse de pertinence (contrat clinicobiologique)+enquêtes satisfaction			
	Enregistrer et diffuser les conclusion et mesures consécutives aux revues	Comptes rendus des revues et preuve de diffusion			

	Exigences Techniques	Preuves	Suivi des réalisations		
			Fait	En cours	A faire
5.1 PERSONNEL	Organigrammes, qualifications et responsabilités				
	Enregistrements des diplômes etc....				
	LBM dirigé par biologiste. Personnes déléguées définies	FM			
	Activités médicales et techniques	Prouver investissement quotidien			
	Environnement sûr et conforme	Respect réglementation			
	Entretenir une bonne ambiance	Bonne organisation, plans de formation			
	RH ad hoc	Organigramme, entretiens annuels			
	Personnel spécifiquement formé	Traces formations internes et externes			
	Sensibilisation du personnel	Staffs internes			
	Evaluation des personnels périodiques	Entretiens, fiches d'évaluation à jour, habilitations			
	Les avis des biologistes sont pertinents	Traces de formations, revues...			
Respect confidentialité	PR Respect confidentialité				
5.2 LOCAUX ET CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	Disposer de l'espace ad hoc	Typologie des différents secteurs			
	Locaux ad hoc	Confort, prévention, sécurité			
	Lieu, environnement ad hoc, locaux prélèvements ad hoc	Respect réglementation			
	Contraintes maîtrisées(T°)	Présence dispositifs appropriés			
	Zones cloisonnées	Confinement			
	Accès contrôlé des zones confinées	Habilitations définies			
Hygiène et sécurité des locaux	PR entretien, rangement des produits dangereux				
5.3 MATERIEL	Disposer de tous les équipements requis	PR maîtrise des équipements			
	Prouver la conformité du matériel	PR vérification et suivi des performances (contrôle qualité)			
	Etiquetage et identification du matériel	Inventaire du matériel à jour			
	Enregistrement du matériel(détails voir norme)	Fiche de matériel et fiche de vie			
	Habilitations et instructions disponibles	PR mises à jour, connues, disponibles			
	Maintenance en conditions sécurisées	PR maintenance			
	Etalonnage	Balances, pipettes			
	Validation post-réparation	PR maintenance curative			
	PR afférentes aux systèmes analytiques	PR description, bonne utilisation...			
5.4 PROCEDURES PRE- ANALYTIQUES	La prescription ad hoc contient tous les éléments nécessaires	PR des exigences des bonnes pratiques			
	Manuel des prélèvements et examens	Répertoire à jour			
	Stockage des échantillons... Traçabilité complète de la réception des tubes Conditions de refus et d'acceptation Traçage des aliquots Mode de conservation momentanée	PR gestions des échantillons			
	Traçabilité des échantillons	PR réception des échantillons, personne habilitée pour décision			
	Gestion des demandes urgentes	PR gestion échantillons urgents			
	Mode de gestion des demandes par téléphone	PR d'enregistrement par tel.			
5.5 PROCEDURES ANALYTIQUES	PR conseillées celles publiées dans les revues faisant l'autoité	Méthodes d'analyse ont marquage CE			
	PR validées au préalable et revue 1 fois par an (tracée)	Vérification des méthodes selon Validation technique+bibliographie Enregistrement des résultats Comptes rendus des revues annuelles			

	<p>PR doivent être documentées:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Objet de l'analyse et principe de la méthode -Spécifications des performances(justesse...) -Type échantillon et tube -Matériels et réactifs nécessaires -Modes d'étalonnage -Différentes étapes -PR contrôle qualité -Interférences et réactions croisées -Principe de calcul et l'incertitude de mesure -Intervalles de références biologiques -Etendue des valeurs possible pour les résultats -Valeurs d'alerte ou critiques si nécessaire -Précautions de sécurité -Sources potentielles de variation des résultats 	PR bonne conduite de l'analyse (et la bonne utilisation du matériel)			
	Documentation pour l'interprétation de biologiste	PR Validation biologique			
	Cohérence entre la pratique et l'utilisation prévue	Respect indications fournisseurs			
5.6 ASSURER LA QUALITE DES PROCEDURES ANALYTIQUES	Concevoir des contrôles qualité	PR générale de contrôle de qualité			
	Déterminer l'incertitude de mesure U_c (élargie); si qualitatif : Ishikawa (diagramme)	Calcul des incertitudes de mesure sinon (qualitatif) maîtrise des dysfonctionnements potentiels			
	Programme d'étalonnage et de vérification de la justesse (traçabilité métrologique)	Traces			
	Programme EEQ (Evaluation externe de la qualité des pratiques) Surveillance	Participation à un programme EEQ Mise en place des actions correctives éventuelles			
	Echange de spécimens	Si aucun programme EEQ disponible			
	Cas des analyses communes à différents équipements	Vérification de la transférabilité effectuée régulièrement			
	Si transférabilité non satisfaite, action corrective immédiate et enregistrement	Mise en place des actions correctives et preuve de pertinence			
5.7 PROCEDURES POST- ANALYTIQUES	Revue systématique des résultats et autorisation de diffusion par le biologiste	PR validation biologique des résultats			
	Elimination des échantillons selon réglementation	PR gestion des déchets (GBEA)			
5.8 COMPTE RENDU DES RESULTATS	Consensus sur le format du compte rendu	Contrats clinicobiologiques			
	CR réceptionnés dans le délai convenu	Contrats clinicobiologiques			
	Le CR doit comprendre tous les éléments exigés	Définition du format des CR			
	Avertir immédiatement si résultat pathologique	PR à suivre devant un résultat pathologique			
	Si retranscription de résultat de sous-traitant la vérification est obligatoire	PR vérification de l'exactitude des retranscriptions			
	Définir le mode de diffusion des résultats et les habilitations	PR correspondante			
	Transmission par téléphone ou électronique sécurisée	Garantie			
	Toute modification de CR doit être tracée	PR modification de CR			
Désignations des analyse respectent les recommandations internationales					

Annexe 2 : « Rétroplanning »



Annexe 3 : « Politique qualité de LGNA »



POLITIQUE QUALITE LABORATOIRE DE GENETIQUE NANTES ATLANTIQUE

Le laboratoire LGNA a été créé pour répondre au mieux aux besoins du système de la santé en termes d'analyses génétiques.

Je soussigné, Jean-Paul MOISAN responsable de LGNA, déclare avoir engagé le laboratoire dans un objectif de qualité permanente et d'amélioration continue, afin d'être en conformité avec les exigences formulées dans la norme NF EN ISO 15189.

La politique de LGNA s'appuie sur les principes suivants :

- *Garantir des résultats d'analyse fiables.*
- *Garantir une totale confidentialité des résultats d'analyse.*
- *Prendre une part active dans l'aide au diagnostic et au suivi de chaque patient.*
- *Respecter l'éthique dans l'exercice de notre profession.*

Cette politique repose sur les objectifs suivants :

- *Obtenir l'accréditation NF EN ISO 15189 sur l'ensemble des prestations d'analyse de LGNA.*
- *Assurer et maintenir la fiabilité des analyses.*
- *Elargir la gamme de prestations analytiques, afin de mieux répondre aux besoins de tous les patients.*
- *Promouvoir notre développement à l'international.*

Cette déclaration d'engagement implique que la direction délivre son soutien à l'ensemble du personnel et mette à disposition les ressources nécessaires à la satisfaction de l'objectif collectif de qualité et de compétence.

Engagement de la direction

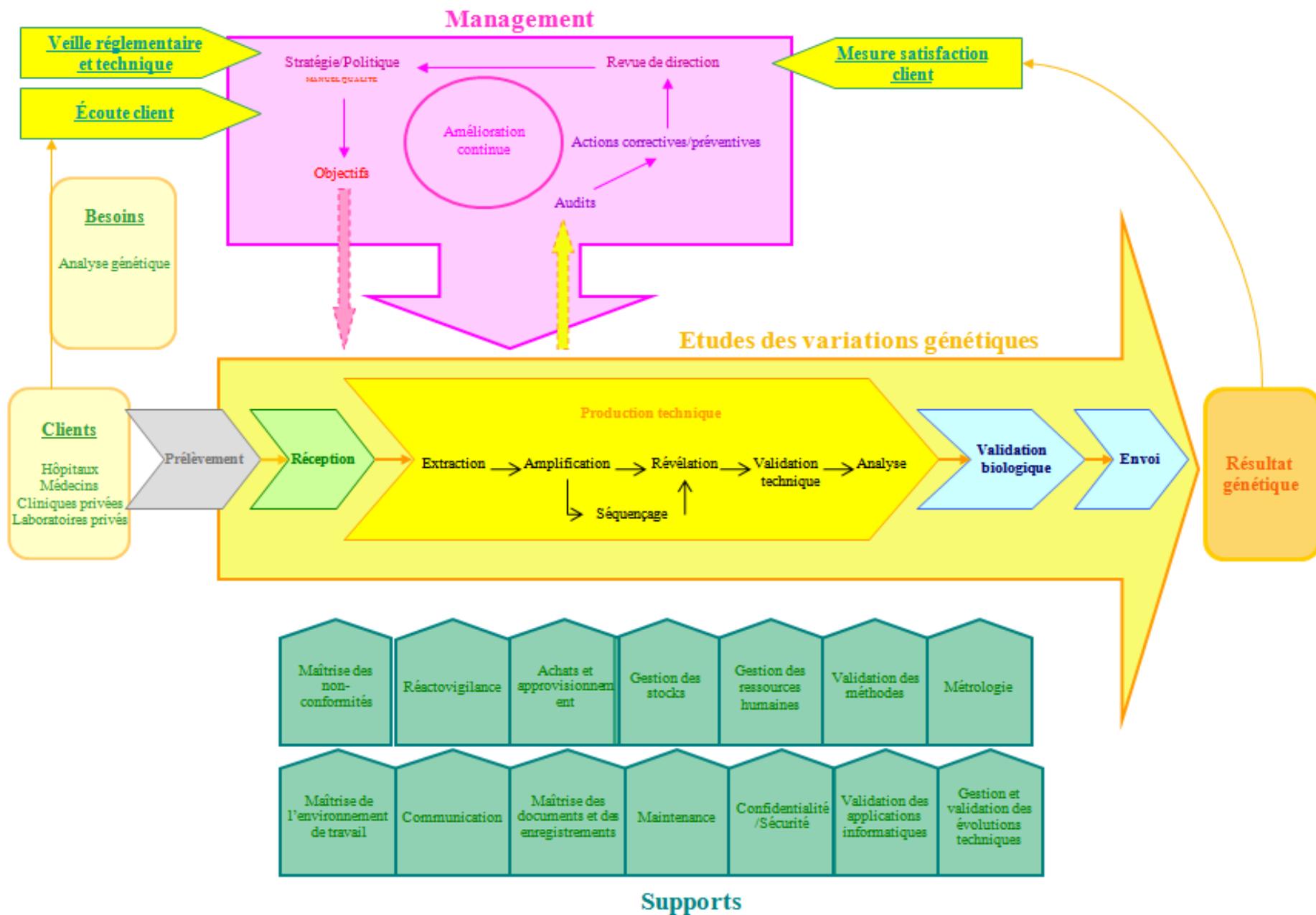
En tant que directeur de LGNA, je m'engage à mettre en œuvre l'ensemble des moyens nécessaires afin de satisfaire les besoins de nos patients et de nos prescripteurs et à placer ces besoins au plus haut niveau des priorités du laboratoire. Ceci dans le respect de l'environnement et des règles de sécurité et d'hygiène afin d'assurer le confort du personnel. Cet engagement implique également le respect et l'application, sans restriction, des recommandations inscrites dans la norme NF EN ISO 15189.

Le système de management de la qualité mis en place au sein de LGNA a pour objectif de prouver le niveau de qualité et de compétence du laboratoire. Ainsi M. FRUCHARD a les responsabilités :

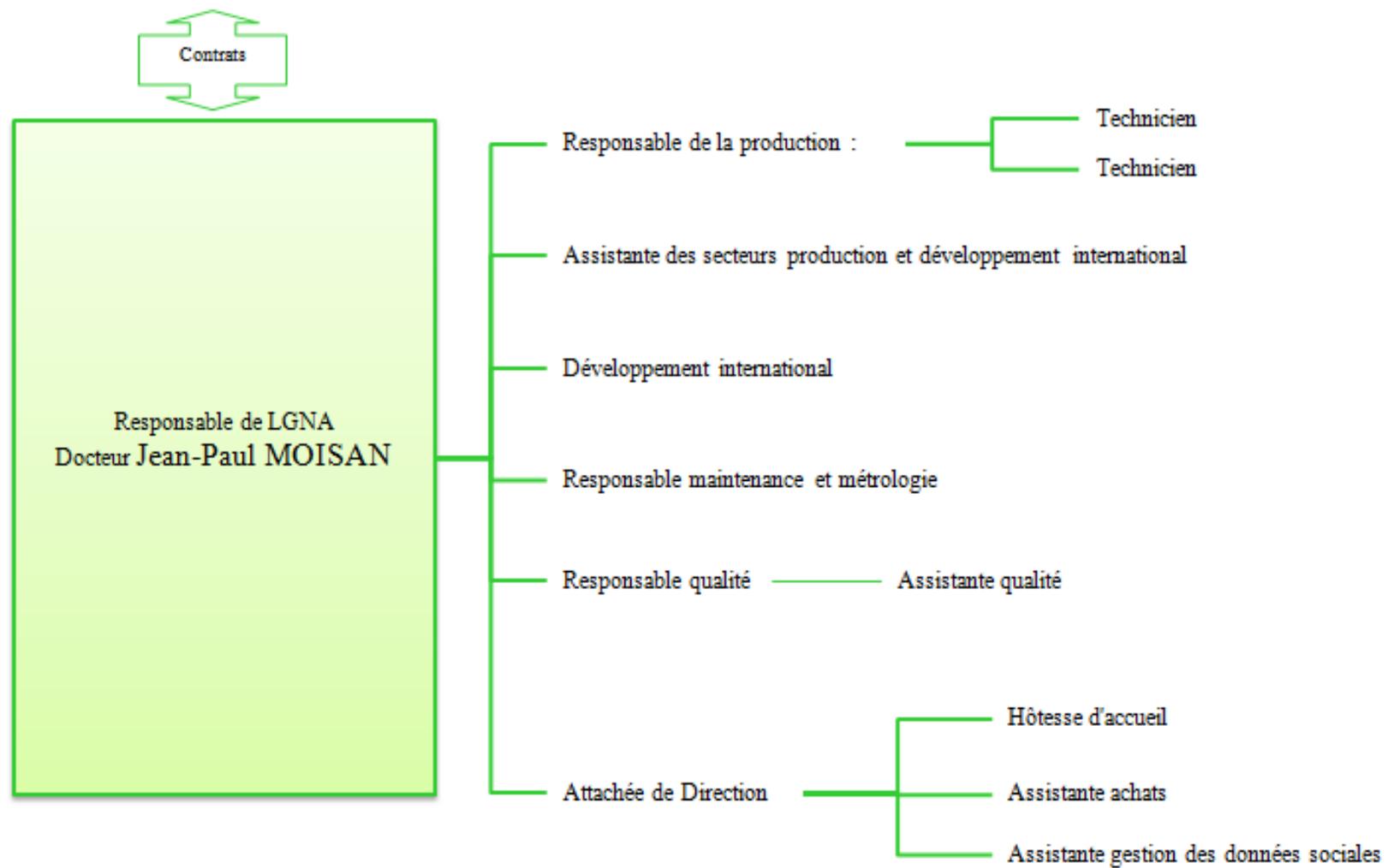
- *D'assurer la mise en place de tous les processus nécessaires au système de management de la qualité.*
- *Rendre compte du fonctionnement du système de management de la qualité et de tout besoin d'amélioration.*

Le 30 Mai 2011
Jean-Paul MOISAN
Responsable de LGNA

Annexe 4 : « Cartographie des processus de LGNA »



Annexe 5 : « Organigramme de LGNA »



Annexe 6 : « Liste des documents présents dans la GED »

Secteur	Classement	Code	Titre	Révision	Type	Version
Site de Nantes	MOL101215-01001	L101215-01	Elution manuelle de l'ADN des punchs	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101215-02001	L101215-02	Analyse des résultats de discrimination allélique	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-01001	L101216-01	Concentration d'une solution d'ADN sur filtre Microcon	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-02001	L101216-02	Discrimination allélique et lecture en point final	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-03001	L101216-03	Injection sur le Séquenceur ABI PRISM® 3130xl	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-04001	L101216-04	Lyse des cellules du sang (Tampon SEB)	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-05001	L101216-05	Prélèvement sur cartes FTA® en punch	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-06001	L101216-06	Préparation de l'amplification pour la discrimination allélique	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-07001	L101216-07	Préparation des tubes d'Assay-by-design et des tubes Taq Man® Drug Metabolism	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-08001	L101216-08	Préparation et Purification manuelle des réactions de séquence	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-09001	L101216-09	Préparation et suivi des amorces pour PCR et séquençage	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-10001	L101216-10	Préparation des mix d'injection des PCR fluorescentes	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-11001	L101216-11	Purification de l'ADN au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-12001	L101216-12	Purification ExoSap et réaction de Séquence par MPIISEQ	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL101216-13001	L101216-13	Révélation et Purification des produits d'amplification pour séquençage	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	IML110124-01001	L110124-01	Fabrication des mix PCR pour le diagnostic de la bêta-thalassémie	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110211-01001	L110211-01	Fabrication des mix PCR pour le diagnostic du glaucome	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110211-02001	L110211-02	Fabrication des mix PCR pour le diagnostic de la mucoviscidose	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110211-03001	L110211-03	Fabrication des mix PCR pour le diagnostic de la rétinite pigmentaire	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110211-04001	L110211-04	Fabrication des mix PCR pour les gènes analysés par discrimination allélique	0	Imprimé	001
Site de Nantes	MOL110221-01001	L110221-01	Réalisation d'une feuille de route de Discrimination allélique	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	PRL110221-02001	L110221-02	Production technique	0	Procédure	001
Site de Nantes	DONL110221-03001	L110221-03	Liste des codes d'enregistrement	0	Donnée	001
Site de Nantes	MOL110221-04001	L110221-04	Préparation des mix PCR et réaction d'amplification avant séquençage	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	MOL110221-05001	L110221-05	Validation d'une demande d'analyse	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	PRL110221-06001	L110221-06	Réception d'une demande d'analyse	0	Procédure	001
Site de Nantes	IML110221-07001	L110221-07	Fiche de saisie des exigences des prescripteurs	0	Imprimé	001
Site de Nantes	MOL110221-08001	L110221-08	Enregistrement d'une demande d'analyse	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	PRL110221-09001	L110221-09	Validation biologique et communication des résultats au prescripteur	0	Procédure	001
Site de Nantes	MOL110221-10001	L110221-10	Edition des résultats et des factures	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	PRL110222-01001	L110222-01	Réactovigilance	0	Procédure	001
Site de Nantes	MOL110223-01001	L110223-01	Préparation des mix PCR et réaction d'amplification par PCR fluorescente	0	Mode opératoire	001

Site de Nantes	PRL110408-01001	L110408-01	Prélèvement	0	Procédure	001
Site de Nantes	DONL110411-01001	L110411-01	Liste des prestations et des prix des analyses de génétique FR	0	Donnée	001
Site de Nantes	MOL110411-02001	L110411-02	Prélèvement salivaire sur carte FTA	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	IML110411-03001	L110411-03	Enquête de satisfaction des prescripteurs	0	Imprimé	001
Site de Nantes	MOL110413-01001	L110413-01	Validation des kits PCR	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	DONL110413-02001	L110413-02	Témoins d'extraction et d'amplification	0	Donnée	001
Site de Nantes	DONL110413-03001	L110413-03	Marqueur de taille GS500 LIZ	0	Donnée	001
Site de Nantes	DONL110527-01001	L110527-01	Politique qualité	0	Donnée	001
Site de Nantes	DONL110527-02001	L110527-02	Manuel Qualité	0	Donnée	001
Site de Nantes	MOL110606-01001	L110606-01	Préparation des réactifs et solutions	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	DONL110607-01001	L110607-01	Maîtrise de produit non-conforme	0	Donnée	001
Site de Nantes	IML110607-02001	L110607-02	Préparation des mix de séquence	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110607-03001	L110607-03	Préparation des mix d'injection des produits de PCR fluorescente	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110607-04001	L110607-04	Préparation de TE 10 : 1	0	Imprimé	001
Site de Nantes	PRL110621-01001	L110621-01	Gestion finale et destruction des prélèvements	0	Procédure	001
Site de Nantes	MOL110621-02001	L110621-02	Préparation des mix d'injection des produits de PCR fluorescente	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	DONL110621-03001	L110621-03	Dossier de validation de la méthode de discrimination allélique	0	Donnée	001
Site de Nantes	IML110622-01001	L110622-01	Préparation des amorces de PCR et de séquence	0	Imprimé	001
Site de Nantes	IML110622-02001	L110622-02	Suivi du stock des amorces	0	Imprimé	001
Site de Nantes	DONL110624-01001	L110624-01	Liste des prestations et des prix des analyses de génétique EN	0	Donnée	001
Site de Nantes	DONL110624-02001	L110624-02	Liste des prestations et des prix des analyses de pré-natal	0	Donnée	001
Site de Nantes	IML110624-03001	L110624-03	Fiche famille-patient	0	Imprimé	001
Site de Nantes	MOL110628-01001	L110628-01	Analyse des réactions de séquence	0	Mode opératoire	001
Site de Nantes	DONL110628-02001	L110628-02	Cartographie des processus	0	Donnée	001
Site de Nantes	DONL110628-03001	L110628-03	Organigramme LGNA	0	Donnée	001

Annexe 7 : « Grille d'audit interne sur l'ensemble de la norme ISO 15189 »

 LABORATOIRE GÉNÉTIQUE NANTES ATLANTIQUE	Grille d'audit		Code : L110826-01 Version : 001 Date d'application : 13/09/2011
	Imprimé	Révision : 0	Page 117 sur 130

Mission : Evaluer la conformité de l'ensemble des activités de LGNA par rapport à la norme ISO 15189.

Audit : LGNA

Nom de l'auditeur :

1 Evaluation

Exigences de la norme relatives à :	Questions	Oui (√)	Non (x)	Preuves	Observations
Exigences Management					
4.1 Organisation et management	Le laboratoire est-il identifié d'un point de vue légal ?				
	Le laboratoire subit-il des influences qui peuvent avoir un impact sur la qualité des analyses ?				
	La confidentialité est-elle respectée ?				
	Le laboratoire possède-t-il un organigramme et des fiches métiers ?				
	Les relations avec d'autres structures sont-ils identifiées dans l'organigramme ?				
	Existe-il un processus de communication interne ?				
4.2 SMQ	Le laboratoire dispose-t-il d'un MQ ?				
	La PQ est-elle définie, mise en œuvre et accessible au personnel ?				
4.3 Maîtrise des documents	Les documents sont-ils gérés ?				
	Les documents applicables sont-ils disponibles sur les postes de travail ?				
	Tous les documents sont-ils identifiés d'une manière univoque ?				
	La non utilisation de versions obsolètes de documents est-elle assurée ?				
4.4 Revue des contrats	Le laboratoire soustraite-il certaines analyses ?				
	Existe-il une PR « Revue des contrats » ?				
	Le laboratoire dispose-t-il d'une liste des analyses proposées ?				
4.5 Analyses transmises à des LBM sous-traitants	Existe-il des critères de choix de LBM sous-traitants ?				
	Des accords sont-ils conclus avec des LBM sous-traitants ?				
4.6 Services externes et approvisionnement	Existe-t-il une procédure d'achat ?				
	Existe-t-il des critères de sélection des fournisseurs ?				
	Existe-t-il un contrôle des éléments qui ont un impact sur la qualité des résultats avant la réalisation des analyses ?				
4.7 Prestations de conseil	Le laboratoire conseille-t-il dans le choix des analyses, l'utilisation des prestations et l'interprétation des résultats afin de répondre aux besoins des patients et du personnel médical ?				
4.8 Traitement des réclamations	Existe-t-il une gestion des réclamations au sein de LGNA ?				
	Le laboratoire mesure-t-il la satisfaction des prescripteurs ?				
4.9 Identification et maîtrise des NC 4.10/4.11 CAPA	Les NC sont-elles relevées au sein de LGNA ?				
	Des actions sont-elles mises en place afin d'éliminer les causes des NC ?				
	L'efficacité des actions mises en place est-elle vérifiée ?				
4.12 Amélioration continue	Les PR sont-elles revues et à quelle fréquence ?				
	Y a-t-il un suivi d'indicateurs ?				
4.13 Enregistrements qualité et techniques	Existe-il une PR de gestion des ENR ?				
	La sécurité de la conservation est-elle assurée ?				
	La durée de conservation est-elle définie et en accord avec la réglementation ?				
4.14 Audits internes	Des audits internes sont-ils organisés et planifiés au				

	moins une fois par an ?			
4.15 Revue de direction	Une revue de direction est-elle réalisée au moins une fois par an ?			
	La revue de Direction est-elle enregistrée, les actions définies sont-elles mises en œuvre et le personnel est-il informé ?			
Exigences techniques				
5.1 Personnel	Un programme de formation et de vérification des compétences est-il mis en place ?			
	Le personnel est-il formé à utiliser les documents qualité ?			
5.2 Locaux et conditions environnementales	L'accès aux zones de travail est-il contrôlé ?			
	Les locaux sont-ils surveillés et entretenus afin de garantir la fiabilité des résultats des analyses ?			
5.3 Matériel	Chaque matériau est-il identifié et ses dates de réception et de mise en service sont-ils enregistrés ?			
	Les numéros de lot des réactifs sont-ils enregistrés ?			
	Les instruments, les réactifs et les systèmes analytiques sont-ils surveillés par des programmes d'étalonnage, de vérification de la justesse et de maintenance ?			
5.4 PR pré-analytiques	Existe-t-il un manuel de prélèvement qui fait partie du système de maîtrise des documents ?			
	Le personnel de prélèvement a-t-il connaissance de ce manuel ?			
	Existe-t-il une liste de diffusion du manuel de prélèvement ?			
	Existent-ils des conditions de transport, de conservation et des critères d'acceptation des échantillons ?			
5.5 PR analytiques	Le laboratoire développe-t-il des méthodes en interne ?			
	Une validation ou vérification sur site est-elle été réalisée pour les analyses de la portée d'accréditation ?			
	Les procédures analytiques sont-elles validées avant leur application ?			
5.6 Assurer la qualité des PR analytiques	Existent-ils des CQE ?			
	Les équipements critiques ont-ils été identifiés au sein de LGNA ?			
	Les équipements critiques ont-ils un suivi métrologique ?			
5.7 PR post-analytiques	Une personne habilitée procède-t-elle au contrôle des résultats selon les informations cliniques ?			
	Les PR de validation biologique sont-elles revues périodiquement ?			
	Existe-il une procédure concernant la gestion finale des échantillons ?			
5.8 Compte rendu des résultats	Les résultats sont-ils transmis par moyens électroniques ou électromagnétiques ?			
	Le laboratoire établit-il en concertation avec les prescripteurs, les délais d'obtention des résultats des analyses ? S'assure-t-il que ces délais sont respectés et informe-t-il le prescripteur de tout retard ?			
	Existe-t-il des PR de diffusion des résultats ?			
	Existe-t-il des PR de modification de compte-rendu ?			

2 Rapport d'audit

Points forts :

Points à améliorer :

Ecart :

INSTRUIT PAR :	DATE :

Annexe 8 : « Enquête de satisfaction des prescripteurs »

ENQUETE DE SATISFACTION DES PRESCRIPTEURS

Votre avis nous intéresse. Il fait partie intégrante de notre objectif d'amélioration continue. Il est donc important que vous accordiez un peu de temps à ce questionnaire.

Pour les éléments suivants, veuillez indiquer votre avis en sachant que :

1 : peu satisfaisant	2 : satisfaisant	3 : très satisfaisant
----------------------	------------------	-----------------------

Comment jugez-vous le laboratoire pour :

	Cotation			Commentaire
Aspect relationnel				
L'accueil téléphonique ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
La rapidité de réponse à une demande de renseignement ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le traitement des demandes urgentes ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
La disponibilité des biologistes ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Les dispositions prises au regard de la confidentialité ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Aspect communication				
Les commentaires portés sur les comptes rendus ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Les conseils prodigués par les biologistes ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le format et la présentation des comptes rendus ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le mode de transmission d'un résultat particulier ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le traitement des dysfonctionnements ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
L'existence des contrats clinicobiologiques ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le mode de diffusion des comptes rendus écrits ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Les comptes rendus transmis par les sous-traitants ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Aspect techniques				
Le guide de prélèvement ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Les renseignements à fournir ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le nombre de tubes à prélever ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Le délai de réalisation des examens ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	
Les examens confiés à la sous-traitance ?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Diffusion et validation des tests génétiques en France : Jean-Yves Le Gall et Raymond Ardaillou, Académie nationale de médecine.
- 2) Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M and Evans WE. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. *Annu. Rev. Med.* 2006. 57 : 119-37.
- 3) Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 2004. 429 : 464-68 ; Evans WE, McLeod HL.
- 4) Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets and sides effects. *N. Engl. J. Med* 2003. 348 : 538-49.
- 5) Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N. Engl. J. Med.* 348 : 529-37.
- 6) Marc Ansari, Geneviève St-Onge, Maja Krajinovic : Pharmacogénétique de la leucémie lymphoblastique aiguë. *Médecine/Sciences* 2007 ; 23 : 961-7.
- 7) G. Milano : Place de la pharmacogénétique dans la prédiction de la sensibilité tumorale aux agents anticancéreux. *John Libbey Eurotext, Paris*© 2006, pp. 197-201.
- 8) Takamitsu Sasaki, Emi Goto, Yumiko Konno, Masahiro Hiratsuka and Michinao Mizugaki : Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine S-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21(4) : SNP25(332)-SNP29(336) (2006).
- 9) Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, et al. 1997. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency : genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann. Intern. Med.* 126 : 608-14.
- 10) Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, et al. 1997. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics : gene sequence polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 62 : 60-73.
- 11) Evans WE, Horner M, Chu YQ, et al. 1991. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr.* 119 : 985-89.
- 12) Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, et al. 2001. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J. Clin. Oncol.* 19 : 2293-301.
- 13) Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, et al. 1999. High incidence of secondary brain tumors related to irradiation and antimetabolite therapy. *Lancet* 354 : 34-39.

- 14) Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, et al. 2004. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 14 : 407-17.
- 15) Armstrong RD, Lewis M, Stern SG, Cadman EC. Acute effect of 5-fluorouracil on cytoplasmic and nuclear dihydrofolate reductase messenger RNA metabolism. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 7366-71.
- 16) Ingraham HA, Tseng BY, Goulian M. Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Pharmacol* 1982 ; 21 : 211-6
- 17) Schuetz JD, Collins JM, Wallace HJ, Diasio RB. Alteration of the secondary structure of newly synthesized DNA from murine bone marrow cells by 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 119-23.
- 18) Heggie GD, Sommadossi JM, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine and bile. *Cancer Res* 1987 ; 47 : 2203-6
- 19) Sweeny DJ, Martin M, Diasio RB. N-chenodeoxycholy-2-fluoro- β -alanine : a biliary metabolite of 5-fluorouracil in humans. *Drug Metab Dispos* 1988 ; 16 : 892-4.
- 20) Sweeny DJ, Barnes S, Heggie GD, Diasio RB. Metabolism of 5-fluorouracil to an N-choly-2-fluoro- β -alanine conjugate : previously unrecognized role for bile acids in drug conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 5439-43.
- 21) Meta-Analysis Group In Cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer : effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 3537-41.
- 22) De Forni M, Bugat R, Sorbette F, Delay M, Bachaud J, Chevreau C. Cardiotoxicité du 5-fluorouracile perfusion intraveineuse continue : étude clinique, prévention, physiopathologie : à propos d'une série de 13 cas. *Bull Cancer* 1990 ; 77 : 429-38.
- 23) Lemaire L, Malet-Martino MC, Longo S, Martino R, de Forni M, Carton M. Fluoroacetaldehyde as cardiotoxic impurity in fluorouracil (Roche). *Lancet* 1991 ; 337 : 560
- 24) Stéphan F, Etienne MC, Wallays C, Milano G, Clergue F. Depressed hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil-related toxicities. *Am J Med* 1995 ; 99 : 685-8.
- 25) Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel J, Formento P, Renée N, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidilate synthase in tumor sensitivity to fluoracil. *Eur J Cancer* 1994 ; 10 : 1517-22.
- 26) Etienne M C, Lagrange J L, Dassonville O, et al : Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 12 : 2248-2253, 1994.
- 27) A. de Gramont, J.F. Bosset, C. Milan, et al., Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer : a French intergroup study, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997) 808-815.

- 28) M. Boisdron-Celle et al., 5-Fluorouracil-related severe toxicity : A comparison of..., *Cancer Lett.* (2006), doi : 10.1016/j.canlet.2006.09.006.
- 29) Van Kuilenburg A. B. P., Muller E.W., Haasjes J., Meinsma R., Zoetekouw L., Waterham H. R., Bass F., Richel D. J. and van Gennip A. H. (2001). Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil : frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin. Cancer Res.* 7,1149-1153.
- 30) Van Kuilenburg, A. B. P., Haasjes J., Richel D. J., Zoetekouw L., Van Lenthe H., De Abreu R. A., Maring J. G., Vreken P. and Van Gennip A. H. (2000). Clinical Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity : Identification of new mutations in DPD gene. *Clin. Cancer Res.* 6, 4705-4712.
- 31) Milano G., Etienne M. C., Pierrefite V., Barberi-Heyob M., Deporte-Fety R. and Renée N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br. J. Cancer*, 79 : 627-630, 1999.
- 32) Meta-analysis Group in Cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer : effect of administration schedule and prognostic factors. *J. Clin. Oncol.*, 16 : 3537-3541, 1998.
- 33) Mattison LK, Fourie J, Desmond RA, Modak A, Saif MW, Diasio RB. Increased prevalence of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in African-Americans compared with Caucasians. *Clin Cancer Res* 12 : 5491-5495, 2006.
- 34) Raymond E, Boige V, Faivre S, et al. (2002) Dosage adjustment and pharmacokinetic profile of irinotecan in cancer patients with hepatic dysfunction. *J Clin Oncol* 20 : 4303-12.
- 35) Bosma PJ (2003) Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 38 : 107-17.
- 36) Sai K, Saeki M, Saito Y, et al. (2004) UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 75 : 501-15.
- 37) Beutler E, Gelbart T, Demina A (1998) Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter : A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 8170-4.
- 38) Innocenti F, Undavia SD, Lyer L, et al. (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22 : 1382-8.
- 39) Ando Y, Ueoka H, Sugiyama T, et al. (2002) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and pharmacokinetics of irinotecan. *Ther Drug Monit* 24 : 111-6.
- 40) Marcuello E, Altes A, Menoyo A, et al. (2004) UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 91 : 678-82.

- 41) Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, et al. (2004) Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity : A molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res* 10 : 5151-9.
- 42) Ciotti M, Basu N, Brangi M, Owens IS (1999) Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the UGT1 locus. *Biochem Biophys Res Commun* 260 : 199-202.
- 43) Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH (1997) Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue : identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol* 52 : 212-20.
- 44) Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, et al. (2003) Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 9 : 3246-53.
- 45) Puisset F, Chatelut E. UDP-glucuronosyl-transférase 1A1 et pharmacogénétique de l'irinotécan. *Oncol* (2005) 7 : 49-54.
- 46) 13) Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N et al. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, C71R, P229Q, and Y486D. *Drug Metab. Dispos.* 31 (1), 108-113 (2003).
- 47) Yamamoto K, Sato H, Fujiyama Y, Doida Y, Bamba T : Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotype of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochim. Biophys. Acta* 1406 (3), 267-273 (1998).
- 48) Zhou Q, Sparreboom A, Tan EH et al. Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59 (4), 415-424 (2005).
- 49) Kim TE, Innocenti F. Role of UGT1A1*6 in irinogenetics in Asians. *Personalized Medecine* 4 (4), 431-434 (2007).
- 50) Minami H, Sai K, Saeki M et al. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A1 genetic polymorphisms in Japanese : role of UGT1A1*6 and *28. *Pharmacogenet. Genomics* 17 (7), 497-504 (2007).
- 51) Araki K, Fujita K, Ando Y et al. Pharmacogenetic impact of polymorphisms in the coding region of the UGT1A1 gene on SN-38 glucuronidation in Japanese patients with cancer. *Cancer Sci.* 97 (11), 1255-1259 (2006).
- 52) Marsh S, Hoskins JM. Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11 (7), 1003-1010 (2010).
- 53) Saito Y, Maekawa K, Ozawa S, and Sawada J (2007). Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in East Asians and their comparison with other ethnic populations. *Curr Pharmacogenomics* 5 : 49-78.
- 54) Girard H, Villeneuve L, Court MH, Fortier LC, Caron P, Hao Q, von Moltke LL, Greenblatt DJ, and Guillemette C (2006). The novel UGT1A9 intronic I399 polymorphism seems as a

- predictor of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin glucuronidation levels in the liver. *Drug Metab Dispos* 34 : 1220-1228.
- 55) Saito et al. Close Association of UGT1A9 IVS1+399C>T with UGT1A1*28, *6, or *60 Haplotype and Its Apparent Influence on 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) glucuronidation in Japanese. *Drug Metab Dispos* 37 : 272-276 (2009).
 - 56) Tukey RH, Strassburg CP, Mackenzie PI. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. *Mol Pharmacol* 62 : 446-450 (2002).
 - 57) Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase : isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994 ; 7 : 195-200.
 - 58) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease : a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995 ; 10 : 111-3.
 - 59) Calvert H. An overview of folate metabolism : features relevant to the action and toxicities of antifolate anticancer agents. *Semin Oncol* 1999 ; 26 : 3–10.
 - 60) Kuhn JG. Fluorouracil and the new oral fluorinated pyrimidines. *Ann Pharmacother* 2001 ; 35 : 217–27.
 - 61) Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995 ; 346 : 1070–1.
 - 62) Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996 ; 94 : 2410–6.
 - 63) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996 ; 93 : 7–9.
 - 64) Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ; 95 : 13217–20.
 - 65) Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 5606–11.
 - 66) Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al. Pharmacogenetics of methotrexate : toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001 ; 98 : 231–4.

- 67) Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, Laurenti L, Sora F, Mele L, et al. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol* 2002 ; 13 : 1915–8.
- 68) Toffoli G, Russo A, Innocenti F, Corona G, Tumolo S, Sartor F, et al. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2003 ; 103 : 294–9.
- 69) Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol* 2000 ; 11 : 373–4.
- 70) Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosh G. Intermediate homocysteinemia : a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J. Hum. Genet.* 43 (4), 414-421 (1988).
- 71) Evans WE : Differing effects of methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms on methotrexate efficacy and toxicity in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics* 12 (3), 181-182 (2002).
- 72) Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R : A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decrease enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 64, 169-172 (1998).
- 73) Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene : an additional risk factor neural-tube defects. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1044-1051 (1998).
- 74) Wiemels J, Smith R, Taylor G et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 4004-4009 (2001).
- 75) Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 12, 183-190 (2002).
- 76) Kyoung-Jin Sohn, Ruth Croxford, Zoe Yates, Mark Lucock, Young-In Kim. Effects of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol 96, No. 2, January 21, 2004.
- 77) Morgan SL, Baggott JE, Vaughn WH et al. Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 121 (11), 833-841 (1994).

- 78) Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Meta-analysis of randomized trials testing the biochemical modulation of fluorouracil by methotrexate in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1994 ; 12 : 960-9.
- 79) Chabner BA. Cytidine analogues. In : Chabner BA, Longo DL, editors. Cancer chemotherapy and biotherapy : principles and practice. 2nd ed. Philadelphia and New York : Lippincott-Raven ; 1996. P 213-33.
- 80) Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y, Pelleymounter LL, and al. Gemcitabine Pharmacogenomics : Cytidine Deaminase and Deoxycytidylate Deaminase Gene Resequencing and Functional Genomics. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12(6).
- 81) Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, Yamamoto N, and al. Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11(7).
- 82) Cortes-Funes H, Martin C, Abratt R, Lund B. Safty profile of gemcitabine, a novel anticancer agent, in non-small cell lung cancer. *Anticancer Drugs* 1997 ; 8 : 582-7.
- 83) Yue L, Saikawa Y, Ota K, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics* 2003 ; 13 : 29-38.
- 84) Fukunaga AK, Marsh S, Murry DJ, Hurley TD, McLeod HL. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics J* 2004 ; 4 : 307-14.
- 85) Joerger M, Burgers JA, Baas P et al. Gene polymorphisms, pharmacokinetics, and hematological toxicity in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving cisplatin/gemcitabine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011.
- 86) 1) Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) : clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenetics J* 2005 ; 5 : 6-13.
- 87) Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy : the past, present and futur. *Trends Pharmacol Sci* 2004 ; 25 : 193-200.
- 88) Fabian C, Tilzer L, Sternson L : Comparative binding affinities of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, and desmethyltamoxifen for estrogen receptors isolated from human breast carcinoma : correlation with blood levels in patients with metastatic breast cancer. *Biopharm Drug Dispos* 1981, 2:381-390.
- 89) Coezy E, Borgna J-L, Rochefort H: Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 1982, 42:317-323.
- 90) Stearns V, Johnson M, Rae JM, Morocho A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA: Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95:1758-1764.

- 91) Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar T: Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, 55:471-478.
- 92) Nishiyama T, Ogura K, Nakano H, Ohnuma T, Kaku T, Hiratsuka A, Muro K, Watabe T: Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferases. *Biochem Pharmacol* 2002, 63:1817-1830.
- 93) Nishiyama T, Ogura K, Nakano H et al. Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronotransferase and sulfotransferases. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 1817-1830.
- 94) Ogura K, Ishikawa Y, Kaku T et al. Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1358-1369.
- 95) Lien EA, Solheim E, Lea OA et al. Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res* 1989; 49: 2175-2183.
- 96) Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 229-243.
- 97) Jin Y, Desta Z, Stearns V et al (2005) CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 97(1):30-39.
- 98) Borges S, et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:61-74.
- 99) Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population : allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60:284-295.
- 100) Wegman P, Vainikka L, Stal O, Nordenskjöld B, Skoog L, Rutqvist LE, and Wingren S. Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 2005, 7:284-290.

Nom – Prénom : TSVETANOVA Mariana

Titre de la thèse : LA DEMARCHE D'ACCREDITATION D'UN LABORATOIRE DE
GENETIQUE PRIVE SELON LA NORME NF EN ISO 15189

Résumé de la thèse : La génétique humaine est une discipline en plein essor avec le développement de nombreuses techniques d'analyses de l'ADN. Avec la médecine personnalisée, les analyses de pharmacogénétique ont pris une place importante dans le parcours de soins, notamment en évaluant le rapport bénéfice/risque des traitements.

Pour assurer la qualité des analyses les laboratoires de biologie médicale, dont les laboratoires de génétique, doivent être accrédités. Une démarche de réponse aux exigences de la norme NF EN 15189 est proposée dans la présente thèse.

MOTS CLES : ACCREDITATION, ISO 15189, PHARMACOGENETIQUE, LBM

JURY

PRESIDENT :

Mme Françoise BALLEREAU, Professeur de Pharmacie clinique et Santé
Publique
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS :

M. Christos ROUSSAKIS, Professeur de Biologie cellulaire et de
Génétique moléculaire
Faculté de Pharmacie de Nantes
Pr. Jean-Paul MOISAN, Directeur d'IGNA/LGNA
19, rue Léon Durocher BP 70425 44204 Nantes cedex 2
Mme Odile HERBERT, Responsable technique de LGNA
19, rue Léon Durocher BP 70425 44204 Nantes cedex 2
