

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, dilatations 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.

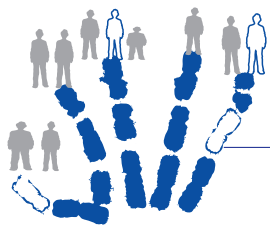
Qualité de l'interprétation et de la rédaction de la lettre de résultat

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). ■