

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Caractéristiques génétiques à des fins médicales	11CGM1	Décembre 2011
---	---------------	----------------------

**Mucoviscidose (gène CFTR)
Thrombophilies (gènes F2 et F5)**

Février 2013

Caractéristiques génétiques à des fins médicales 11CGM1

Jocelyne OTZ (ANSM) *
Martine ALHENC-GELAS (Hôpital européen Georges Pompidou - Paris)
Claude FEREC (CHU de Brest)

* : L'ANSM se substitue à l'Afssaps depuis le 1er mai 2012

Expédition : 7 décembre 2011

Clôture : 2 janvier 2012

Edition des comptes-rendus individuels : 25 juin 2012

Paramètres contrôlés :

MUC010 : recherche des mutations du gène CFTR (mucoviscidose)

THR008, THR009 : recherche des mutations des gènes F2 et F5 (thrombophilies)

Nombre de laboratoires concernés* : 84

Nombre de laboratoires participants** : 83

* 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 11CGM1 du Contrôle national de qualité « Caractéristiques génétiques à des fins médicales » a été organisée en décembre 2011.

En fonction des analyses qu'ils ont déclaré pratiquer, des solutions d'ADN déjà extrait ont été adressées aux laboratoires pour la recherche des mutations du gène CFTR (MUC010), du gène F2 et du gène F5 (THR008 et THR009). A chaque échantillon correspondait un cas clinique brièvement décrit.

Pour chaque échantillon, les laboratoires devaient préciser les réactifs ou les techniques utilisés et indiquer le génotype trouvé. Les laboratoires devaient également, en fonction du cas présenté, commenter et/ou interpréter le génotype trouvé. Pour l'échantillon MUC010, les commentaires/interprétation étaient libres ; en revanche, pour les échantillons « THR », les laboratoires étaient « guidés » par un questionnaire « *ad hoc* ».

Les génotypes rendus par les laboratoires ont été comparés à la réponse attendue. Le couple génotype trouvé et commentaire/interprétation (commentaire libre ou réponses aux questionnaires « *ad hoc* ») 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 à savoir : 100% des génotypes exprimés sont corrects pour l'échantillon MUC010, 98% pour l'échantillon THR008 et 96% pour THR009.

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.

L'expérimentation de la version électronique du bordereau-réponse à télécharger et à dactylographier, initiée en 2008, a été reconduite : 39% des participants (33 laboratoires sur 84) ont expédié par courriel leur formulaire de réponse dactylographié. Le taux de « rendu électronique » se stabilise : il était de 38% en 2010 et 39% en 2009. 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 ».

MUC010

Recherche des mutations du gène CFTR (mucoviscidose)

Définition des échantillons

L'échantillon MUC010 est une solution d'ADN déjà extrait ; un cas brièvement décrit lui est associé (tableau I).

tableau I – définition des échantillons

Echantillon	Génotype (*)	Cas clinique
MUC010	c.[2657+5G>A]+[=]	Madame MUC010, 25 ans, est la conjointe de Monsieur F., dont le frère est décédé de mucoviscidose, et qui est porteur à l'état hétérozygote de la mutation p.G551D. Une grossesse est en cours (7 SA).

(*) pour les mutations les plus fréquentes

Résultats des participants

En l'absence d'une liste pré-établie, les génotypes reportés par les laboratoires (nomenclature usuelle et/ou la nomenclature internationale) 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
MUC010	c.[2657+5G>A]+[=]	32/32 (100%) [*]

[*] : un laboratoire n'a pas rendu de génotype

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) ; comme en 2009 et en 2010, les réactifs commerciaux sont les plus cités (78% des dispositifs) et leur proportion a augmenté (65% en 2010 ; 63% en 2009)

tableau III – réactifs ou techniques utilisés

Réactif ou technique	Nombre d'utilisateurs (*)
ABBOTT Cystic Fibrosis V.3.0	13
INNOGENETICS CFTR Twin Set	1
INNOGENETICS INNO LIPA CFTR17	12
INNOGENETICS INNO LIPA CFTR19	12
TEPNEL ELUCIGENE CF29v.2	1
TEPNEL ELUCIGENE CF30	3
PCR-RFLP - enzyme x (protocole "local")	1
PCR-DHPLC (protocole "local")	2
PCR-hétéroduplex ou PCR-PAGE (protocole "local")	2
séquençage	7

(*) : un ou plusieurs réactifs cités par laboratoire

Les laboratoires avaient la possibilité de commenter et/ou d'interpréter leur résultat (mutation détectée, génotype trouvé). Le commentaire-type attendu, compte tenu de la définition de l'échantillon (tableau I) figure dans le tableau suivant (tableau IV).

tableau IV – commentaires-types attendus

Echantillon	Commentaire-type attendu
MUC010	Madame MUC010, conjointe de Monsieur F, hétérozygote p.G551D consulte afin de connaître le risque de mucoviscidose pour sa descendance. Une mutation c.2657+5G>A (2789+5G>A) a été identifiée chez Madame MUC010. Il s'agit d'une mutation peu sévère du gène CFTR, associée à des phénotypes variables, allant d'une mucoviscidose classique à des formes de révélation tardive ou monosymptomatiques. Il est important que Madame MUC010 et son conjoint bénéficient d'une consultation de Conseil génétique lors de laquelle un diagnostic prénatal pourra être évoqué. Madame MUC010 doit également être informée de l'intérêt de transmettre l'information aux membres majeurs de sa famille.

Tous les laboratoires ont commenté leur résultat, compte tenu de la diversité des commentaires, il n'est pas possible de les reproduire ici dans leur intégralité ; le paragraphe suivant permet d'en avoir un aperçu global.

Commentaires

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 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 MUC010, les critères suivants ont été pris en compte :

- utilisation de la nomenclature HGVS¹
- interprétation de la sévérité de la mutation
- recommandation dans le compte rendu
 - de proposer une consultation de conseil génétique pour le couple
 - d'informer les apparentés et/ou de leur proposer une analyse du gène CFTR.

Trente-trois laboratoires ont été notés.

La note A a été attribuée aux laboratoires qui n'ont pas fait d'erreur de nomenclature, qui ont interprété correctement la sévérité de la mutation et qui ont mentionné le Conseil génétique et la possibilité d'informer les apparentés.

La note B a été attribuée aux laboratoires qui ont commis des erreurs de nomenclature (ex : c.2789+5G>A) ou qui n'ont pas ou mal interprété la sévérité de la mutation.

La note C a été attribuée aux laboratoires qui ont fait des erreurs de nomenclature ET n'ont pas ou mal interprété la mutation.

Pour ce qui concerne la nomenclature :

23 laboratoires utilisent à la fois la nomenclature conventionnelle et la nomenclature HGVS

4 laboratoires n'ont utilisé que la nomenclature HGVS

4 laboratoires ont fait des erreurs de nomenclature c.2789+5G>A ou c.[2789+5G>A].

Pour l'interprétation de la mutation :

11 laboratoires n'ont pas fait de commentaire quant au phénotype associé avec cette mutation

1 laboratoire précise qu'elle entraîne un défaut d'épissage, sans référence au phénotype

7 laboratoires parlent de forme classique ou sévère de mucoviscidose

1 laboratoire classe cette mutation comme une mutation CFTR-RD

13 laboratoires évoquent des formes modérées, à large spectre, monosymptomatiques.

¹ HGVS : Human genome variation society

Au total,
13 laboratoires obtiennent une note A
15 laboratoires une note B
5 laboratoires une note C.

Conclusion

Les résultats de cette opération sont satisfaisants car aucune erreur de génotypage n'a été relevée ; il s'agissait d'une mutation « classique » mais pour laquelle le commentaire/interprétation du laboratoire était particulièrement important. La nomenclature internationale de HGVS est largement utilisée (seule ou associée à la nomenclature conventionnelle).

Les commentaires des laboratoires sont globalement assez détaillés ; cependant, c'est à ce niveau que des améliorations restent possibles.

THR008 et THR009

Recherche des mutations du gène F2 et du gène F5 (thrombophilies)

Définition des échantillons

Les échantillons THR008 et THR009 sont des solutions d'ADN déjà extrait ; à chacun des échantillons correspond un cas clinique brièvement décrit (tableau V).

tableau V – définition des échantillons

Echantillon	Génotype	Cas clinique
THR008	gène F5 : p.[Arg506Gln]+[=] gène F2 : g.[=]+[=] ; absence de la mutation 20210G>A (G20210A)	On considère que cette recherche des mutations Leiden du F5 et F2 20210 G>A a été demandée dans le cadre d'un bilan de thrombose veineuse réalisé chez Mme THR008, patiente asymptomatique de 30 ans avant sa mise sous contraceptif oral parce qu'une embolie pulmonaire est survenue chez sa grand-mère en post-opératoire à 70 ans. Aucun autre événement thromboembolique n'est survenu dans la famille. Comment réagissez-vous par rapport à cette demande ?
THR009	gène F5 : p.[=]+[=] ; absence de la mutation Arg506Gln (R506Q) gène F2 : g.[20210G>A]+[=]	Si l'on considère que la recherche des mutations Leiden du F5 et F2 20210 G>A a été réalisée chez Monsieur THR009 dans le cadre d'un bilan de thrombose dont la réalisation est pleinement justifiée par le contexte clinique, que mentionnez-vous sur le compte-rendu et pourquoi ?

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 (%)
THR008	gène F2 : g.[=]+[=] ; Absence de la mutation g.[20210G>A] (G20210A)	53/54 (98%)
	gène F5 : p.[Arg506Gln]+[=]	55/56 (98%)
	gène F2 : g.[20210G>A]+[=]	1/54 (2%)
	gène F5 : p.[=]+[=] ; Absence de la mutation p.[Arg506Gln] (R506Q)	1/56 (2%)
THR009	gène F2 : g.[20210G>A]+[=]	55/56 (98%)
	gène F5 : p.[=]+[=] ; Absence de la mutation p.[Arg506Gln] (R506Q)	52/54 (96%)
	gène F2 : g.[=]+[=] ; Absence de la mutation g.[20210G>A] (G20210A)	1/56 (2%)
	gène F5 : p.[Arg506Gln]+[=]	2/54 (4%)

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). Pour cette opération, les parts d'utilisateurs de la technique PCR-temps réel (protocole "local") et d'utilisateurs de réactifs commerciaux sont équilibrées avec respectivement 24 et 23 utilisateurs (pour le facteur V).

tableau VII – réactifs ou techniques utilisés

Réactif ou technique	Nombre d'utilisateurs
HAIN ThromboType - 2.0	1
ROCHE DIAGNOSTICS FACTOR II (PROTHROMBIN) G20210A KIT	20
ROCHE DIAGNOSTICS FACTOR V LEIDEN KIT	20
VIENNALAB FV-PTH StripAssay	2
VIENNALAB FV-PTH-MTHFR StripAssay	1
PCR-RFLP - enzyme x (protocole "local")	6
PCR-SSO (protocole "local")	1
PCR-temps réel (protocole "local") ou non précisé	24
séquençage	1

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

tableau VIII – commentaires-types attendus

Echantillon	Commentaire- type attendu
THR008	Le prescripteur est contacté afin de discuter de la pertinence de la prescription, car seuls les antécédents familiaux de MTEV (*) de 1er degré doivent être pris en compte pour proposer le dépistage des facteurs biologique de risque chez les sujets asymptomatiques (STV 2009, vol21, numéro spécial). Si les analyses devaient être ensuite réalisées, le commentaire attendu serait le suivant : le FV Leiden est un facteur de risque modéré de thrombose veineuse dont la présence doit être signalée aux médecins traitants pour établir une attitude préventive adéquate de la survenue des thromboses. Il serait bon de signaler que la prise d'estrogènes augmentant également le risque thromboembolique, la présence de la mutation amène à discuter le choix du contraceptif oral.
THR009	Hétérozygotie pour la mutation G20210A, facteur de risque modéré de maladie thromboembolique veineuse. Commentaire attendu : demande de confirmation sur un second prélèvement souhaitable (recommandations GEHT 2009) ; compte tenu de la présence de la mutation F2 G20210A, la recherche de tous les facteurs de risque établis de thrombose est nécessaire afin d'établir l'attitude thérapeutique la plus adaptée et pour discuter au mieux l'intérêt d'une enquête familiale en se référant aux recommandations publiées

(*) : maladies thromboemboliques veineuses

Lors des opérations précédentes, l'hétérogénéité des commentaires des laboratoires a été attribuée, en grande partie, à la diversité des organisations dans les différentes entités (laboratoire « de ville », laboratoire hospitalier spécialisé en hématologie ou non ...) – cf. Annales 10CGM1. Aussi, pour cette opération, les commentaires des laboratoires étaient « guidés » par un questionnaire « *ad hoc* ».

Ainsi pour l'échantillon THR008, la question du cas clinique était complétée par 3 autres questions :

Réalisez-vous d'emblée ces analyses ? (oui ou non)

Si non, que faites-vous ?

Si oui, comment commentez-vous le résultat sur le compte-rendu ?

Pour l'échantillon THR009, par les questions suivantes :

Demandez-vous un contrôle sur un second prélèvement ? (oui ou non)
 Demandez-vous une enquête familiale ? (oui ou non)
 Préciser pourquoi
 Proposez-vous des conseils thérapeutiques ? (oui ou non)
 Préciser lesquels

Compte tenu de la diversité des réponses aux questions « ouvertes », il n'est pas possible de les reproduire ici dans leur intégralité. Pour les questions « fermées », le nombre des réponses est présenté dans le tableau IX.

tableau IX – répartition des réponses aux questions « fermées »

Echantillon	Question	Réponse	
		Oui	Non
THR008 Rappel du cas clinique : Si l'on considère que cette recherche des mutations Leiden du F5 et F2 20210 G>A a été demandée dans le cadre d'un bilan de thrombose veineuse réalisé chez Mme THR008, patiente asymptomatique de 30 ans avant sa mise sous contraceptif oral parce qu'une embolie pulmonaire est survenue chez sa grand-mère en post-opératoire à 70 ans. Aucun autre événement thromboembolique n'est survenu dans la famille. Comment réagissez-vous par rapport à cette demande ?	Réalisez-vous d'emblée ces analyses ?	8 (15%)	47 (85%)
THR009 Rappel du cas clinique : Si l'on considère que la recherche des mutations Leiden du F5 et F2 20210 G>A a été réalisée chez Monsieur THR009 dans le cadre d'un bilan de thrombose dont la réalisation est pleinement justifiée par le contexte clinique, que mentionnez-vous sur le compte-rendu et pourquoi ?	Demandez-vous un contrôle sur un second prélèvement ?	46 (85%)	8 (15%)
	Demandez-vous une enquête familiale ?	38 (69%)	17 (31%)
	Proposez-vous des conseils thérapeutiques ?	30 (58%)	22 (42%)

Ces questionnaires « ad hoc » ont guidé les laboratoires et ont permis ainsi à 55 laboratoires sur 56, soit 98%, de commenter leurs résultats ; 81% d'entre eux l'avaient fait en 2010.

Commentaires

En ce qui concerne la recherche des mutations thrombogènes, on constate trois erreurs de génotypage commises par deux laboratoires.

Malgré l'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-évaluateur. Cependant, les traductions « littérales » du génotype observé sans conclusion ou autre commentaire n'ont pas été considérées comme de véritables commentaires/interprétation et n'ont pas été évaluées.

La note A a été attribuée quand le commentaire/interprétation était tel qu'attendu compte tenu de l'état des connaissances, B quand il n'était pas totalement satisfaisant, C ou D quand les commentaires n'étaient pas en accord avec l'état des connaissances. La note D a été attribuée, également, pour un génotype faux.

Le détail des notes est le suivant pour les commentaires évalués :

- pour l'échantillon THR008 :

La note « A » a été attribuée à 14 laboratoires (sur les 55 évalués, soit 25%), la note « B » à 27 laboratoires (49%), la note « C » à 13 laboratoires (24%) et « D » à 1 laboratoire (2%).

- pour l'échantillon THR009 :

La note « B » a été attribuée à 46 laboratoires (sur les 55 évalués, soit 84%), la note « C » à 7 laboratoires (13%) et « D » à 2 laboratoires (4%).

En ce qui concerne les génotypes, les trois erreurs observées sont concentrées sur deux laboratoires ; un laboratoire a confirmé l'inversion des deux échantillons. On note, comme les années précédentes, une grande

hétérogénéité inter-laboratoires dans le mode d'expression des résultats qui peut parfois nuire à leur compréhension. On ne peut donc que souligner la nécessité d'utiliser une nomenclature « normalisée » pour présenter les génotypes et/ou les mutations.

Tous échantillons confondus (THR007 et THR008), on observe que la majorité des laboratoires connaissent et suivent les recommandations élaborées en 2009 par le GEHT (Groupe d'étude de l'hémostase et de la thrombose) qui concernent la recherche des facteurs biologiques de risque dans le cadre de la maladie thromboembolique veineuse (STV 2009, volume 21, numéro spécial).

Ainsi, on observe que pour l'échantillon THR008, 85% des laboratoires (47 laboratoires sur 55) proposent de discuter avec le prescripteur avant de réaliser les analyses comme le contexte s'y prêtait sans conteste.

En revanche, pour l'échantillon THR009, compte tenu de l'absence d'informations précises concernant le patient, il était difficile de se positionner très clairement sur l'intérêt d'une enquête familiale et sur les conseils thérapeutiques ce qui se reflète dans les réponses des laboratoires. Pour cette raison, les réponses sont un peu hétérogènes ; elles reflètent le fait que certains laboratoires ont considéré que le seul facteur de risque présent chez le patient était la mutation de F2 alors que d'autres ont considéré que d'autres facteurs de risque pouvaient être présents. On notera le fait qu'aucune réponse n'a été notée « A ».

Dans l'ensemble les réponses démontrent que les laboratoires ont connaissance des recommandations du GEHT, même si certaines réponses concernant l'enquête familiale montrent qu'une relecture soigneuse du document est nécessaire.

Par ailleurs, 42% des laboratoires (22 sur 55) semblent considérer que les biologistes n'ont pas à participer au conseil thérapeutique des patients, alors que la discussion clinico-biologique fait partie de leurs fonctions.

Les échanges entre l'ANSM et les laboratoires après les évaluations n'ont porté que sur l'échantillon THR009 et tout particulièrement sur l'enquête familiale et les conseils thérapeutiques.

Conclusion

Les résultats de cette opération du Contrôle national de qualité réalisée dans le cadre du diagnostic moléculaire des thrombophilies sont satisfaisants. D'une part, les analyses génotypiques sont correctes à 98% pour le facteur II et à 96% pour le facteur V avec une inversion d'échantillons « reconnue » et d'autre part, 98% des laboratoires ont commenté et interprété leurs résultats en utilisant les questionnaires « *ad hoc* » qui étaient associés aux échantillons.

Il faut continuer à rappeler qu'un génotype clairement exprimé et un commentaire pertinent sont des éléments importants en génétique moléculaire.