

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Mucoviscidose (gène CFTR)
Hémochromatose (gène HFE)

Caractéristiques génétiques à des fins médicales **09CGM1** *Décembre 2009*

Edition : janvier 2011

Caractéristiques génétiques à des fins médicales

09CGM1

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

Expédition : 09 décembre 2009

Clôture : 11 janvier 2010

Edition des comptes-rendus individuels : 30 avril 2010

Paramètres contrôlés :

MUC008, MUC009 : recherche des mutations du gène CFTR (mucoviscidose)

HFE008, HFE009 : recherche des mutations du gène HFE (hémochromatose)

Nombre de laboratoires concernés* : 73

Nombre de laboratoires participants** : 69

* 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 09CGM1 du Contrôle national de qualité « Caractéristiques génétiques à des fins médicales » a été organisée en décembre 2009.

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 (MUC008 et MUC009) et du gène HFE (HFE008 et HFE009). 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 : les génotypages des échantillons pour la recherche de mutation du gène HFE ont été corrects à 99% ; ceux des échantillons pour la recherche des mutations du gène CFTR l'ont été à 100%.

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 (27 laboratoires sur 69) ont expédié par courriel leur formulaire de réponse dactylographié. 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 ».

MUC008, MUC009

Recherche des mutations du gène CFTR (mucoviscidose)

Définition des échantillons

Les échantillons MUC008 et MUC009 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 |
|-------------|--------------------------------|---|
| MUC008 | p.[Phe508del] (+) p.[Trp1282X] | Madame MUC008 est une primipare à 22 semaines d'aménorrhée. L'échographie réalisée au cours de la dernière consultation met en évidence une image d'intestin hyperéchogène. Un prélèvement de liquide amniotique est réalisé et l'ADN est transmis au laboratoire pour étude du gène CFTR. |
| MUC009 | p.[Arg553X] + [=] | Madame MUC009, 20 ans, est la compagne d'un patient présentant une agénésie des canaux déférents. Le couple consulte dans le cadre d'une procréation médicalement assistée. L'analyse du gène CFTR réalisée préalablement chez le conjoint a révélé un génotype p.F508del/p.R117H (7T). Une analyse du gène CFTR est demandée pour Madame MUC009. |

(*) 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 |
|-------------|--------------------------------|---|
| MUC008 | p.[Phe508del] (+) p.[Trp1282X] | 29/29 (100%) |
| MUC009 | p.[Arg553X] + [=] | 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 (63% des dispositifs).

tableau III – réactifs ou techniques utilisés

| Réactif ou technique | Nombre d'utilisateurs (*) |
|--|---------------------------|
| ABBOTT Cystic Fibrosis V.3.0 | 12 |
| INNOGENETICS INNO LIPA CFTR17 | 12 |
| INNOGENETICS INNO LIPA CFTR19 | 12 |
| TEPNEL ELUCIGENE CF30 | 5 |
| PCR-DGGE (protocole "local") | 1 |
| PCR-DHPLC (protocole "local") | 2 |
| PCR-hétéroduplex ou PCR-PAGE (protocole "local") | 5 |
| PCR-RFLP - enzyme x (protocole "local") | 1 |
| séquençage | 15 |

(*) : 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 |
|-------------|---|
| MUC008 | La recherche des mutations fréquentes du gène CFTR par la technique... a révélé la présence des mutations p.F508del et p.W1282X sur l'ADN extrait du liquide amniotique de Madame MUC008. Les mutations p.F508del et p.W1282X sont deux mutations délétères du gène CFTR. Ce résultat confirme le diagnostic de mucoviscidose chez le fœtus de Madame MUC008. La recherche de ces deux mutations devra cependant être réalisée chez Madame MUC008 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. |
| MUC009 | La recherche des mutations fréquentes du gène CFTR par la technique... a révélé la présence de la mutation p.R553X à l'état hétérozygote chez Madame MUC009. Il s'agit d'une mutation fréquente, sévère, du gène CFTR. Le conjoint de Madame MUC009 étant porteur de la mutation p.F508del et du variant p.R117H associé à l'allèle 7T, le risque pour ce couple, de donner naissance à un enfant qui aurait un génotype p.F508del/p.R553X et serait atteint de mucoviscidose est de 1 sur 4. Le risque que l'enfant ait un génotype p.F508del/p.R117H est également de 1 sur 4. Ce génotype peut conduire, chez un enfant de sexe masculin, à une stérilité par absence de canaux déférents mais peut très exceptionnellement être observé dans des formes de mucoviscidose peu sévères. Il est important que ce couple soit vu en consultation de conseil génétique afin d'envisager les possibilités de diagnostic prénatal ou préimplantatoire. |

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, comme en 2008 (échantillon MUC007), pour l'échantillon MUC008 qui figurait un prélèvement de liquide amniotique, 3 laboratoires ont déclaré ne pas être agréés pour le diagnostic prénatal. Ils ont réagi de façon différente : l'un l'a analysé en précisant bien qu'il ne l'aurait pas fait en situation réelle ; les autres ne l'ont pas analysé.

Ces échantillons du Contrôle national de qualité sont des solutions d'ADN déjà extrait sélectionné d'abord pour les mutations qu'il présente ou non ; puis, les « cas cliniques » sont construits à partir des échantillons choisis. Il serait difficile de reproduire exactement une situation réelle avec tous les protocoles associés (prélèvements connexes, autorisation...).

Parmi ceux qui ont commenté le génotype de l'échantillon MUC008, 24 ont précisé qu'il serait nécessaire d'analyser l'ADN des parents de MUC008 pour étudier la ségrégation familiale des mutations et confirmer leur statut hétérozygote. En revanche, seuls quelques laboratoires ont rappelé la nécessité de vérifier l'absence de « contamination » du prélèvement par des cellules d'origine maternelle.

Pour l'échantillon MUC009, la quasi-totalité des laboratoires a évoqué la nécessité de proposer au couple un diagnostic prénatal ou préimplantatoire mais ils n'ont pas toujours précisé la sévérité de la mutation.

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 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 MUC008**, 4 critères ont été pris en compte :
 - l'interprétation de la sévérité du génotype obtenu
 - la confirmation du diagnostic de mucoviscidose chez le fœtus
 - les recommandations suivantes :
 - étudier les parents pour vérifier la transmission des mutations
 - adresser le couple en consultation de conseil génétique.

La note « A » a été attribuée à 16 laboratoires qui ont répondu à ces 4 critères.

La note « B » a été attribuée à 10 laboratoires pour lesquels un item ne figurait pas dans le commentaire (le plus souvent l'interprétation de la sévérité du génotype obtenu).

La note « C » a été attribuée à 2 laboratoires :

- en raison d'un commentaire ambigu qui recommandait de compléter l'exploration clinique chez la patiente, alors qu'il s'agit en réalité d'ADN foetal
- en raison d'une erreur du nom de la patiente dans son commentaire/interprétation.

- **Pour l'échantillon MUC009**, il était important de faire figurer dans le commentaire :
 - l'interprétation de la sévérité de la mutation identifiée
 - le conseil génétique
 - le risque résiduel de mucoviscidose, en précisant le génotype.

Ainsi :

- 11 laboratoires ont obtenu la note « A »
- 18 laboratoires ont obtenu la note « B ». Dans la majorité des cas, en raison de l'absence d'interprétation de la sévérité de la mutation, ou parce que le génotype n'était pas précisé.
- 2 laboratoires ont obtenu la note « C » :
 - l'un parce qu'il ne fait pas la distinction entre le génotype [p.F508del] + [p.R553X] et [p.F508del] + [p.R117H] en terme de risque de mucoviscidose
 - le second car il manque l'interprétation de la sévérité de la mutation, le génotype n'est pas précisé, il n'y a pas de recommandation de conseil génétique pour le couple et enfin il est écrit que le polymorphisme de répétition polypyrimidique T7 est présent à l'état homozygote, ce qui est impossible.

On a remarqué qu'un laboratoire a obtenu la note « C » pour les deux échantillons.

Conclusion

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

Il était nécessaire d'être très précis dans l'interprétation du dossier MUC009, ce qui explique qu'une majorité de laboratoires aient obtenu la note « B ».

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

HFE008, HFE009

Recherche des mutations du gène HFE (hémochromatose)

Définition des échantillons

Les échantillons HFE008 et HFE009 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 |
|-------------|---------------------------|---|
| HFE008 | p.[Cys282Tyr]+[=] | Monsieur HFE008 Vincent né le 23/06/1975 est adressé par son gastro-entérologue pour suspicion d'hémochromatose HFE. Le bilan martial réalisé à jeun a mis en évidence une élévation de la ferritinémie (530µg/l) et du coefficient de saturation de la transferrine (56%). |
| HFE009 | p.[Cys282Tyr]+[Cys282Tyr] | Monsieur HFE009 Arthur né le 19/05/1978 consulte son médecin pour asthénie. Le bilan martial réalisé à jeun, à deux reprises, révèle une élévation du coefficient de saturation de la transferrine (72%-77%) et de la ferritinémie (670µg/l- 685µg/l) en dehors de tout syndrome inflammatoire et dysmétabolique. Le médecin prescrit la recherche de la mutation p.Cys282Tyr du gène HFE devant ces résultats évocateurs d'une hémochromatose. |

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. Un des résultats de génotypage de l'échantillon HFE009 est erroné.

tableau VI – génotypes exprimés

| Echantillon | Génotype (*) | Nombre de génotypes semblables/génotypes exprimés |
|-------------|---------------------------|---|
| HFE008 | p.[Cys282Tyr]+[=] | 52/52 (100%) |
| HFE009 | p.[Cys282Tyr]+[Cys282Tyr] | 51/52 (98%) |
| | Pas de mutation détectée | 1/52 (2%) |

(*) pour la mutation p.[Cys282Tyr]

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) ; en comparaison avec les années précédentes, la technique PCR- RFLP (protocole « local ») reste 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-DHPLC (protocole "local") | 1 |
| PCR-HRM (protocole "local") ou non précisé | 1 |
| PCR-RFLP - enzyme x (protocole "local") | 25 |
| PCR-SSO (protocole "local") | 3 |
| PCR-temps réel (protocole "local") ou non précisé | 15 |
| séquençage | 4 |

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 |
|-------------|--|
| HFE008 | Monsieur HFE008 Vincent est hétérozygote pour la mutation p.Cys282Tyr du gène HFE. L'hémochromatose est une maladie autosomique récessive et l'hétérozygotie p.Cys282Tyr ne peut à elle seule conférer la pathologie. Toutefois, si les perturbations du bilan martial persistent, une étude génétique plus exhaustive peut être envisagée après exclusion des causes secondaires de surcharge en fer. Une étude familiale doit être proposée aux apparentés au premier degré de Monsieur HFE008. |
| HFE009 | Monsieur HFE009 Arthur est homozygote pour la mutation p.Cys282Tyr du gène HFE. L'homozygotie pour la mutation p.Cys282Tyr confirme le diagnostic d'hémochromatose de type 1. Une enquête familiale doit être proposée aux apparentés au premier degré de Monsieur HFE009. S'il existe des enfants mineurs, il est recommandé de tester la conjointe. Si la conjointe présente la mutation p.Cys282Tyr, un test phénotypique sera réalisé chez les enfants, le test génétique ne sera effectué qu'à leur majorité sauf si les paramètres du bilan martial sont augmentés. |

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 HFE008, la plupart des laboratoires ont préconisé un suivi du bilan martial avec ou sans examens complémentaires ; par contre, ils ont été moins nombreux à proposer une étude familiale des apparentés au premier degré.

Quelques laboratoires ont évoqué la possibilité de proposer la recherche de la mutation p.Cys282Tyr chez la conjointe de M. HFE008. Cependant, les recommandations de la Haute autorité de santé (HAS) ne prévoient de recherche de la mutation que chez les apparentés du porteur de la mutation « C282Y » [1]. La remarque d'un laboratoire participant (cf. paragraphe suivant), nous a amenés à supprimer, du commentaire-type qui avait été proposé lors de l'édition des comptes-rendus individuels, la phrase suivante : « *La recherche de la mutation p.Cys282Tyr peut être proposée à sa conjointe afin d'évaluer chez les enfants le risque de développer une hémochromatose de type I.* ».

Ce laboratoire a fait remarquer que « *...Le fait de proposer au conjoint (ou à la conjointe) d'un patient C282Y homozygote un test génétique, afin d'évaluer le risque chez les enfants, devrait, à notre avis et selon notre expérience, ne constituer qu'une situation exceptionnelle et être adaptée à chaque cas familial. En effet, la détermination du génotype du conjoint (conjointe) ne permet d'obtenir qu'un risque théorique pour la descendance qui dépend du génotype du conjoint (conjointe). Il peut être à ce titre générateur d'angoisse supplémentaire pour le couple. Par ailleurs, dans le cas d'un conjoint si celui-ci n'est porteur*

¹ HAS : CONSENSUS FORMALISÉ - Prise en charge de l'hémochromatose liée au gène HFE - (hémochromatose de type 1) – Recommandations ; Juillet 2005 ; www.has-sante.fr

d'aucune mutation, ce test ne permet pas de rassurer totalement la famille et met le clinicien dans une situation difficile, puisqu'il devra possiblement expliquer que le risque résiduel (10% environ) résulte de la possibilité de non paternité. ... ».

La réponse de notre expert a été la suivante : « ... Notre interprétation s'est inspirée d'un commentaire formulé lors d'un contrôle de qualité mis en place par l'EMQN. Même s'il n'existe pas de consensus à ce sujet, il n'est cependant pas aberrant de proposer de tester le conjoint du fait de la fréquence de la mutation dans la population générale... » [2]

Pour l'échantillon HFE009, la plupart des laboratoires ont proposé une enquête familiale. Toutefois, certains l'ont juste évoquée sans préciser que cette enquête familiale est destinée aux apparentés du premier degré ni quel est le risque pour les enfants.

Commentaires

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.

La note « A » a été attribuée quand le génotype et le commentaire étaient corrects ; la note « B » quand le commentaire était incomplet, le plus souvent, parce qu'aucune étude familiale et/ou exploration complémentaire n'était proposée ; la note « C » quand le génotype n'était pas commenté ou que le commentaire n'était pas explicite ou pas approprié ; la note « D » en cas d'erreur de génotypage pour les mutations recherchées.

Le détail des notes attribuées par échantillon est le suivant :

- pour l'échantillon HFE008 :

La note « A » a été attribuée à 10 laboratoires (sur les 52, soit 19%), la note « B » à 31 laboratoires (60%), « C » à 10 laboratoires (19%) et « D » à 1 laboratoire qui s'est trompé pour la recherche de la mutation H63D. En effet, nous avons considéré que, bien que la recherche de mutations autres que la C282Y ne soit pas recommandée, le génotype rendu doit être exact pour toutes les mutations recherchées.

En 2007, pour l'échantillon HFE005 présentant un génotype semblable, les pourcentages des notes « A », « B » et « C » étaient les suivants 69, 27 et 4% ; la différence de proportion des notes s'explique par un contexte clinico-biologique différent qui nécessitait un commentaire plus complet pour l'échantillon HFE008.

- pour l'échantillon HFE009 :

La note « A » a été attribuée à 40 laboratoires (sur les 52, soit 77%), la note « B » à 10 laboratoires (19%), « C » à 1 laboratoire (2%) et « D » à 1 laboratoire (2%) qui s'est trompé pour la recherche de la mutation C282Y. En 2008, pour l'échantillon HFE006 présentant le même génotype pour la mutation C282Y, les proportions des notes étaient semblables.

Par ailleurs, sur l'échantillon d'ADN HFE009, comme en 2008, 29% des laboratoires (15 sur 52) ont également recherché la mutation H63D ; parmi eux, 6 ont aussi recherché la mutation S65C. Dans le cas présent, le praticien avait demandé la recherche de la mutation p.Cys282Tyr pour établir le diagnostic d'hémochromatose, il n'y avait donc pas lieu de rechercher d'autre(s) mutation(s). De plus, 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].

² EMQN : European molecular genetics quality network

Conclusion

Les résultats de cette opération du Contrôle national de qualité réalisée dans le cadre du diagnostic moléculaire de l'hémochromatose sont globalement corrects. Les analyses génotypiques étaient exactes à 99%. Les commentaires des laboratoires manquaient de précision pour l'échantillon HFE008 ; en revanche, ils étaient globalement satisfaisants pour l'échantillon HFE009.

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