

Du gène au test

L'évolution des connaissances en génétique entraîne une augmentation de la demande de tests génétiques. Or la fiabilité de ces tests et leur utilisation posent des problèmes spécifiques.

**Emmanuelle
Girodon**

Praticien hospitalier
en génétique, CHU
de Créteil

De la connaissance du gène au test utilisable en clinique

Le domaine de la génétique moléculaire, l'étude des gènes responsables de maladies, est en constante évolution. L'achèvement du programme « génome humain », la découverte incessante de gènes, le progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires des maladies génétiques, parallèlement au développement quelquefois fulgurant des techniques, concourent à l'augmentation de l'offre et de la demande de tests génétiques. La génétique moléculaire, initialement tournée vers les maladies monogéniques graves de l'enfant (telles la myopathie de Duchenne, la mucoviscidose), avec un but essentiellement de diagnostic prénatal, se tourne depuis quelques années vers les maladies monogéniques de déclaration tardive, chez l'adulte (telle la chorée de Huntington), ainsi que vers l'oncogénétique (les cancers du colon, du sein) et, plus récemment, vers les maladies multigéniques ou multifactorielles, comme l'hypertension artérielle ou le diabète. Cela s'effectue dans un but de diagnostic, de meilleure prise en charge de la maladie, mais aussi dans un but de diagnostic présymptomatique : c'est l'« ère » de la prédiction génétique.

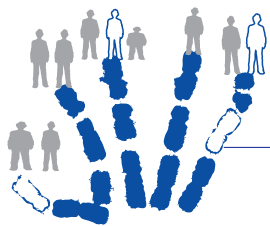
À cette considérable évolution s'opposent encore certaines limites : des techniques mêmes, de l'interprétation des résultats d'étude (les tests fonctionnels qui permettent de démontrer le caractère pathogène d'une mutation identifiée chez un patient ne sont disponibles que pour très peu de maladies), de la gestion clinique des résultats. Il existe également une grande hétérogénéité des prises en charge génétiques, dans

la prescription des examens, dans la démarche des laboratoires, voire dans l'interprétation des résultats. Cette hétérogénéité devrait progressivement s'effacer. Le décret d'application du 23 juin 2000 de la loi bioéthique du 29 juillet 1994 encadre les conditions de prescription et de réalisation des tests génétiques, qui concernent la cytogénétique (l'étude des chromosomes), la génétique moléculaire, et quelques tests analysant des protéines, produits des gènes. La pratique de la génétique moléculaire en France s'organise en réseaux entre les laboratoires et avec les généticiens cliniciens, élaborant des recommandations nationales suivant les recommandations européennes, appliquant une démarche d'assurance qualité et instaurant progressivement un contrôle de qualité des tests. Tout cela devrait garantir une certaine harmonisation dans la démarche de prise en charge des maladies génétiques.

Stratégies, outils et limites de la génétique moléculaire

La génétique moléculaire s'est initialement développée dans les laboratoires de recherche, et a été progressivement transférée dans les laboratoires hospitaliers de diagnostic. Quelques grands laboratoires privés ont une activité de génétique moléculaire, qui reste réservée aux actes simples pour les maladies les plus fréquentes (hémochromatose, mucoviscidose). Le développement technologique, resté dans le domaine public jusque dans les années quatre-vingt-dix, se fait à présent majoritairement dans les entreprises privées, en partie faute de moyens dans le système public.

Le diagnostic génotypique peut être abordé selon deux approches : l'approche directe consiste à rechercher les anomalies d'un gène responsables de la maladie ; l'approche indirecte consiste à repérer le(s) chromosome(s) associé(s) à la maladie à l'aide de marqueurs ADN, non pathogènes en eux-mêmes, situés à proximité ou, au mieux, dans le gène de la maladie (tableau 1) [29]. Cette approche implique obligatoirement d'étudier



un sujet atteint (appelé cas index). Elle est assortie d'un risque d'erreur lié notamment à la recombinaison possible entre un marqueur ADN et le gène. Elle est encore la seule possible pour un grand nombre de maladies, pour lesquelles la localisation du gène est connue, mais la séquence de celui-ci ou la pathologie moléculaire ne le sont pas, ou bien la pathologie moléculaire est complexe et l'approche directe lourde.

L'hétérogénéité des mécanismes moléculaires gouvernant les maladies génétiques définit autant de stratégies et d'approches moléculaires permettant d'identifier les anomalies génétiques responsables [46]. La très grande majorité des maladies se caractérise par une hétérogénéité allélique, c'est-à-dire qu'un grand nombre de mutations d'un même gène peuvent être responsables d'une maladie (mucoviscidose, myopathie de Duchenne). D'autres maladies encore sont associées à une hétérogénéité de locus, c'est-à-dire que plusieurs gènes peuvent être impliqués dans une même maladie (un seul gène par famille) (certaines myopathies, surdités, ou rétinites pigmentaires). La pratique des généticiens moléculaires requiert à la fois une compétence technologique et une compétence spécifique des maladies prises en charge dans le laboratoire (tableau 2).

Il existe une grande variété d'outils d'étude des anomalies génétiques. Ceux-ci peuvent s'appliquer à l'étude de l'ADN, présent dans toutes les cellules de l'organisme, donc dans les lymphocytes sanguins, ou à celle de l'ARN, dont l'accessibilité est limitée aux cellules des tissus où le gène est exprimé. Lorsque le gène s'exprime dans les lymphocytes sanguins ou dans d'autres cellules facilement accessibles, il peut être avantageux d'étudier l'ARN, qui contient une majeure partie de la séquence du gène où se trouvent les mutations, plutôt que l'ADN, en particulier pour certains grands gènes.

Parmi les méthodes de détection des mutations, on distingue celles fondées sur la recherche spécifique d'une ou plusieurs mutations connues (techniques de « criblage »), de celles dites de « balayage » (*scanning* en anglais), qui détectent n'importe quelle variation de séquence dans une séquence d'ADN ou d'ARN de quelques centaines de paires de bases, sans préjuger de leur localisation ni de leur nature [23]. Ce sont ces dernières qui permettent de déterminer le spectre des mutations les plus fréquentes responsables d'une maladie, et, de là, de définir et mettre au point les outils de criblage les mieux adaptés au diagnostic moléculaire, qui sont ainsi utilisés en première intention. Toutes les méthodes ont leurs limites et il ne serait pas judicieux de vouloir imposer une technologie particulière pour une application donnée, mais les laboratoires se doivent de parfaitement connaître les avantages et limites des tests qu'ils utilisent. De plus, les avantages et limites de certaines techniques sont à considérer selon les indications du test génétique. Certains aspects des techniques peuvent constituer, selon l'indication, un avantage ou un inconvénient.

tableau 1

Approches du diagnostic génotypique et leurs limites

Diagnostic direct	Diagnostic indirect
Principe	Principe
Identification de(s) allèle(s) morbide(s) par mise en évidence de la (des) lésion(s) responsable(s) de la maladie Seule approche possible dans certaines situations :	Identification de(s) allèle(s) morbide(s) par leur liaison à un (des) allèle(s) marqueur(s), en étudiant la cosegrégation, au sein de la famille, des allèles du (des) marqueur(s) avec la maladie Cas index indispensable dans la grande majorité des situations
<ul style="list-style-type: none"> ● absence de cas index (décédé ou absent) ● diagnostic incertain ● hétérogénéité génétique 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hétérogénéité génétique ● Informativité ● Néomutation, mosaïcisme germinal
Limites	Limites
<ul style="list-style-type: none"> ● Hétérogénéité moléculaire ● Anomalies plus ou moins connues ● Grand gène 	<ul style="list-style-type: none"> ● Recombinaison ● Fausse paternité
	Risques d'erreurs
	<ul style="list-style-type: none"> ● Recombinaison ● Fausse paternité

tableau 2

Quelques exemples de pathologie moléculaire de maladies

Maladies	Taille du gène*	Pathologie moléculaire
Drépanocytose	2 kb	1 mutation ponctuelle
Mucoviscidose	230 kb	> 1 000 mutations ponctuelles
Hémophilie A	186 kb	Micro-inversions intra-chromosomiques et mutations ponctuelles
Myopathie Duchenne	>2 000 kb	Délétions++, duplications et mutations ponctuelles
Amyotrophie spinale infantile de type 1	20 kb	Délétion partielle du gène SMN
X-fragile	38 kb	Amplification variable d'un triplet CCG
Chorée de Huntington	180 kb	Amplification variable d'un triplet CAG

* kb : kilobases

Techniques de « criblage » [23, 39]

Toutes sont appliquées à des fragments de gène amplifiés un nombre considérable de fois (PCR). Cette amplification, obtenue en quelques heures, permet de travailler à partir d'infimes quantités d'ADN.

On assiste à un développement, par les industriels, de trousse commerciales qui détectent les mutations les plus fréquentes et sont automatisées ou semi-automatisées. Ces trousse sont très simples à utiliser, et leur application semble bien standardisée. Leur utilisation génère un surcoût par rapport aux techniques « maison » en termes de réactifs, mais permet une économie en temps personnel. Les trousse qui existent sur le marché ne concernent que peu de maladies, pour lesquelles les demandes d'étude doivent être relativement nombreuses et le test relativement rentable, c'est-à-dire que le taux de couverture des mutations doit être important : c'est le cas pour la mucoviscidose, la β -

thalassémie, le déficit en alpha1-anti-trypsin et l'hypercholestérolémie familiale essentielle. De telles troupes se développent beaucoup plus dans les domaines de l'infectiologie et de la cancérologie que dans le domaine des maladies héréditaires graves de l'enfant.

La simplicité de l'utilisation des troupes commerciales a un revers : ces troupes deviennent à la portée du laboratoire qui n'a pas le savoir de la pathologie. Or l'utilisation de techniques appliquées à une pathologie requiert non seulement une maîtrise technique, mais également une connaissance de la pathologie clinique et de la pathologie moléculaire. Le dialogue avec le clinicien est à cet égard essentiel. En particulier, il faut savoir, en fonction des situations, interpréter un résultat négatif, ce d'autant que la facilité d'accès aux troupes commerciales risque d'entraîner une augmentation du nombre de demandes (c'est le cas pour la mucoviscidose). Faut-il arrêter les investigations génétiques ou, au contraire, faut-il poursuivre l'étude du même gène à la recherche de mutations plus rares, ou bien encore faut-il réorienter la recherche étiologique ?

Un inconvénient majeur de ces troupes est que les systèmes sont fermés ; l'utilisateur ignore la composition des réactifs. Aussi, il lui sera difficile de comprendre la cause d'un dysfonctionnement d'une analyse et de trouver le remède, à moins de disposer d'autres outils d'analyse du gène. C'est là que la notion de réseau entre les laboratoires et la reconnaissance de laboratoires de référence a toute son importance.

Techniques de balayage [39]

Appliquées également à des fragments de gènes amplifiés par PCR, elles restent encore le plus souvent des techniques « maison », dont la sensibilité varie selon les laboratoires. Ces méthodes se sont développées initialement dans le cadre de la recherche afin de pouvoir identifier des mutations nouvelles dans des gènes de maladies, que ce soit pour établir un spectre de mutations dans un gène de maladie, ou pour valider un gène candidat pour une maladie. Elles sont maintenant appliquées en routine dans certains laboratoires de diagnostic qui sont considérés comme des laboratoires de référence dans la mesure où, étudiant un gène de maladie de façon relativement « exhaustive », ils font plus que rechercher les anomalies les plus fréquentes, et peuvent ainsi prendre le relais d'autres laboratoires dans certaines situations. Les laboratoires préfèrent les techniques qui allient sensibilité, reproductibilité, innocuité, simplicité de mise en œuvre et possibilité d'étudier de nombreux échantillons à la fois. Le choix des méthodes pour le diagnostic dépend également du gène lui-même, de sa longueur, de sa structure et de ce que l'on connaît de la pathologie moléculaire. Encore une fois la tendance est à la simplification et à l'automatisation des procédures. Par exemple, l'électrophorèse en gels dénaturants (DGGE) est une méthode sensible et reproductible appréciée des laboratoires de

diagnostic qui en ont la maîtrise, mais n'est pas automatisable. Une autre méthode, la chromatographie à haute pression en conditions dénaturantes (DHPLC), apparaît prometteuse du fait de la simplicité de sa mise en œuvre et de son caractère semi-automatisé. La limite au développement de cette technique est le coût élevé de l'appareil (500 000 à 600 000 F). De fait, la simplification et l'automatisation des procédures imposent des équipements lourds et coûteux : séquenceur d'ADN, automate de préparation des réactions d'amplification de l'ADN, ce qui constitue un frein à l'évolution des laboratoires. Certaines entreprises privées offrent aux laboratoires de diagnostic et de recherche des prestations de séquençage de l'ADN, mais peu de laboratoires y ont recours.

Techniques de détection de remaniements géniques

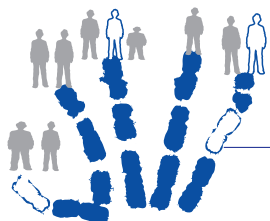
La détection de tels remaniements (délétions, inversions, duplications de fragments de gènes ou de chromosomes) fait historiquement appel à la technique de « *Southern blot* », qui impose de travailler avec 10 à 20 fois plus d'ADN que la technique de PCR, ce qui constitue une difficulté pour le diagnostic prénatal par exemple, et impose un délai de rendu de résultats de 7 à 10 jours. Encore considérée comme une technique de référence que les laboratoires de diagnostic doivent continuer à maîtriser, elle est supplantée, d'une part par les techniques de PCR-longue, qui amplifient de très longs fragments d'ADN (10 à 30 kilobases), d'autre part par les techniques de PCR quantitative en « temps réel » qui permettent, en quelques heures, de déterminer le nombre de copies d'un gène chez un sujet donné, et de faire ainsi le diagnostic de délétion ou de duplication.

Nouvelles technologies

Les puces à ADN, dont le principe repose sur l'hybridation à un très grand nombre d'oligonucléotides immobilisés sur un support miniaturisé, permettent en particulier, dans le cadre du diagnostic moléculaire, de faire du séquençage d'ADN, ou de détecter simultanément un très grand nombre de mutations ponctuelles [8]. Cette technologie très puissante, susceptible de révolutionner la pratique des laboratoires de génétique moléculaire, est encore dans une phase de recherche et de développement, et reste pour l'instant hors de portée des moyens financiers des laboratoires publics de diagnostic.

Conclusion

Malgré une formidable évolution des connaissances en génétique et les considérables progrès technologiques des dernières années, la pratique de la génétique moléculaire repose toujours sur des techniques manuelles, non encore automatisées. Chaque maladie pose des problèmes spécifiques, aussi bien stratégiques que techniques. Cela requiert des praticiens une haute spécialisation et une capacité à s'adapter à des méthodes constamment évolutives. ■



Le dépistage des facteurs de risque biologiques comme outil d'aide à la décision :

Dans le cadre d'une politique de santé publique, les tests de dépistage sont efficaces s'ils sont utilisés sur une population ciblée à risque.

L'utilisation pertinente des tests diagnostics et de dépistage requiert la connaissance des notions de base en matière d'épidémiologie analytique et d'analyse décisionnelle. L'objectif est d'accroître la rationalité des décisions diagnostiques et thérapeutiques et d'évaluer leur efficacité en fonction de leur coût. La connaissance de ces éléments permet de comprendre une notion fondamentale en médecine : le caractère relatif des résultats des examens complémentaires. Seuls les tests dont la réponse est binaire (malade/non malade) sont envisagés dans cet article.

Validité d'un test, sensibilité, spécificité, valeurs prédictives

Le terme de « test » est utilisé ici dans le sens de « source d'information » [1] : il pourrait donc s'agir d'une démarche clinique (examen clinique d'un malade, y compris l'interrogatoire) ou paraclinique (prescriptions d'examens complémentaires). Nous considérerons ici les exemples pertinents pour le dépistage biologique, pré-symptomatique, d'une maladie familiale.

Les caractéristiques d'un test sont de deux ordres : d'une part celles qui relèvent exclusivement du test lui-même, ce sont la sensibilité et la spécificité, et d'autre part celles qui sont relatives à l'utilisation du test pour une population donnée, les valeurs prédictives. Dans ce second cas, les qualités du test dépendent à la fois de ses caractéristiques intrinsèques (sensibilité et spécificité) et des caractéristiques de la population à qui ce test est appliqué. Dans le cas de la mucoviscidose par exemple, on peut envisager trois niveaux de population dépistée : la population générale, les familles dans lesquelles il existe des antécédents de maladie ou les enfants ayant présenté des signes d'infection bronchique récidivante.

L'intérêt des tests diagnostics, utilisés seuls ou en association, est de préciser la probabilité qu'un patient soit, ou non, porteur d'une maladie ; cette fonction est exprimée par les valeurs prédictives (respectivement positive [VPP] et négative [VPN]). Il faut distinguer, en particulier dans le cas de la médecine prédictive et du dépistage des maladies génétiques, deux notions de « valeur prédictive ». La valeur prédictive du test de dépistage, qui est la notion étudiée dans ce texte, et la notion de valeur prédictive du gène. Dans ce premier cas, on répond à la question : si le résultat du test est positif, quelle est la probabilité que le patient présente vraiment l'anomalie génétique considérée ? La seconde question est en fait la plus importante, mais le test seul ne permet pas d'y répondre : devant une anomalie mono- ou polygénique, quelle est la probabilité que le patient développe la maladie ?

Rappel : Sensibilité et spécificité

Les tests sont caractérisés par deux paramètres, la sensibilité et la spécificité.

La sensibilité est la probabilité qu'un test soit positif si le patient est porteur de la maladie ; la spécificité est la probabilité qu'un test soit négatif si le patient est indemne de la maladie considérée.

Les vrais positifs sont les résultats positifs chez les patients qui ont la maladie, les faux positifs sont les résultats positifs chez les patients qui n'ont pas la maladie. Les vrais négatifs sont les résultats négatifs chez les patients qui n'ont pas la maladie, les faux négatifs sont les résultats négatifs chez les patients qui ont la maladie.

Il est important de comprendre que la sensibilité et la spécificité sont des caractéristiques intrinsèques du test et sont donc indépendantes du type de patient testé. Par exemple, si un dosage sérique a une sensibilité de 99 %, cela signifie que, si on répète 100 fois le même dosage sur le même sérum d'un patient malade, il sera positif dans 99 cas et négatif dans 1 cas. Si la spécificité est de 98 % et si on répète 100 fois le même dosage sur le même sérum d'un patient non malade, il sera négatif dans 98 cas

et positif dans 2 cas. Le fait que la sensibilité et la spécificité ne soient pas égales à 100 % traduit les imperfections techniques du test, et n'a rien à voir avec le malade.

En général, on ne sait pas *a priori* si le patient est malade ou pas (c'est précisément ce que l'on cherche à savoir en examinant un malade ou en prescrivant des examens complémentaires) ; ces notions fondamentales pour évaluer les qualités diagnostiques d'un test ont peu d'utilité directe en pratique clinique.

Valeur prédictive positive ou négative (VPP et VPN)

La question posée par le clinicien est la suivante : devant un résultat positif (ou négatif) de test, quelle est la probabilité pour que le patient soit malade (ou non malade) ? Dans le cas de la médecine prédictive, rappelons que se rajoute une seconde étape : devant un résultat positif, quelle est la probabilité que le patient soit vraiment porteur de l'anomalie et, si le patient est vraiment porteur de l'anomalie, quelle est la probabilité qu'il développe ensuite la maladie ? Pour certaines maladies comme la maladie de Huntington, cette seconde probabilité est de 1, mais dans d'autres situations comme la mutation BRCA1 ou BRCA2, la probabilité est estimée de 0,06 à 0,4 pour le cancer de l'ovaire [42]. Dans ces situations, il faut cumuler (multiplier) les probabilités que le patient soit vraiment porteur de la mutation si le test est positif et la probabilité de développer la maladie si la mutation est présente.

La valeur prédictive positive (probabilité que la personne soit vraiment porteuse de la mutation si le test est positif) dépend donc des caractéristiques du test (sensibilité ou spécificité), et de la probabilité *a priori* que le patient ait la maladie (ou pas), c'est-à-dire la prévalence de la mutation dans la population considérée.

La principale caractéristique de la population qui sera utilisée pour définir la validité d'un test est donc la prévalence : c'est la probabilité *a priori* qu'une maladie ou une mutation soient présentes chez n'importe quel individu pris au hasard dans la population. Le test diagnos-

les concepts

tique va chercher à préciser cette probabilité et à passer de la probabilité dans la population générale à une probabilité pour le patient considéré. Par exemple, si la prévalence de la mucoviscidose est de 1/3 000 dans la population générale, cela signifie qu'une personne prise au hasard dans la rue a 1 chance sur 3 000 d'avoir la maladie. Ce chiffre étant inutile car trop faible pour décider d'une quelconque action thérapeutique ou préventive, on va chercher à préciser cette probabilité avec différents tests biologiques.

L'objectif des tests est de faire varier cette probabilité conditionnelle, l'augmenter (dans le sens de la confirmation du diagnostic) ou la diminuer (vers la récusation du diagnostic).

La valeur prédictive positive d'un test est la probabilité que le patient ait vraiment la mutation si le résultat du test est positif ; la valeur prédictive négative est la probabilité que le patient soit indemne si le résultat du test est négatif.

L'ensemble de ces résultats peut être

résumé dans un tableau de contingence, qui peut être exprimé en effectifs ou en probabilités (tableau 1).

Ce qu'il est fondamental de comprendre, c'est que le résultat positif (ou négatif) d'un test n'a pas la même valeur d'un patient à l'autre : tout dépend de la probabilité qu'avait le patient *a priori* (c'est-à-dire avant qu'on ait effectué le test) d'être porteur (ou non) de la maladie.

Par exemple, un test a une sensibilité de 90 % et une spécificité de 95 %. On réalise ce test de manière systématique sur la population générale où la probabilité de la mucoviscidose est de 1/3 000. Si le résultat est positif, la probabilité que le patient soit vraiment malade (c'est-à-dire la valeur prédictive positive) est de 2 %.

	Malades	Non-malades	Total
Test positif	2,7	100	102,7
Test négatif	0,3	9 897	9 897,3
Total	3,0	9 997	10 000

Cela signifie que le patient à qui on annonce qu'il est probablement malade a

en fait à peine plus que 2 chances sur 100 de l'être vraiment. Cela peut signifier, au mieux, que l'on prescrit un traitement inutile dans 98 cas sur 100, au pire que l'on expose 98 patients sur 100 pour rien à des complications iatrogènes et à l'anxiété de se savoir porteur d'une maladie.

En revanche, si le même test (c'est-à-dire avec la même sensibilité et la même spécificité) est prescrit à un patient chez qui existe une forte suspicion *a priori* de maladie, comme par exemple des infections bronchiques à répétition, avec une probabilité *a priori* de 1/10, le résultat positif indique que le patient a une probabilité de 0,9 d'être vraiment porteur de la maladie.

	Malades	Non-malades	Total
Test positif	9	1	10
Test négatif	1	89	90
Total	10	90	100

On peut multiplier les exemples qui tendent à montrer que :

- un résultat positif chez un patient qui avait *a priori* très peu de risque d'avoir la maladie doit être considéré avec beaucoup de prudence : il y a de fortes chances pour que ce soit un faux positif. Cela est d'autant plus important qu'il s'agit d'une maladie qui impose un traitement ou des investigations supplémentaires risquées. Ce principe général explique pourquoi les dépistages non ciblés sont en général peu contributifs à une politique de santé publique.

- un résultat négatif chez un patient qui avait une faible probabilité d'avoir la maladie a une bonne probabilité d'aider à éliminer le diagnostic. Cela implique qu'un résultat négatif a une valeur en soi, et ne doit pas être considéré comme une erreur de prescription.

- un résultat positif chez un patient qui avait une forte probabilité d'être malade contribue à confirmer le diagnostic.

- un résultat négatif chez un patient qui avait une forte probabilité d'être malade risque d'être un faux négatif, et ne devrait pas conduire à réfuter le diagnostic, mais plutôt à refaire le test (ou une autre investigation) pour confirmer ce résultat. ■

tableau 1

Tableau de contingence en effectifs

	Malades	Non-malades	Total
Test positif	vrais positifs	faux positifs	positifs
Test négatif	faux négatifs	vrais négatifs	négatifs
Total	nombre de malades M	nombre de non-malades NM	effectif total N

Tableau de contingence en probabilités

	Malades	Non-malades	Total
Test positif	prob. (M et positifs)	prob. (NM et positifs)	prob. (positifs)
Test négatif	prob. (M et négatifs)	prob. (NM et négatifs)	prob. (négatifs)
Total	prévalence $P = M / N$	1 - prévalence	1

Sensibilité (Se) = prob. (M et positifs) / prévalence = vrais positifs / M

Spécificité (Sp) = prob. (NM et négatifs) / (1 - prévalence) = vrais négatifs / NM

Valeur prédictive positive (VPP) = prob. (M et pos.) / prob. (pos.) = vrais pos. / total pos.

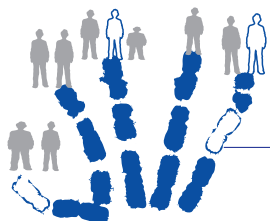
Valeur prédictive négative (VPN) = prob. (NM et nég.) / prob. (nég.) = vrais nég. / total nég.

Soit S le résultat du test et M la maladie, on a

Se = prob. (S/M) ; Sp = prob. (S⁻/M⁻) ; VPP = prob. (M/S) ; VPN = prob. (M⁻/S⁻)

Le théorème de Bayes permet alors d'écrire la VPP en fonction de la sensibilité, de la spécificité et de la prévalence de la maladie

$VPP = (P \times Se) / (P \times Se + ((1-P) (1 - Sp)))$



Le contrôle de qualité en biologie moléculaire

Mireille Claustres
Professeur des universités, praticien hospitalier, CHU, Montpellier

L'étude des altérations de l'ADN constitutionnel associées aux maladies génétiques est différente des autres tests de laboratoire pour plusieurs raisons. Les difficultés de réalisation technique et d'interprétation des tests génétiques les font classer dans les analyses biologiques dites de « haute complexité ». Leurs indications sont multiples : tests diagnostiques, tests prédictifs (soit présymptomatique, soit de prédisposition), identification des porteurs sains dans les maladies transmises sur le mode autosomique récessif (l'enfant atteint a hérité du gène muté de chacun de ses parents, comme c'est le cas par exemple pour la mucoviscidose) ou dans les maladies transmises sur le mode récessif lié à l'X (hémophilie, myopathie de Duchenne...), diagnostic prénatal voire diagnostic pré-implantatoire dans certaines familles à risque, et dépistage néonatal. Enfin, le résultat d'un test génétique peut avoir un impact à long terme sur la santé, les projets parentaux, les choix professionnels du couple ou des apparentés. Les implications légales, sociales, économiques et éthiques des tests génétiques justifient la reconnaissance de la spécialité « génétique moléculaire » parmi les actes de laboratoire.

La mise en place de l'assurance qualité est rendue difficile par le faible volume de la majorité des tests, par l'hétérogénéité et l'évolution constante des techniques disponibles et par l'absence d'automatisation des procédures dont la majorité des étapes reste largement manuelle. De nombreux tests moléculaires ont une haute sensibilité et spécificité, mais aucun n'a un pouvoir de détection de 100 %. Le plus souvent, un résultat négatif de recherche de mutation entraîne la révision (et non pas l'exclusion) du risque initial.

La réglementation française

Les laboratoires de biologie médicale, publics ou privés, sont censés se soumettre aux recommandations publiées dans le *Guide de bonne exécution des analyses (GBEA)*, paru en décembre 1994 (ministère des Affaires sociales, de la Santé et de la Ville, arrêté du 2 novembre 1994, JO du 4 décembre 1994) et réactualisé en 1999. Le système assurance qualité du GBEA a évolué ces dernières années afin de s'articuler avec la démarche d'accréditation des établissements de santé. Les laboratoires de biologie clinique sont soumis à un contrôle de qualité national obligatoire depuis 1979, dont la structure administrative réputée rigide et non évolutive [45] paraît inadaptée à la génétique moléculaire.

L'assurance de la qualité

La réalisation d'un test génétique est un processus

complexe fait de multiples étapes, depuis le recueil et le traitement de l'échantillon d'ADN (ou d'ARN, acide ribonucléique) d'un individu jusqu'à l'interprétation et la rédaction du résultat, base du conseil génétique. Les principales recommandations émises pour les aspects pré-analytiques et analytiques des tests génétiques concernent essentiellement l'amplification des acides nucléiques par une technique de clonage *in vitro* nommée « PCR » (polymerase chain reaction), qui permet de produire très rapidement et sélectivement de grandes quantités de la portion du génome que l'on désire étudier (un segment de gène, par exemple). Une description exhaustive des règles fondamentales d'assurance qualité a été publiée par la Fédération internationale de chimie analytique [37], qui a analysé de la façon la plus complète possible chacun des quatre points suivants.

Le contrôle de qualité européen sur la

La mucoviscidose

Maladie héréditaire, atteignant un nouveau-né sur 1800 à 3000. Elle touche principalement l'arbre respiratoire (infections chroniques, dilata-tions des bronches), l'appareil digestif (pancréas, intestin, voies biliaires) et l'appareil génital (infertilité masculine, hypofertilité féminine).

Diagnostic biologique

Test de la sueur, avec une augmentation de la concentration en ions chlorure et sodium.

Transmission

Mode autosomique récessif. Les deux exemplaires du gène, paternel et maternel, peuvent porter la même mutation ou des mutations différentes.

Gène CFTR

Le Gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31), s'étendant sur 230 kilobases, comprenant 27 exons, et siège de près de 1 000 mutations différentes. La plus fréquente est DF508, 30 autres ont une fréquence comprise entre 0,1 et 5 %.

ADN
acide désoxyribo-nucléique :
constituant
essentiel des
chromosomes

L'organisation et l'équipement du laboratoire

Ils doivent être conçus pour minimiser les risques de contamination. Le minimum requis est de séparer physiquement les phases de pré-amplification et les phases post-PCR (analyse des produits d'amplification), ainsi que les salles ADN et ARN. Quatre secteurs doivent être clairement identifiés : a) stockage des réactifs et préparation des solutions, b) préparation des échantillons et des matrices ADN ou ARN, c) mix PCR, et d) analyse des produits PCR. Chaque secteur doit posséder son propre jeu de pipettes, blouses, gants et petits matériels.

Les phases pré-analytiques

Elles doivent être clairement définies, optimisées et standardisées puisque de multiples événements mineurs sont susceptibles d'altérer la qualité finale du test au

niveau du traitement des spécimens, de la préparation des échantillons d'ADN ou d'ARN (identification, extraction, quantification, dilution, fractionnement, stabilisation, stockage...), et de l'amplification des acides nucléiques.

L'analyse des produits PCR

Elle doit être basée sur des méthodes soigneusement validées dans le laboratoire, car les nombreuses techniques plus ou moins complexes actuellement disponibles ne sont pas équivalentes en terme d'efficacité. L'analyse informatisée des produits d'amplification avec des logiciels adéquats permet un gain de sensibilité et de spécificité appréciable.

Les contrôles de qualité interne

Ils devraient idéalement s'appliquer à chacune des multiples étapes pré- et post-PCR ; pour de nombreuses

mucoviscidose : résultats, réseau européen

Jusqu'ici seule la mucoviscidose a pu bénéficier d'un contrôle de qualité externe à grande échelle, grâce à des financements spécifiques de l'Union européenne (réseau ECACF, European Concerted Action on Cystic fibrosis). Depuis 1995, un nombre croissant de laboratoires participants est enregistré chaque année (136 en 1996, 145 en 1997, 159 en 1998, 200 en 1999). Cette expérience unique intéresse les Américains et les Australiens, qui commencent à participer à ces tests. Les contrôles, qui ont lieu une fois par an et sont gratuits pour les laboratoires académiques, consistent à analyser en aveugle six échantillons d'ADN envoyés par l'organisateur (Els Dequeker à Louvain) pour la présence éventuelle de mutations dans le gène de la mucoviscidose en utilisant les stratégies et techniques habituelles de chaque participant. Après analyse, chaque laboratoire envoie ses résultats à l'organisateur en fournissant les informations suivantes : mutations testées, méthodes utilisées, génotypes obtenus pour chaque ADN du contrôle et données brutes sur lesquelles sont basées ses conclusions (par exemple photographies des électrophorèses). Un comité d'experts analyse ensuite la qualité du génotypage, de l'interprétation des tests ADN et de la rédaction des lettres de résultat. Un rapport général concernant

les résultats globaux ainsi qu'un rapport individuel sur la performance de chacun sont ensuite retournés aux participants.

Qualité du génotypage

Le survol de l'ensemble des résultats de l'analyse des mutations de la mucoviscidose au cours de ces dernières années montre que la qualité s'est considérablement améliorée, passant de 65 % de laboratoires n'ayant commis aucune erreur en 1996 à plus de 91 % en 1999 [11]. Bien que ces résultats soient très encourageants et illustrent l'intérêt de ce type de contrôle, le taux d'erreurs reste encore trop élevé compte tenu des conséquences des tests génétiques pour le statut de porteur sain ou le diagnostic prénatal. Les erreurs de génotypage ne sont pas forcément liées au volume d'analyses réalisées par les laboratoires ni aux techniques utilisées. Il est à noter que les laboratoires français figurent parmi ceux ayant obtenu les meilleurs scores depuis plusieurs années.

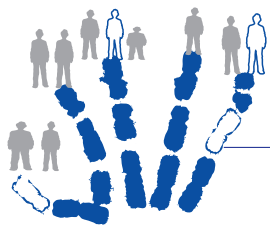
Qualité de l'interprétation et de la rédaction de la lettre de résultat

Depuis 1999, il a été demandé aux participants de fournir des lettres de résultat telles qu'ils les enverraient aux cliniciens prescripteurs pour chacun des six cas analysés (six langues étaient admises :

anglais, français, allemand, italien, espagnol ou hollandais). On observe que le contenu des lettres varie considérablement entre les laboratoires et que 31 % contiennent des erreurs de type administratif ou interprétatif (en particulier en ce qui concerne les calculs de risques résiduels).

Le laboratoire doit être capable de contrôler la qualité des informations cliniques et génétiques fournies par le prescripteur avant le test afin de pouvoir choisir le bon gène et les bonnes stratégies d'étude. Il faut rappeler en effet que l'interprétation du résultat dépend en grande partie du contexte clinique dans lequel la demande de génotypage a été faite. C'est au laboratoire à rédiger la lettre (destinée au médecin prescripteur) précisant de façon non ambiguë non seulement le résultat des analyses d'ADN, mais aussi leur complète interprétation (jusqu'aux calculs de risque), qui devrait être signée par deux biologistes confirmés.

Des recommandations extrêmement détaillées destinées à améliorer la qualité de l'analyse génétique de la mucoviscidose ont été récemment publiées et serviront de guide général pouvant s'appliquer à l'ensemble des pathologies [13]. ■



applications, cela ne deviendra possible que lorsque l'automatisation remplacera les manipulations. Divers contrôles sont cependant applicables quotidiennement aux principales phases de préparation des acides nucléiques (intégrité, degré de pureté, quantité), d'amplification par PCR (utilisation de témoins positifs et négatifs), et d'analyse des produits.

Le contrôle de qualité externe (CQE)

Il n'existe actuellement en France aucun contrôle de qualité externe des laboratoires de génétique moléculaire médicale. Nos collègues du Royaume-Uni et des Pays-Bas bénéficient depuis plusieurs années d'une remarquable organisation nationale de leurs laboratoires en réseaux. À leur initiative, la mise en place de projets pilotes destinés à évaluer les actes de génotypage a conduit à la création d'un réseau européen, *The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)*, qui propose chaque année des contrôles d'assurance qualité externe concernant les pathologies les plus fréquentes (contrats de l'Union européenne).

Des échantillons d'ADN préparés dans le contexte d'une demande familiale ou individuelle de test génétique sont envoyés à chacun des laboratoires participant spécialistes d'une pathologie donnée. Ces laboratoires disposent ensuite de quelques semaines pour réaliser l'analyse de l'ADN par les techniques dont ils ont l'habitude, pour interpréter et rédiger le résultat, qu'un groupe d'experts est ensuite chargé d'étudier. Un rapport final est envoyé aux laboratoires concernant le génotypage, qui est noté, et l'interprétation des résultats, qui est commentée.

En 2001, dernière année de financement européen, les contrôles couvriront 12 maladies génétiques : maladie de Huntington, ataxie de Friedreich, myopathies de Duchenne et de Becker, Charcot-Marie-Tooth, cancer du sein, mucoviscidose (en relation avec le réseau ECACF), microdélétions du chromosome Y (en partenariat avec l'Académie européenne d'andrologie), syndrome de l'X fragile, syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, rétinoblastome, dystrophie facio-scapulo-humérale et hyperplasie congénitale des surrénales.

L'objectif des EMQN-EQC est avant tout éducatif, visant à améliorer et maintenir la qualité des tests génétiques dans l'Union européenne en donnant une opportunité aux laboratoires d'évaluer leurs performances et de se rencontrer dans des groupes de travail dédiés à des pathologies précises. Des protocoles consensuels précisent les règles de bonne conduite pour l'étude moléculaire d'une vingtaine de maladies (depuis le choix des amorces pour les PCR jusqu'à l'interprétation des résultats), et sont accessibles sur le site www.emqn.org.

Le bilan de plusieurs années indique un taux d'erreurs significatif dans le génotypage et l'interprétation, toutes pathologies confondues, ce qui justifie la pour-

suite et l'extension de ces contrôles, ainsi que les recommandations suivantes émises par le réseau EMQN :

- reconnaissance de la génétique moléculaire et médicale,
- mise en place de réseaux nationaux (laboratoires de type 1 réalisant les tests simples et laboratoires de type 2 réalisant les tests compliqués et recherchant les mutations rares) et d'une coordination entre généticiens et cliniciens,
- personnel technique et d'encadrement de haut niveau scientifique afin d'assurer l'évolutivité des techniques en fonction des connaissances sur le génome humain,
- formation continue des généticiens moléculaires grâce à des séminaires spécifiques organisés par chacun des centres de référence dispersés sur le territoire,
- validation des techniques au sein de chaque laboratoire et participation régulière aux contrôles de qualité externe,
- renforcement de l'enseignement de la génétique et de l'éducation du public,
- financements adaptés à la réalisation de tests génétiques de qualité.

Les leçons du contrôle de qualité européen

En conclusion, les données obtenues grâce à l'expérience des contrôles de qualité européens montrent bien que la recherche de mutations dans un gène ou le diagnostic indirect ne se résumant pas à de la technique PCR : la qualité finale des tests génétiques (et donc du conseil génétique) nécessite une connaissance approfondie des caractéristiques génétiques propres à chaque pathologie et à chaque gène (nature des mutations, spécificité et sensibilité des techniques de détection, ségrégation familiale des mutations, degré de pénétrance, mosaïcisme germinale ou somatique, calculs de risque, analyse indirecte de marqueurs liés aux locus morbides...). Les tests génétiques nécessitent des équipes spécialisées. Au-delà de l'expertise biologique des actes moléculaires, il est évident que la qualité globale des tests génétiques repose sur la mise en place d'une approche pluridisciplinaire (cliniciens, conseillers en génétique, chercheurs et divers spécialistes des filières de soins intégrées) et d'un suivi à long terme des familles concernées par les maladies génétiques. Des guides de bonne pratique résultant d'expertises collectives et concernant l'utilisation de certains tests ou leurs aspects techniques sont régulièrement publiés par l'Inserm, la Société française de génétique (Commission pratique de la génétique) et la Société française de biologie clinique (section Méthodes en biologie moléculaire). ■