

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Mucoviscidose (gène CFTR)
Hémochromatose (gène HFE)

Caractéristiques génétiques à des fins médicales **08CGM1** *Octobre 2008*

Edition : octobre 2009

Caractéristiques génétiques à des fins médicales

08CGM1

Jocelyne OTZ (Afssaps)
Véronique DAVID (CHU de Rennes)
Claude FEREC (CHU de Brest)

Expédition : 22 octobre 2008

Clôture : 24 novembre 2008

Edition des comptes-rendus individuels : 05 mars 2009

Paramètres contrôlés :

MUC006, MUC007 : recherche des mutations du gène CFTR (mucoviscidose)

HFE006, HFE007 : recherche des mutations du gène HFE (hémochromatose)

Nombre de laboratoires concernés* : 73

Nombre de laboratoires participants** : 65

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer les analyses concernées par l'envoi

** Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

L'opération 08CGM1 du Contrôle national de qualité « Caractéristiques génétiques à des fins médicales » a été organisée en octobre 2008.

En fonction des analyses qu'ils ont déclaré pratiquer, des solutions d'ADN déjà extrait ont été adressées aux laboratoires pour recherche des mutations du gène CFTR (MUC006 et MUC007), du gène HFE (HFE006 et HFE007). A chaque échantillon correspondait un cas clinique brièvement décrit.

Pour chaque échantillon, les laboratoires devaient préciser les réactifs ou les techniques utilisés, indiquer le génotype trouvé et le commenter et/ou l'interpréter en fonction du cas présenté.

Les génotypes rendus par les laboratoires ont été comparés à la réponse attendue. Le couple génotype trouvé et le commentaire/interprétation a été évalué par rapport au génotype attendu et au commentaire « type ».

Dans l'ensemble, les résultats (génotypes et commentaires) de cette opération sont satisfaisants : il n'y a pas eu d'erreur de génotypage, la marge de progrès se situe au niveau des commentaires (ou interprétations) des laboratoires et de l'harmonisation de l'expression des génotypes trouvés.

Par ailleurs, pour la première fois, les laboratoires avaient la possibilité, après l'avoir téléchargé, de reporter leurs résultats dans un formulaire électronique qu'ils ont pu expédier par courriel.

Méthode statistique et expression des résultats

Pour chaque échantillon, les laboratoires devaient indiquer le génotype trouvé. Cependant, aucune pré-formulation du génotype trouvé n'était proposée ; aussi, les tableaux de résultats présentent les nombres et/ou les pourcentages de génotypes similaires.

Les mutations et les génotypes sont exprimés selon la nomenclature internationale et/ou usuelle.

Pour la première fois et à titre expérimental, les laboratoires avaient la possibilité, après l'avoir téléchargé, de reporter leurs résultats dans un formulaire électronique qu'ils ont pu expédier par courriel. Ce moyen de rendu des résultats est particulièrement adapté pour ce type d'opération où l'essentiel du résultat, c'est-à-dire le commentaire/interprétation, est sous forme de texte qui lorsqu'il est manuscrit peut être difficile à « déchiffrer ». Ce mode de rendu a été utilisé par 34% des participants (22 laboratoires sur 65). Proportionnellement, les laboratoires qui recherchent les mutations du gène CFTR (échantillons « MUC ») sont les plus nombreux à l'avoir employé : 7 des 11 laboratoires qui n'ont reçu que les échantillons « MUC » ont expédié le formulaire électronique par courriel alors que 6 des 33 laboratoires qui n'ont reçu que les échantillons « HFE » pour recherche des mutations du gène HFE l'ont fait.

MUC006, MUC007

Recherche des mutations du gène CFTR (mucoviscidose)

Définition des échantillons

Les échantillons MUC006 et MUC007 sont des solutions d'ADN déjà extrait ; à chacun des échantillons correspond un cas brièvement décrit (tableau I).

tableau I – définition des échantillons

Echantillon	Génotype (*)	Cas clinique
MUC006	[p.Arg117His ;c.1342-6(T)7] + [=]	Monsieur JML MUC006 consulte dans le cadre d'un projet de procréation médicalement assistée. Monsieur JML MUC006 présente une azoospermie excrétoire par absence de canaux déférents. Une exploration du gène CFTR est prescrite. Quel est le résultat de votre analyse ?
MUC007	[p.Phe508del] + [p.Ile507del]	A l'examen systématique de la grossesse, à 20 semaines d'aménorrhée, de Madame A. MUC007, le gynécologue découvre à l'échographie une image d'intestin hyperéchogène. Un prélèvement de cellules amniotiques est réalisé, l'ADN est extrait. Une recherche de mutations du gène CFTR est prescrite. Quel est le résultat de votre analyse ?

(*) pour les mutations les plus fréquentes

Résultats des participants

En l'absence d'une liste pré-établie, les génotypes reportés par les laboratoires ont été encodés pour être exploités ; ils sont présentés dans le tableau II.

tableau II – génotypes exprimés

Echantillon	Génotype	Nombre de génotypes semblables/génotypes exprimés (%)
MUC006	[p.Arg117His ;c.1342-6(T)7] + [=]	28/30 (93%)
	[p.Arg117His] + [=]	2/30 (7%)
MUC007	[p.Phe508del] + [p.Ile507del]	29/29 (100%)

Les réactifs ou techniques utilisés devaient être indiqués dans la zone du formulaire de réponse prévue à cet effet. Les laboratoires ont cité un ou plusieurs réactifs ou techniques (tableau III) ; les réactifs commerciaux sont les plus cités (64% des dispositifs).

tableau III – réactifs ou techniques utilisés

Réactif ou technique	Nombre d'utilisateurs (*)
ABBOTT Cystic Fibrosis V.3.0	10
INNOGENETICS INNO LIPA CFTR17	12
INNOGENETICS INNO LIPA CFTR19	12
TEPNEL ELUCIGENE CF30	5
TEPNEL ELUCIGENE CF-HT v.2	1
PCR-DGGE (protocole "local")	1
PCR-DHPLC (protocole "local")	4
PCR-hétéroduplex ou PCR-PAGE (protocole "local")	5
PCR-séquençage	11
PCR-RFLP - enzyme x (protocole "local")	1
PCR non précisée ou code technique erroné	2

(*) : un ou plusieurs réactifs cités par laboratoire

Les laboratoires avaient la possibilité de commenter et/ou d'interpréter leurs résultats (mutation détectée, génotype trouvé). Les commentaires-types attendus, compte tenu de la définition des échantillons (tableau I) figurent dans le tableau suivant (tableau IV).

tableau IV : commentaires-types attendus

Echantillon	Commentaire-type attendu
MUC006	<p>Monsieur JML MUC006 consulte dans le cadre d'un projet de procréation médicalement assistée. L'analyse du gène CFTR par la technique a permis de mettre en évidence, chez cet homme, la présence de la mutation p.R117H à l'état hétérozygote, associée au variant IVS8T 7T. La mutation R117H associée à l'allèle 7T de l'intron 8 est une mutation non délétère (ou peu sévère) du gène CFTR fréquemment retrouvée dans les CFTR-RD (CFTR Related disorders). Ce résultat est compatible avec l'agénésie des canaux déférents observée chez Monsieur JML MUC006. Cependant, cette mutation, même associée en trans avec une mutation sévère du gène n'est pas responsable, ou très exceptionnellement, de formes classiques de mucoviscidose et il n'est donc pas recommandé de proposer une étude moléculaire dans la famille de Monsieur JML MUC006. Monsieur JML MUC006 devra bénéficier d'une exploration clinique plus poussée afin de vérifier si cette agénésie des canaux déférents est isolée ou si elle est associée à d'autres signes évocateurs de mucoviscidose. Monsieur JML MUC006 et sa conjointe devront également être vus en consultation de conseil génétique</p>
MUC007	<p>La recherche des mutations fréquentes du gène CFTR par la technique ... a révélé la présence des mutations p.F508del et p.I507del sur l'ADN extrait du liquide amniotique de Madame A. MUC007. Ces mutations sont deux mutations délétères du gène CFTR et le génotype p.F508del /p.I507del est compatible avec le diagnostic de mucoviscidose chez le fœtus de Madame A. MUC007. Cependant la recherche de ces deux anomalies devra être réalisée chez Madame A. MUC007 et son conjoint afin de montrer qu'ils sont chacun porteurs de l'une de ces deux mutations. Ce couple est à risque de 1 sur 4 de mucoviscidose pour chaque grossesse, et devra être vu en consultation de conseil génétique</p>

Compte tenu de la diversité des commentaires, il n'est pas possible de les reproduire ici dans leur intégralité. Tous les laboratoires ont commenté au moins un de leurs résultats ; on remarque que :

- pour l'échantillon MUC006, 6 laboratoires sur 30 n'ont pas interprété la nature de la mutation ou l'ont fait de façon ambiguë
- pour l'échantillon MUC007, 2 laboratoires qui ont déclaré ne pas être agréés pour le diagnostic prénatal ont réagi de façon différente : l'un n'a pas analysé l'échantillon alors que l'autre l'a analysé en précisant bien qu'il ne l'aurait pas fait en situation réelle.

Il faut rappeler que les échantillons sont des solutions d'ADN déjà extrait choisi d'abord pour les mutations qu'il présente ou non ; puis, les « cas cliniques » sont construits à partir des échantillons choisis.

Commentaires

Comme en 2005 et en 2007, aucune instruction particulière n'a été donnée pour ce qui concerne les modalités de rédaction des résultats et des commentaires. Malgré une assez grande hétérogénéité dans les réponses apportées, le couple génotype observé et commentaire/interprétation a été évalué pour chaque échantillon et chaque laboratoire. La conclusion de cette évaluation est rendue sous forme de lettres : A, B, C ou D. Cette conclusion de l'évaluation (A, B, C ou D) figurait sur le compte-rendu individuel du laboratoire ; elle était en règle générale complétée par un commentaire de l'expert.

Pour l'évaluation et la notation du commentaire de l'échantillon MUC006, 4 critères ont été pris en compte :

- la mention du réactif ou de la méthode utilisé (et donc des mutations recherchées)
- l'interprétation de la mutation identifiée
- les recommandations de :
 - o consultation de conseil génétique
 - o exploration clinique plus poussée

La note « A » a été attribuée à 11 laboratoires qui ont répondu à ces 4 critères ou pour lesquels seul manquait dans le commentaire la technique utilisée ou le terme exact de « conseil génétique » mais qui par ailleurs proposaient qu'une analyse du gène soit réalisée chez la conjointe.

La note « B » a été attribuée à 18 laboratoires pour lesquels au moins deux items ne figuraient pas dans le commentaire, ou dont l'interprétation était ambiguë, ou qui proposaient une recherche de la mutation chez les apparentés.

La note « C » a été attribuée à un laboratoire qui *recommandait* de réaliser la recherche de la mutation R117H chez les apparentés [1].

Pour l'échantillon MUC007, il était important de faire figurer dans le commentaire :

- le génotype
- l'interprétation du génotype (sévérité des mutations)
- la confirmation du diagnostic de mucoviscidose chez le fœtus
- la nécessité d'étudier les prélèvements des parents pour vérifier la ségrégation des mutations
- le conseil génétique.

Ainsi :

- 25 laboratoires ont obtenu la note « A ». Cependant, les 5 items attendus n'apparaissent que dans 3 commentaires. Dans la majorité des autres, la sévérité du génotype obtenu n'était pas discutée. De plus, 4 laboratoires indiquaient que l'absence de contamination maternelle n'avait pu être vérifiée.

- 4 laboratoires ont obtenu la note « B » :

- o pour 2 d'entre eux, les techniques utilisées ne permettaient pas de trancher définitivement sur le génotype : p.F508del/p.I507del ou p.I507del homozygote et p.F508del/p.I507del ou p.F508del homozygote + polymorphisme c.1519A>T. Cependant, pour confirmer le génotype, l'un de ces deux laboratoires recommandait l'étude des ADN parentaux, et l'autre proposait d'adresser le prélèvement à un laboratoire spécialisé
- o les 2 autres ne recommandaient pas l'analyse des parents avant de conclure sur le génotype du fœtus

- 1 laboratoire ne disposant pas de l'agrément pour le diagnostic prénatal a répondu qu'il avait transmis le prélèvement à un laboratoire extérieur compétent.

Conclusion

Les résultats de cette opération du Contrôle national de qualité réalisée dans le cadre du diagnostic moléculaire de la mucoviscidose sont satisfaisants : aucune erreur de génotypage n'a été relevée.

Cependant, il est important de noter que toutes les techniques utilisées n'ont pas permis de conclure sur le génotype p.F508del/p.I507del de l'échantillon MUC007.

L'interprétation du dossier MUC006 était délicate, ce qui explique que 18 sur 30 laboratoires ont obtenu la note B.

La qualité des commentaires est globalement en progression par rapport à 2007. Cependant, c'est à ce niveau que des améliorations restent possibles.

HFE006, HFE007

Recherche des mutations du gène HFE (hémochromatose)

Définition des échantillons

Les échantillons HFE006 et HFE007 sont des solutions d'ADN déjà extrait ; à chacun des échantillons correspond un cas brièvement décrit (tableau V).

tableau V – définition des échantillons

Echantillon	Génotype	Cas clinique
HFE006	p.[Cys282Tyr]+[Cys282Tyr]	Madame Yolande HFE006, née le 23 octobre 1955, consulte son médecin traitant pour asthénie. Le bilan biologique révèle une élévation du coefficient de saturation de la transferrine (52%) et de la ferritine sérique (425 µg/l). Le diagnostic d'hémochromatose de type 1 est évoqué. Aucune histoire familiale n'est mentionnée.
HFE007	p.[=] + [=] ; Absence de mutation p.Cys282Tyr du gène HFE	Monsieur Eric HFE007, né le 18 mai 1973, est adressé par un généticien dans le cadre d'une enquête familiale. En effet le diagnostic d'hémochromatose, associée à l'homozygotie p.Cys282Tyr du gène HFE, vient d'être posé chez son frère aîné. Le bilan martial montre une ferritinémie à 350 µg/l et un coefficient de saturation de la transferrine à 40%.

Résultats des participants

En l'absence d'une liste pré-établie, les génotypes reportés par les laboratoires ont été encodés pour être exploités ; ils sont présentés dans le tableau VI.

tableau VI – génotypes exprimés

Echantillon	Génotype	Nombre de génotypes semblables/génotypes exprimés (%)
HFE006	p.[Cys282Tyr] + [Cys282Tyr]	49/49 (100%)
HFE007	p.[=] + [=]	49/49 (100%)

Les réactifs ou techniques utilisés devaient être indiqués dans la zone du formulaire de réponse prévue à cet effet. Les laboratoires ont cité un ou plusieurs réactifs ou techniques (tableau VII). Comme en 2005 et en 2007, la technique PCR- RFLP (protocole « local ») est la plus citée.

tableau VII – réactifs ou techniques utilisés

Réactif ou technique	Nombre d'utilisateurs
VIENNALAB Haemochromatosis StripAssay A	2
VIENNALAB Haemochromatosis StripAssay B	2
PCR non précisée	1
PCR- temps réel (protocole "local") ou non précisé	16
PCR-DHPLC (protocole "local")	1
PCR-SSO (protocole "local")	2
séquençage	3
PCR-RFLP - enzyme x (protocole "local")	22

Les laboratoires avaient la possibilité de commenter leurs résultats (mutation détectée, génotype trouvé). Les commentaires-types attendus, compte tenu de la définition des échantillons (tableau V), figurent dans le tableau suivant (tableau VIII).

tableau VIII – commentaires-types attendus

Echantillon	Commentaire- type attendu
HFE006	Madame HFE006 porte la mutation p.Cys282Tyr à l'état homozygote. L'homozygotie pour la mutation p.Cys282Tyr du gène HFE confirme le diagnostic d'hémochromatose de type 1. Une enquête familiale doit être proposée aux apparentés au 1 ^e degré de Madame Yolande HFE006. Quand il existe des enfants mineurs il est recommandé de tester le conjoint. Si le conjoint est porteur de la mutation p.Cys282Tyr un test phénotypique sera réalisé dans un premier temps chez les enfants, le test génétique ne sera effectué qu'à leur majorité sauf si les paramètres du bilan martial sont augmentés
HFE007	Compte tenu du contexte familial et de l'absence de la mutation p.Cys282Tyr du gène HFE, le risque pour Monsieur HFE007 de développer une hémochromatose HFE de type 1 peut raisonnablement être écarté. Il serait utile de surveiller la ferritinémie, si la valeur reste supérieure aux valeurs usuelles du laboratoire, une exploration de cette hyperferritinémie devra être envisagée.

Compte tenu de la diversité des commentaires, il n'est pas possible de les reproduire ici dans leur intégralité. Cependant, quelques uns des commentaires peuvent être relevés.

Pour l'échantillon HFE006, 2 laboratoires ont proposé une IRM hépatique et/ou une ponction biopsie hépatique (PBH) ; on rappelle que les recommandations de la Haute autorité de santé (HAS) en matière d'actes nécessités par la prise en charge des affections longue durée comme l'hémochromatose de type 1 portent dans certains cas sur les conditions dans lesquelles ces actes doivent être réalisés [2]. Par exemple, la PBH peut être envisagée en cas de suspicion de cirrhose.

Pour l'échantillon HFE007, 2 laboratoires ont évoqué une surcharge en fer « non C282Y homozygote » sans évoquer, en premier lieu, une hyperferritinémie secondaire. En revanche, un autre laboratoire a affirmé que « l'absence de mutation C282Y et H63D n'est pas associée à un risque d'hémochromatose héréditaire HFE » en oubliant que des mutations rares du gène HFE sont responsables d'hémochromatose de type 1.

Commentaires

En ce qui concerne les génotypes observés, tous les laboratoires participants ont déterminé correctement le génotype des deux échantillons.

Aucune recommandation particulière n'a été donnée pour ce qui concerne les modalités de rédaction des résultats et des commentaires ou interprétation. Malgré une assez grande hétérogénéité dans les réponses apportées, l'ensemble génotype observé et commentaire/interprétation a été évalué pour chaque échantillon et chaque laboratoire. La conclusion de cette évaluation est rendue sous forme de lettres : A, B, C ou D. Cette conclusion de l'évaluation (A, B, C ou D) figurait sur le compte-rendu individuel du laboratoire ; elle était en règle générale complétée par un commentaire de l'expert.

Pour les deux échantillons, les traductions « littérales » du génotype observé sans conclusion ou autre commentaire n'ont pas été considérées comme de véritables commentaires/interprétation et cette absence a eu une incidence sur l'évaluation. Le détail par échantillon est le suivant :

- pour l'échantillon HFE006 :

La note « A » a été attribuée aux 37 laboratoires (sur les 49, soit 76%) qui avaient un génotype correct et un commentaire satisfaisant.

La note « B » a été attribuée aux 9 laboratoires (18%) qui avaient un génotype correct, mais ne mentionnaient pas l'étude familiale.

La note « C » a été attribuée aux 3 laboratoires (6%) qui ne commentaient pas le résultat et ne proposaient pas d'étude familiale.

En 2007, pour l'échantillon HFE004 présentant un génotype semblable, les pourcentages des notes « A », « B » et « C » étaient les suivants 69, 27 et 4%.

- pour l'échantillon HFE007 :

La note « A » a été attribuée aux 35 laboratoires qui avaient un génotype correct et un commentaire satisfaisant ; la note « B » a été attribuée aux 14 laboratoires qui avaient un génotype correct, mais ne commentaient pas le résultat ou le faisaient de façon confuse.

Par ailleurs, sur l'échantillon d'ADN HFE007, 33 laboratoires sur 49 (67%) ont également recherché la mutation H63D ; parmi eux 16 ont aussi recherché la mutation S65C. On rappelle que la mutation C282Y n'a pas été détectée sur cet échantillon. Par contre, sur l'échantillon HFE006 « homozygote C282Y », 14 laboratoires sur les 49 ont ajouté la recherche de la mutation H63D et/ou celle de la mutation S65C. Bien que, la Haute autorité de santé (HAS) estime dans un avis rendu en avril 2006, que « *Il n'y a pas de donnée identifiée montrant un intérêt diagnostique de la recherche de ces mutations [autres que la p.Cys282Tyr].*

Conclusion

Les résultats de cette seconde opération du Contrôle national de qualité réalisée dans le cadre du diagnostic moléculaire de l'hémochromatose sont satisfaisants. D'une part, toutes les analyses génotypiques sont correctes, ce qui confirme l'excellente maîtrise technique des laboratoires déjà constatée en 2005 et en 2007. D'autre part, bien que les génotypes soient encore exprimés de façon hétérogène, les commentaires des laboratoires sont de meilleure qualité.

Bibliographie

1. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations ; E Dequeker et al ; European Journal of Human Genetics (2009) 17, 51–65
2. Listes des actes et prestations - Hémochromatose liée au gène HFE (type 1) - www.has-sante.fr