

Génotypage des variants thrombogènes FV Leiden et FII G20210A :

S. LABROUCHE-COLOMER *, C. JAMES*

*Laboratoire d'Hématologie CHU Bordeaux place Amélie Raba Léon 33076 Bordeaux cedex
Sylvie.colomer@chu-bordeaux.fr

RÉSUMÉ

Les approches moléculaires de recherche des variants des gènes codant la prothrombine (*F2*) et la proaccélélerine (*F5*) ont considérablement évolué, depuis leur description et le rapport du *Groupe Français d'étude sur l'Hémostase et la Thrombose* émis en 2009, en raison de l'apparition de nombreuses trousse diagnostiques. L'objectif de cette revue est de réaliser l'état des lieux actuel des pratiques des laboratoires spécialisés dans cette analyse. Nous exposerons ainsi les performances analytiques des trousse commerciales disponibles et utilisées en 2019 par la plupart des laboratoires français autorisés.

MOTS-CLÉS:

FV Leiden, rs6025, polymorphisme G20210 du gène *F2*, rs1799963, FRET, TaqMan, PCR-Scorpion, LAMP

Introduction

La mutation Leiden du facteur V (FVL ; rs6025 ; [NM_000130.4:c.1601G](#), [NP_000121.2:p.Arg534](#)), due à la substitution d'une guanine en position 1601 par une adénine (ancienne nomenclature 1691G>A), conduit au remplacement en position 534 d'une arginine par une glutamine (ancienne nomenclature R506Q). La présence de cette mutation affecte l'un des sites de clivage du facteur V activé (FVa) par la protéine C activée et, par conséquent, baisse l'efficacité d'inactivation de son substrat, le FVa. Le FVL perd alors sa fonction anticoagulante de cofacteur du système de la protéine C activée et est responsable d'un état d'hypercoagulabilité. Cette anomalie est la plus fréquente parmi les mutations touchant les facteurs de la coagulation. Elle est à l'origine d'au moins 95% des résistances dépendantes de la protéine C activée. Les sujets porteurs du FVL ont un risque accru (3 à 5 fois) de survenue d'un premier accident thromboembolique chez les sujets hétérozygotes. La répartition géographique est hétérogène : à l'état hétérozygote la mutation est présente dans le nord de l'Europe et aux États-Unis avec une fréquence moyenne de 5% dans la population générale Caucasienne ; la fréquence diminue du nord au sud de l'Europe, avec des fréquences de ~2% chez les hispaniques, de ~1% chez les Noirs Américains et Africains et de ~0.5% chez les asiatiques. À l'état homozygote, la mutation concerne 0,02% des sujets Caucasiens (1).

Le polymorphisme du gène de la prothrombine ou *F2* (rs1799963 ; [NM_000506.4:c.*97G>A](#)) correspond au remplacement d'une guanine par une adénine en position 20210 dans la région 3'UTR (*3'untranslated region*) la plus extrême et où le pré-ARNm est clivé et polyadénylé. La substitution d'une guanine par une adénine confère, grâce à une meilleure reconnaissance du site de clivage, une activité de maturation des ARNm supérieure conduisant à une accumulation d'ARNm mature dans le cytoplasme et, par voie de conséquence, à une augmentation de la synthèse protéique. Le polymorphisme 20210G>A de la prothrombine s'accompagne d'un taux plus élevé de prothrombine circulante, ce qui explique le risque plus élevé de thrombose lié à ce variant. Ce polymorphisme est associé à un risque relatif d'un premier épisode thromboembolique de l'ordre de 2 à 3 chez les hétérozygotes. La prévalence de la mutation en Europe se situe entre 1 et 3% de la population avec un gradient augmentant vers le sud (à l'inverse de la mutation Leiden du facteur V). Elle est rare dans les populations d'Afrique et d'Asie (2).

Le caractère ponctuel de ces deux variants génétiques a permis d'appréhender leur recherche par des méthodes similaires. Depuis leur découverte, leurs détections ont considérablement évolué avec des approches dites « maison » très représentées dans les années 2007 et qui progressivement ont laissé la place à des troussees commerciales marquées CE-IVD. Devant cette évolution, il paraissait important de faire un état des lieux sur les pratiques actuelles. Cette revue a donc pour objectifs, après un bref rappel de la législation en vigueur, 1) d'exposer les différentes troussees commerciales aujourd'hui disponibles sur le marché français et utilisées par la majorité des laboratoires et 2) d'évaluer leurs performances analytiques en axant l'analyse sur leur sensibilité, leur spécificité et leur robustesse.

1. Rappels de la législation en vigueur

En tant qu'examen touchant les caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, la recherche des mutations thrombogènes des facteurs V et II obéit aux mêmes règles que tout autre examen génétique et est réglementée par le Code de la santé publique (titre III, partie législative articles L1131-1 à 3 et réglementaire articles R 1131-1 à 21).

Les conditions de prescription, précisées dans les articles R1131-4 et R 1131-5 supposent : 1) un entretien préalable avec le patient, lui expliquant les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, la nature de l'examen, le degré de fiabilité des analyses, la signification du résultat et les conséquences de ce résultat sur son suivi thérapeutique et son pronostic ; 2) l'expression écrite du consentement du sujet pour la réalisation du test. Selon l'article R1131-19, le patient est en droit de refuser d'en connaître le résultat.

La réalisation de l'analyse (R1131-6) est restreinte à des praticiens agréés, exerçant dans des établissements autorisés. Seul le praticien agréé est habilité à signer les comptes rendus d'analyse. L'agrément des praticiens (R1131-9) est nominatif et attribué pour une durée de cinq ans, renouvelable par arrêté du préfet de région après avis de l'Agence de la biomédecine.

Le compte-rendu d'analyse, commenté et signé par le praticien responsable agréé, doit être adressé exclusivement au praticien prescripteur qui remettra le résultat au patient, dans le cadre d'une consultation médicale individuelle (R1131-19); le secret médical doit être respecté vis-à-vis des tiers.

Les conditions de conservation des résultats, précisées dans R1131-20, imposent que : 1) le consentement écrit, le double de la prescription et le compte-rendu d'analyse doivent être conservés par le médecin prescripteur dans le dossier médical du patient pour une durée de 30 ans ; 2) les comptes rendus d'analyse et leur commentaire explicatif doivent être également conservés par le laboratoire de biologie médicale pour une durée de 30 ans.

2. Aspects méthodologiques

Depuis la rédaction des dernières recommandations de 2009 (1), les pratiques pour rechercher des mutations thrombogènes ont évolué, avec l'accès à de nombreuses solutions techniques. L'analyse des données des contrôles externes de la qualité européens (DGKL-RFB) réalisés de 2017 à 2019 montre une évolution des pratiques vers des techniques de PCR en temps réel aux dépens des techniques RFLP : ~18% des laboratoires utilisent des sondes FRET suivies par les techniques de séquençage ~13.3% ; ~12.4% utilisent des sondes TaqMan et ~10.4% des approches d'amplification allélique .

Dans cette évolution des pratiques, les industriels ont joué un rôle important par leur engagement dans la certification technique des méthodes proposées. Ces dernières années de nombreuses troussees marquées CE-IVD (*In Vitro Diagnostic*) sont apparues. Bien que plus coûteuses, elles supplantent progressivement les approches « maison » plus économiques. Une enquête menée sur le territoire français auprès des laboratoires hospitaliers (83%) et privés (17%) a mis en évidence que 46% (16/35) utilisent des approches « maison » contre 54% (19/35) des solutions commerciales. Parmi les seize laboratoires utilisant des approches « maison » et ayant précisé la méthode employée, huit utilisent des sondes TaqMan et un seul des sondes FRET. Grâce à cette enquête, il a été possible d'identifier les cinq troussees commerciales CE-IVD qui se répartissent actuellement le marché français : « *Factor V Leiden* » et « *Factor II (prothrombin) G20210A* » de Roche Diagnostics (~11%); « *LightMix Facteur II G20210A* » et « *LightMix Facteur V* » de TIB Molbiol

revendus par Roche (9%) ; « *LAMP Human prothrombin mutation* » et « *LAMP Human FV Leiden* » de LaCAR MDX (11%), « *Xpert® FII & FV* » de Cepheid (17%) et « *FV Leiden* » et « *PTH 20210G>A* » *RealFast™* assay de ViennaLab Diagnostics » (6%). À titre indicatif, un inventaire non exhaustif des autres troussees disponibles sur le marché avec leur date d'enregistrement à la *Food and Drug Administration* est présenté dans le Tableau I.

3. Performances analytiques des méthodes utilisées en 2019

Le but de ce chapitre est d'analyser la sensibilité et la spécificité des tests proposés ainsi que leur robustesse, à savoir s'ils sont sensibles ou non aux changements de variables pré-analytiques et analytiques. Une présentation synthétique des spécifications et des performances de chacun est exposée dans les Tableaux II et III. Le principe du test, même innovant, ne sera que brièvement introduit et sera documenté pour permettre aux lecteurs qui le souhaiteraient d'évaluer les points critiques à maîtriser.

3.1. FACTOR V LEIDEN KIT (FDA K033607); FACTOR II (prothrombin) G20210A KIT (FDA K033612; 2003); Roche Diagnostics

3.1.1. Principe

Brièvement, la recherche des deux mutations repose sur l'amplification d'un fragment de la zone d'intérêt (F5: 222 paires de bases ou pb ; F2: 167pb) par l'utilisation d'amorces spécifiques. La détection est fondée sur le principe du transfert d'énergie, connue sous le nom de FRET, « *Fluorescent Resonance Energy Transfert* » (5) et réalisée grâce à deux sondes d'hybridation adjacentes, « *HybProbes* » ou « *Sondes FRET* », l'une « *donor* » et l'autre « *acceptor* » d'énergie (3-4, 6). Au terme de la phase d'amplification, les sondes intactes peuvent être utilisées pour l'analyse des courbes de fusion pour la détection des variants.

Les sondes d'hybridation consistent en deux oligonucléotides différents qui s'hybrident à une séquence interne du fragment amplifié pendant la phase d'hybridation du cycle de PCR. Une des sondes est marquée en 5' par du LC-Red640-NHS (N-hydroxy-succimide ester) et est phosphorylée en 3' pour éviter son élongation ; l'autre est marquée en 3' avec de la fluorescéine. Après hybridation à la matrice d'ADN, les deux sondes se retrouvent à proximité, permettant un transfert d'énergie par résonance (FRET, « *Fluorescent Resonance Energy Transfert* ») entre les deux fluorophores. Pendant ce transfert d'énergie, le fluorophore donneur est excité par la source lumineuse du LC 2.0 et une partie de l'énergie d'excitation est transférée au LC-Red640-NHS, fluorophore accepteur. Selon ce principe, le génotypage repose sur une analyse de courbe de fusion au terme de l'amplification. Dans ces conditions, la sonde marquée Red640 s'hybride sur une partie de la séquence cible non mutée et fonctionne comme une sonde d'ancrage, « *anchor* » ; la sonde marquée par la fluorescence encadre le site de la mutation (« *mutation probe* »). Pendant l'analyse de la courbe de fusion, l'augmentation de la température induit une diminution de la fluorescence parce que la sonde la plus petite des deux (« *mutation probe* ») se dissocie en premier, conduisant à un éloignement des deux marqueurs. Si le polymorphisme recherché est présent, le mésappariement de la « *mutation probe* » avec la cible déstabilise l'hybride et une diminution de la fluorescence sera observée à basse température. Avec un génotype « sauvage », le mésappariement ne s'observe pas et l'ADN hétéroduplex aura une température de fusion plus élevée.

3.1.2. Spécificité analytique

Selon des données fournisseur, les variants C20209T, A20207C, C20218G, C20221T de F2 peuvent être identifiés comme génotype inconnu ou génotype sauvage. Dans ce contexte, la société Roche a diffusé, en 2009, une note d'information aux utilisateurs leur recommandant d'examiner les profils de courbes de fusion et leur cohérence avec le résultat affiché par la macro du logiciel d'analyse.

Concernant les variants A1692C, G1689A, A1696G de F5, le système ne permet pas leur différenciation et classe ces mutations comme étant faussement positives pour le facteur V Leiden. Le fournisseur précise que le test Factor V Leiden peut être effectué en complément d'un test fonctionnel de résistance à la protéine activée où seule la mutation FVL (Facteur V Leiden) est impliquée et pas les trois mutations rares énumérées ci-dessus.

Une attention particulière sera donc donnée à la visualisation des courbes de fusion. La validation des résultats ne pourra être faite qu'à la seule condition que les profils de Tm soient cohérents avec le CQI (Contrôle de Qualité Interne), de statut hétérozygote.

3.2. LightMix in-vitro diagnostics: Factor V (Leiden) or Factor II G20210A; TIB Molbiol

3.2.1. Principe

La détection des mutations repose sur l'amplification par PCR de la zone d'intérêt. Le fragment amplifié est analysé grâce à l'utilisation d'une sonde interne marquée par un fluorophore « SimpleProbe canal 519 » reconnaissant une région encadrant le site de mutation. Après hybridation à la séquence cible, la « SimpleProbe » émet une fluorescence supérieure à celle émise avant l'hybridation (5). L'analyse génotypique est fondée sur l'établissement de la courbe de fusion où la température est progressivement augmentée. La sonde hybridée se décroche à une température spécifique induisant une diminution de la fluorescence. Tout mésappariement situé au niveau de la sonde déstabilise l'hybridation et abaisse le Tm, « *melting temperature* ». Dans la trousse, la sonde reconnaît l'allèle sauvage et la présence de la mutation diminue donc la température de fusion Tm. L'identification du génotype est établie à partir de l'analyse des températures de fusion comparées au standard fourni dans le coffret. Le génotype établi par l'appareil doit être validé, comme le fabricant précise, par le manipulateur à cause de l'existence possible de profils de température intermédiaires (voir chapitre Spécificité analytique).

3.2.2. Spécificité analytique

Selon des données de TIB Molbiol, les profils de Tm peuvent être modifiés par l'existence de polymorphismes encadrant la mutation recherchée ; il recommande donc pour la validation du génotypage un écart maximum de Tm de $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ entre les contrôles et les échantillons ; toute variation supérieure indique l'existence d'autres variants interférents.

Les variants étudiés par le fournisseur, encadrant les polymorphismes d'intérêt, concernent le gène *F2*: C20209T (rs72550707, NM_000506.4:c.*96C>T) ; C20213A (rs112016113, NM_000506.4:c.*100C>A) et le gène *F5*: C1689T (rs770011773, NM_000130.4:c.1600C>T). Selon les données du fournisseur, ces variants génèrent dans le système des pics de Tm différents des profils « sauvage » et muté des mutations thrombogènes des gènes *F2* (G20210A), et *F5* (G1691A).

Une attention particulière sera donnée aux écarts de Tm entre les valeurs des CQI (contrôle qualité interne) et des échantillons, avec une valeur maximale d'acceptabilité ne devant pas dépasser $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$.

3.3. Lamp Human FV Leiden kit (rs6025), LC-FVL-LP ou Lamp Human Prothrombin mutation Kit (rs1799963), LC-FII-LP; LaCAR MDx

3.3.1. Principe

Ces tests permettent la détection qualitative des mutations de *F5/F2* par une technique isotherme d'amplification d'acide nucléique (*Loop-Mediated Isothermal Amplification* ou LAMP) qui ne nécessite pas de cycle thermique comme dans la PCR (7). La séquence cible est amplifiée, à une température constante d'environ 65°C , par l'utilisation conjointe de trois jeux d'amorces et d'une polymérase possédant une activité élevée de déplacement de brin en plus d'une activité de réplication. La technique LAMP ne comporte pas d'étape de purification ni de dénaturation de la séquence nucléique cible. Elle amplifie l'ADN avec une grande spécificité, efficacité et rapidité et permet de détecter jusqu'à six copies d'allèles.

Dans le système développé par la société LaCAR MDx, six amorces s'hybrident sur des régions distinctes entourant le polymorphisme :

- en 3', amorces **FIP**, comprenant une région *F2* complémentaire de la région *F2c* (en 3') plus la séquence de la région *F1c* (en 5') et **F3**

- en 5', amorces **BIP** comprenant une région B2 complémentaire de la région B2c (en 3') plus la séquence de la région B1c (en 5') et **B3**
- deux amorces en boucle *Loop primer*, **F** (séquence complémentaire de la boucle simple brin entre les régions F1 et F2) et **B** (séquence complémentaire de la boucle simple brin entre les régions B1 et B2).

L'amorce interne (FIP : F2-F1c), contenant les séquences du brin sens et antisens de la cible d'ADN, initie l'amplification LAMP ; il s'ensuit le déplacement du brin par l'amorce externe (F3) qui libère un simple brin d'ADN. Ce dernier sert alors de matrice pour la synthèse suivante, amorcée par le second jeu d'amorces interne (BIP : B2-B1c) et externe (B3) qui s'hybride à l'autre extrémité et produit une structure d'ADN en boucle. Dans les cycles suivants, une amorce interne (*Loop primer*) s'hybride à la boucle du produit et déclenche la synthèse d'ADN par déplacement, conduisant à un brin original deux fois plus long. Les produits finaux sont de l'ADN « tige-boucle » avec plusieurs répétitions inversées de la cible formant une structure dite en « chou-fleur » comportant de multiples boucles formées par hybridation entre des répétitions alternées de la cible sur le même brin. L'amplification LAMP, reconnaissant initialement la cible par six séquences différentes et, par la suite, par quatre séquences différentes, est considérée comme amplifiant la séquence cible avec une sélectivité élevée.

Chaque séquence cible amplifiée est détectée par une sonde spécifique de la mutation selon le principe d'extinction de la fluorescence. Après amplification, la température est descendue à 40°C, la sonde alors s'hybride sur le fragment amplifié, la proximité du fluorophore et du désactivateur (*quencher*) conduit à une extinction de la fluorescence (5). Pendant l'analyse de la courbe de fusion, la température est graduellement augmentée à 90°C et la variation de l'émission de fluorescence est mesurée. Si on prend comme exemple le système pour la détection de la mutation G20210 de *F2* (sonde reconnaissant l'allèle muté), le fragment d'ADN « sauvage » (non muté) ne pouvant s'hybrider parfaitement avec la sonde spécifique de la mutation, conduit à une libération de la sonde à plus basse température pour le variant sauvage que pour le fragment porteur de la mutation. Le changement de fluorescence sera ainsi observé à une température plus faible pour l'allèle sauvage que pour l'allèle muté permettant de faire la différence entre les homozygotes mutés, les hétérozygotes et les fragments homozygotes non mutés dits, « sauvages ».

Pour la recherche de la mutation de la prothrombine G20210 (*LAMP Human Prothrombin mutation KIT*), la sonde a été dessinée pour s'hybrider sur le fragment d'ADN muté, et pour celle de la mutation Leiden du *F5* (*LAMP Human FV Leiden KIT*), sur le fragment d'ADN « sauvage » non muté.

En 2017, la société LaCAR a développé une nouvelle trousse proposant l'analyse simultanée des deux mutations (non utilisée à ce jour en France à notre connaissance). Dans cette trousse et comme dans les systèmes isolés, la sonde pour la recherche de la mutation G20210 du *F2* a été dessinée pour s'hybrider sur le fragment d'ADN muté alors que la sonde pour la recherche de la mutation du facteur V Leiden a été dessinée pour s'hybrider sur le fragment d'ADN « sauvage » non muté.

3.3.2. *Sensibilité analytique*

Le système LaCAR intègre dans sa trousse la préparation de l'échantillon mais permet également l'utilisation de matrice d'ADN.

Utilisation de sang total

La préparation de l'échantillon pour le génotypage, selon les recommandations du fournisseur, peut être réalisée à partir de 1-5µL de sang total anticoagulé par l'EDTA en fonction du volume de tampon de lyse utilisé et pour une analyse ultérieure sur LC480 ou GFX96 ; un maximum de 50 µL peut être envisagé uniquement pour une analyse sur LC-GENIE III. L'augmentation du volume de sang conduit à une réduction de la fluorescence émise pouvant générer des erreurs de génotypage (LC480 et GFX96).

Des concentrations en globules blancs comprises entre $0,22 \times 10^3$ cellules/mm³ et $49,49 \times 10^3$ cellules/mm³ ont conduit à des génotypages corrects.

Utilisation de matrices d'ADN

Les spécifications données par le fournisseur sont pour les concentrations en ADN de 5 à 20 ng/µL pour la réalisation des génotypages sur CFX96 et LC480 (LC Genie III acceptant jusqu'à 40 ng/µL).

La dépendance de la sensibilité du test au type d'appareillage utilisé doit conduire le manipulateur à une grande vigilance.

3.3.3. Spécificité analytique

Selon des données de LaCAR, des matrices hétérozygotes portant les variants A20207C, C20209T et A20218G du gène *F2* ont été testées avec le test LC-FII-LP sur différentes plateformes. Aucun résultat faussement positif pour la mutation G20210A n'a été détecté. Cependant, certains variants montrent un pic supplémentaire en dehors des critères d'acceptation de T_m , entraînant l'invalidité du résultat de l'échantillon. A20218G est interprété comme homozygote « sauvage »; A20207C et C20209T conduisent à un résultat invalide avec l'apparition d'un pic en dehors des limites fixées pour la détection de la mutation G20210A.

De même, les variants A1692C, A1696G et G1689A du gène *F5* peuvent conduire à des résultats faussement positifs. Des hétérozygotes A1692C, A1696G et G1689A ont été testés avec le test LC-FVL-LP sur différentes plateformes.

Sur le LC-Genie III, aucun résultat faussement positif pour la mutation G1691A n'a été détecté. Cependant, les variants (A1692C, A1696G et G1689A) génèrent un pic en dehors des limites définies, le résultat étant interprété comme invalide. La mutation G1689A montre la température de fusion la plus proche du pic G1691A pouvant interférer avec un génotypage correct.

Sur les plateformes à 96 puits, la mutation G1689A (AA) génère un pic dans les limites définies du pic homogène de G1691A muté et pourrait donc être interprété à tort comme un homozygote ou hétérozygote pour la mutation FV Leiden. Un décalage de la température de fusion en dehors des zones d'interprétation du variant Leiden recherché est à noter pour les variants A1696G et A1692C. Ces profils sont, d'après les données du fournisseur, interprétés comme non valides par le système.

Une attention particulière sera donnée à la visualisation des courbes de fusion. La validation des résultats ne pourra être faite qu'à la seule condition que les pics de température de fusion soient dans les limites fixées par les critères d'acceptation.

3.4. Xpert® FII & FV test (FAD K08218; 2009); Cepheid

3.4.1. Principe

Le système GeneXpert est une plate-forme fermée, autonome, qui combine la préparation des échantillons, les étapes d'amplification par PCR et de détection en temps réel pour une analyse entièrement intégrée et automatisée des acides nucléiques. Le système met en jeu des cartouches à usage unique qui contiennent les réactifs nécessaires à la détection des allèles normaux ou variants des gènes *F5* et *F2* à partir de sang total recueilli dans un tube contenant du citrate de sodium ou de l'EDTA. L'amplification et la détection, réalisée en temps réel, repose sur la technique PCR-Scorpion (3-5, 8-9).

Les amorces Scorpion sont des molécules bi-fonctionnelles dans lesquelles une amorce est liée de manière covalente à la sonde. Les molécules contiennent également un fluorophore et un *quencher*. En l'absence de la cible, le *quencher* absorbe la fluorescence émise par le fluorophore. En présence de la cible et au cours de la réaction PCR-Scorpion, le fluorophore et le *quencher* se séparent, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence émise. Les résultats sont interprétés à partir de signaux de fluorescence par des algorithmes adaptés et sont présentés sous formes de courbe d'amplification et de valeur de cycle seuil (Ct, « *cycle threshold* »). Le logiciel analyse la fluorescence des courbes d'amplification et considère comme positives, toutes les valeurs de Ct au-dessous du cycle seuil (Ct33).

3.4.2. Robustesse

Il a été rapporté la possibilité de génotypages incorrects en présence de sang total congelé/décongelé ou présentant un taux de globules blancs élevés ($46,8 \times 10^3/\mu\text{L}$) (10). L'utilisation de tels échantillons de sang total nécessite une étape pré-analytique de dilution en solution saline pour éviter l'obturation de la seringue et la génération d'un code machine « erreur 2008 » conduisant à un arrêt prématurité du test. Une dilution au dixième du sang a été décrite dans la littérature comme pouvant générer des génotypages incorrects (2/329 soit 0,6%), un hétérozygote pour la mutation G20210 du *F2* et pour le

F5 Leiden, ont été diagnostiqués à tort comme étant homozygote par le GeneXpert (10). Cette erreur de génotypage semble pouvoir être évitée par une analyse de toutes les fenêtres de lecture de l'instrument, et pas seulement la section « Résultat du test », en inspectant soigneusement les valeurs de Ct et les courbes d'amplification. En effet, dans les deux discordances rapportées dans la publication, la donnée indiquée dans la section « Résultats du test » était discordante avec le profil des courbes d'amplification. Le problème rencontré semble lié à une différence de fluorescence détectée pendant la réaction de PCR en temps réel qui génère deux valeurs différentes de Ct, une légèrement plus basse et l'autre légèrement plus élevée que la valeur seuil du Ct fixé à 33,0. D'après les auteurs, une dilution au tiers est suffisante pour palier l'obturation éventuel de la seringue et ne conduit pas à un génotypage erroné. Ces résultats, avec une dilution intermédiaire au cinquième ont été confirmés par G. Gessoni *et al.* (11).

Pour éviter ces erreurs de génotypage, une attention particulière doit être portée à l'analyse des données brutes fournies par l'instrument (vérification de la valeur du Ct et visualisation des courbes d'amplification) avant de valider les données de la section « Résultats des tests ».

3.4.3. Spécificité analytique

La spécificité analytique du test Xpert® Factor II & Factor V a été évaluée sur des séquences synthétiques de gènes normaux pour les mutations thrombogènes des facteurs II et V contenant des SNPs (*silent Single Nucleotide Polymorphisms*) dans la région d'appariement de la sonde ou à l'extérieur de cette zone. La présence de SNP dans la région d'appariement de la sonde a conduit dans la majorité des cas à l'obtention d'un résultat invalide (données fournisseur ; FDA K082118). Concernant le variant C20209T, une étude réalisée par Alvarez *et al.* semble valider ces données (12).

Il sera de la responsabilité de chaque laboratoire de valider l'absence d'interférence des variants encadrant la zone d'intérêt.

3.5. FV Leiden RealFast™ assay and PTH 20210G>A RealFast™ assay; ViennaLab Diagnostics

3.5.1. Principe

Il repose sur le système TaqMan®, fondé sur l'activité 5'-exonucléase de l'ADN polymérase qui hydrolyse la sonde hybridée à sa cible lors de l'étape d'extension. La discrimination d'allèle est réalisée grâce à l'utilisation de deux sondes d'hydrolyse reconnaissant spécifiquement l'allèle « sauvage » ou l'allèle « muté » et marquées chacune par un fluorophore « reporter » différent (2-4).

3.5.2. Spécificité analytique

Selon des données de ViennaLab, l'occurrence très rare des SNP voisins est considérée comme négligeable, à l'exception du rs72550707 (FIL: C20209T) plus fréquent et pour lequel une perte du signal serait observable si présent à l'état homozygote.

La société ViennaLab commercialise actuellement une nouvelle trousse permettant l'analyse simultanée des deux mutations. Le principe repose sur une approche TaqMan® multiplexe adaptable sur les appareils de PCR en temps réel AB 7500 Fast (Applied Biosystems®), CFX96™ (Bio-Rad), LC® 480 (Roche), MIC qPCR Cyler (Bio Molecular Systems) et Rotor-Gene® 6000 (Qiagen). Une alternative à l'extraction de l'ADN génomique est également disponible avec l'utilisation d'un tampon, « D2PCR™ Buffer ». Selon les données de la société commerciale, cette alternative est réservée au sang total (anticoagulé par de l'EDTA mais pas par de l'héparine) frais ou congelé sous certaines conditions. Aucune interférence avec des substances dérivées de l'échantillon de sang n'a été rapportée en utilisant ce tampon dans le respect des recommandations du fournisseur.

Actuellement, la majorité des trousse commerciales utilisées en France par les praticiens semblent reposer, à une exception près, sur l'analyse de courbes de fusion. Depuis 2018, Roche Diagnostics propose une nouvelle trousse reposant sur l'utilisation de sondes d'hydrolyse (TaqMan®). Dans le cadre de l'évaluation des performances techniques de leur produit, la société Roche a réalisé

une approche approfondie de la spécificité analytique qui nous a paru pertinente d'introduire dans cette revue.

3.6. Cobas® Factor II and Factor V Test, (FDA K172913); Roche Diagnostics (13)

3.6.1. Principe

Cette trousse propose de détecter simultanément les deux cibles par une approche TaqMan® avec des sondes d'hydrolyse « allèle spécifique », marquées avec des fluorophores distincts (3-5). Le test Cobas® Factor II and Factor V recourt à l'analyse par PCR en temps réel d'échantillons d'ADN génomique extraits à partir de sang total anticoagulé par de l'EDTA. Le test est effectué sur le Cobas z 480 analyzer.

La trousse recourt à la technologie de PCR en temps réel afin de déterminer le génotype du gène du facteur II en position 20210 et le génotype du gène du facteur V en position 1691. La réaction met en jeu quatre sondes oligonucléotidiques, deux pour le gène *F2* (mutation G20210A et séquence de type sauvage), et deux pour le gène *F5* (mutation G1691A et séquence de type sauvage). Chaque sonde oligonucléotidique est marquée par un fluorophore servant de rapporteur et par une molécule « *quencher* » qui absorbe les émissions du fluorophore rapporteur quand la sonde est intacte. Au cours de chaque cycle d'amplification, les sondes se lient aux régions complémentaires de l'ADN des amplicons, puis sont clivées par l'activité nucléase 5'→3' de l'ADN polymérase Z05. Les sondes de type sauvage ou mutant sont uniquement clivées lorsqu'elles sont liées aux séquences respectives de type sauvage ou mutant des gènes *F2* et *F5*. Le clivage des sondes permet au fluorophore rapporteur de se séparer du « *quencher* » de manière à ce que la fluorescence du fluorophore rapporteur puisse être mesurée lorsque la réaction est irradiée avec une lumière de longueur d'ondes appropriée. Les sondes de type sauvage et variant du *F2* et du facteur V sont marquées au moyen de différents fluorophores rapporteurs. Lorsqu'une fluorescence est détectée pour l'un des fluorophores rapporteurs au cours de la PCR, cela signifie que l'allèle du *F2* ou du facteur V correspondant à ce fluorophore est présent dans la réaction. Les génotypes du *F2* et du facteur V sont déterminés en fonction de l'allèle détecté pour chaque gène. Si les allèles de type mutant et sauvage sont tous deux détectés pour un gène, le génotype est hétérozygote. Si seuls les allèles de type sauvage ou mutant sont détectés, le génotype est respectivement de type sauvage ou homozygote muté. En l'absence de détection de l'allèle de type sauvage et de l'allèle de type mutant pour le *F2* et le facteur V, le résultat pour les deux gènes est invalide.

3.6.2. Spécificité analytique

Afin de déterminer l'influence des polymorphismes connus situés à proximité des mutations d'intérêt et présents dans les régions reconnues par les sondes du test « Cobas® Factor II and Factor V », des ADN plasmidiques contenant huit SNP connus (*F2* : A20207C, C20209T, A20218G, C20221T ; *F5* : G1689A, C1690T, A1692C et A1696G) ont été évalués. Les plasmides contenant les SNP du *F2* et ceux du *F5* étaient respectivement de type sauvage, pour les positions 20210 et 1691. Chaque ADN plasmidique contenant le SNP a été testé séparément et avec de l'ADN plasmidique du *F2* de type sauvage, de l'ADN plasmidique du *F5* de type sauvage et avec de l'ADN génomique de type « sauvage », issu de sang total. Aucun des plasmides contenant les SNP n'a conduit à de résultat « faux positif » pour la mutation du *F2* 20210 (prothrombine) ou pour la mutation Leiden 1691 du *F5*. Les génotypes « sauvage » du *F2* (20210) et du *F5* (1691) ont été détectés avec les quatre plasmides porteurs des SNP du *F2* et avec trois des quatre plasmides porteurs des SNP du *F5*. Le plasmide porteur du SNP G1689A du *F5* n'a pas permis, par le test Cobas® Factor II and Factor V, la détection du génotype « sauvage » de la mutation 1691. Le fournisseur précise que si ce SNP s'avérait être présent sur les deux allèles, le résultat du test serait invalide.

4. Conclusion

De cette analyse, il en ressort un point essentiel : quelle que soit la solution commerciale utilisée, une attention particulière devra être accordée à la visualisation des données brutes d'analyse (profil des courbes de fusion, valeur de Ct...) avant de conclure au génotype. Toute discordance ou ambiguïté

devra être levée par l'utilisation d'une autre méthode de détection, voire par le séquençage bidirectionnel de la région d'intérêt du gène qui constitue le « *Gold standard* » (14).

Actuellement, l'évolution des trousse commerciales semble prendre deux directions, avec le développement, soit de solutions duplexes intégrant la recherche simultanée des deux mutations thrombogènes, voire multiplexes avec l'introduction d'autres marqueurs de risque, soit de solutions totalement intégrées et automatisées, comme celle proposée par Cepheid.

Devant cette évolution technologique, le biologiste devra tenir compte, dans son choix de méthode, des points critiques évoqués dans cette analyse et notamment l'interférence possible de variants encadrant la zone d'intérêt afin de garantir le résultat de génotypage rendu. Dans cette démarche qualité, le biologiste sera tenu de s'inscrire à un contrôle externe de la qualité (EEQ, Évaluation Externe de la Qualité). Actuellement, trois EEQ sont disponibles en France : DGKL-RFB (proposé par l'ECAT), INSTAND et UK-NEQAS.

Enfin, devant l'importance d'établir un diagnostic fiable à 100% et selon un accord professionnel repris dans le rapport de la Haute Autorité de santé (HAS) émis en 2011, il est souhaitable, pour vérifier l'absence d'erreur de prélèvement et de manipulation, de réaliser soit deux déterminations indépendantes par la même méthode, soit deux déterminations par des méthodes différentes [**HAS 2011 : « *Même si à ce jour aucune obligation légale, et tout au moins lorsque le résultat d'une recherche est positive le contrôle sur un deuxième prélèvement paraît devoir être conseillé (accord professionnel) »***].

Conflit d'intérêt : aucun

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- (1) Alhenc-Gelas M, Aillaud MF, Delahousse B, Freyburger G, Le Querrec A, Reber G. La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique. *Sang Thromb Vaiss* 2009 ; **21S**: 12-39.
- (2) Freyburger G, Labrousche S. Facteur V Leiden (VL) et résistance à la protéine C activée (PCA), facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques. *Spectra Biologie* 2007; **162**: 60-74.
- (3) Mamotte CD. Genotyping of single nucleotide substitutions. *Clin Biochem Rev* 2006; **27**(1): 63-75.
- (4) Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015; **439**(1): 231-50.
- (5) Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001; **31**(5): 1106-21.
- (6) Nauck M, März W, Wieland H. Evaluation of the Roche diagnostics LightCycler-Factor V Leiden mutation detection kit and the LightCycler-prothrombin mutation detection Kit. *Clin Biochem* 2000 ; **33**(3):213-6.
- (7) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**(12): E63.
- (8) Solinas A, Brown LJ, McKeen C, Mellor JM, Nicol J, Thelwell N, Brown T. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**(20): E96.
- (9) Gessoni G, Valverde S, Canistro R, Marangon F, Manoni F. Field evaluation of the GeneXpert system for detection of thrombophilia associated mutations: a six-month experience in a small laboratory. *Biochim Clin* 2012; **36**(1): 20-4.
- (10) Marturano A, Bury L, Gresele P. Possible incorrect genotyping of heterozygous factor V Leiden and Prothrombin 20210 gene mutations by the GeneXpert assay. *Clin Chim Acta* 2014; **435**(8): 36-9.
- (11) Gessoni G, Sara SV, Canistro R, Manoni F. GeneXpert in the diagnosis of risk factors for thrombophilia: evaluation of its use in a small laboratory. *Blood Transfus* 2012; **10**(2): 228-9.
- (12) Alvarez SI, Ollero EB, Llinares Sanjuan FM, Martínez FL, Calvo Martín MT. A deep vein thrombosis caused by 20209C>T mutation in homozygosis of the prothrombin gene in a Caucasian patient. *Biochem Med (Zagreb)* 2014; **24**(1): 159-66.

- (13) Longshore JW, DeMartin K, Yu K, Das P, Zhang G, Rehage TT, *et al.* Multiplex testing for Factor II and Factor V mutations in thrombophilia: technical verification and clinical validation of the Cobas[®] Factor II and Factor V test. *J Thromb Thrombolysis* 2019; **47**(1): 87-95.
- (14) Segal JB, Brotman DJ, Emadi A, Necochea AJ, Samal L, Wilson LM, *et al.* Outcomes of genetic testing in adults with a history of venous thromboembolism. *Evid Rep Technol Assess* 2009; **180**: 1-162.
- (15) Dedome E, Bugier S, Fontan E, Ceppa F, Delacour H. Pre-analytical recommendations for Xpert[®] Factor II & Factor V (Cepheid): are the supplier's instructions too restrictive?. *Ann Biol Clin (Paris)* 2015; **73**(4): 509-10.