

Geneviève FREYBURGER, Sylvie LABROUCHE*

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

RÉSUMÉ

La découverte des mutations V et II Leiden a été l'occasion pour beaucoup de biologistes d'entrer dans le monde de la biologie moléculaire à partir de 1994. Diagnostic moléculaire le plus fréquemment recherché avec la fibrose kystique et le X fragile, la recherche des mutations Leiden a connu une évolution rapide des techniques fonctionnelles de screening et des techniques moléculaires de mise en évidence. Les mécanismes expliquant le lien entre la présence d'une mutation ponctuelle V ou II Leiden et le risque clinique de développer un événement thromboembolique ont été explicités. Cette revue expose les aspects physiopathologiques de ces deux mutations, elle aborde les questions liées à l'indication des tests et aux stratégies diagnostiques associant des méthodes fonctionnelles et moléculaires.

MOTS-CLÉS

Mutation ponctuelle, facteur V Leiden, prothrombine, résistance à la protéine C activée, biologie moléculaire

I - Introduction

L'association dans une même revue de la mutation Leiden du facteur V et de la mutation Leiden du facteur II ne répond pas à une logique physiopathologique. En effet, la première appartient aux polymorphismes de la voie anticoagulante de la protéine C, alors que la seconde appartient à la famille des polymorphismes touchant les protéines procoagulantes.

Cependant, deux éléments font que la recherche de ces deux polymorphismes est le plus souvent associée :

- Ce sont les deux anomalies les plus souvent retrouvées chez les patients atteints de maladies thrombo-emboliques. Leur implication dans la survenue des événements thrombo-emboliques (ETE) est démontrée. Il apparaît donc légitime de les rechercher conjointement.
- Leur caractéristique de mutation ponctuelle en fait un objet d'étude qui peut être appréhendé par des méthodes similaires. L'évolution des techniques de biologie moléculaire a permis de faire

évoluer très rapidement les méthodes de détermination.

Cette revue présente les mécanismes physiopathologiques reliant les deux mutations ponctuelles au risque de thrombose, puis en expose les méthodes d'exploration fonctionnelles et moléculaires.

II - Les anomalies et leurs conséquences

1. Facteur V Leiden et Résistance à la Protéine C activée

La mutation Leyden (en français) ou Leiden (en anglais, cette orthographe est maintenant adoptée par la majorité des francophones) touche l'acide aminé 506 du cofacteur V de la coagulation. Le cofacteur V (FV) est anticoagulant en tant que cofacteur de l'action de la PCA lors de la dégradation du facteur VIIIa, et le cofacteur Va est procoagulant

*Laboratoire d'Hématologie – CHU Bordeaux – Hôpital Pellegrin – 33076 BORDEAUX cedex – France – E-Mail : genevieve.freyburger@chu-bordeaux.fr

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

en tant que cofacteur de l'action du facteur Xa sur la prothrombine. Cette ambivalence fonctionnelle a d'ailleurs conduit GA Nicolaes et B. Dahlbäck à qualifier le cofacteur V de protéine Janus (1). On doit à B. Dahlbäck les descriptions de la résistance à la PCA liée à la mutation du facteur V, en 1993, et du rôle du FV intact comme cofacteur du système Protéine S - Protéine C activée (PS-PCA) dans l'inactivation du facteur VIIIa en 1994.

1.1 - L'activation du FV en FVa

Le FV ne devient un cofacteur efficace du facteur Xa qu'après avoir subi plusieurs coupures de la zone de connexion (B) entre la chaîne lourde (domaines A1 et A2) et la chaîne légère (A3-C2-C3). Ces coupures sont réalisées par la thrombine ou le facteur Xa, et elles entraînent un réarrangement des domaines : la zone de connexion B est dissociée du cofacteur, et la chaîne lourde s'assemble à la chaîne légère par des liaisons non covalentes (figure 1).

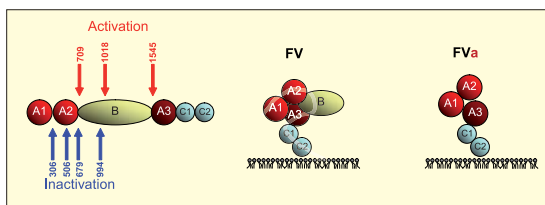


Figure 1
Le facteur V, structure avant et après activation.

1.2 - L'inactivation du FVa

Elle résulte du clivage par la PCA des arginines 306, 506, 679 et 994. L'arginine 506 est la première à être clivée, et la cible préférentielle en cas de concentrations faibles de FVa et de PCA. Cependant, l'inactivation qui en résulte est partielle. Pour être complète, elle nécessite encore la coupure de l'arginine 306 qui est très dépendante de l'activité cofacteur de la protéine S.

1.3 - L'équilibre entre FV pro-coagulant et anti-coagulant

L'activité anticoagulante du FV cofacteur de la PCA pour la dégradation du VIIIa est liée à la partie C terminale du domaine B. Elle nécessite la coupure de l'arginine 506 par la PCA.

Les états du FV ne se limitent donc pas aux formes basales, activée et inactivée, mais comprennent aussi d'autres états intermédiaires de la molécule. La course de vitesse entre l'action de la PCA et des sérines protéases activatrices (IIa et Xa) peut suivre une autre séquence que le schéma activation/inactivation, et induire l'apparition de molécules partiellement inactivées (Arg506) qui acquièrent une fonction anticoagulante en tant que cofacteur de la PCA dans sa dégradation du VIIIa. Ce FV anticoagulant peut alors soit subir l'action de la PCA et devenir totalement inactivé par clivage de l'arginine 306, soit rejoindre un état partiellement procoagulant par clivage des arginines 709, 1018

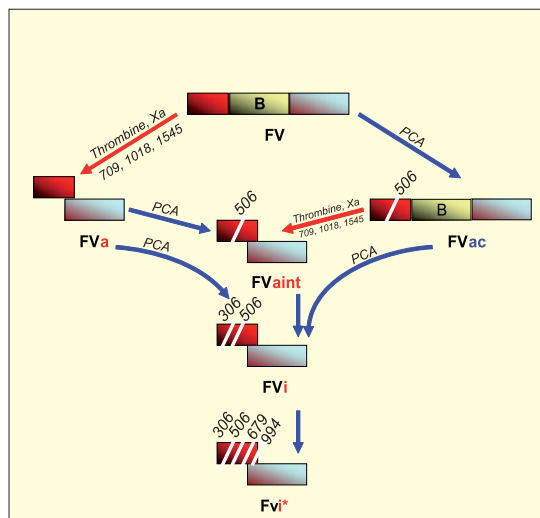


Figure 2
Les voies intriquées de l'activation (par la thrombine) et de l'inactivation (par la PCA) du facteur

et surtout 1545 (Facteur V activé intermédiaire, Vaint). De même, le FVa (activé par la thrombine ou le facteur Xa sur les arginines 709, 1018 et 1545), peut soit subir une dégradation partielle par la PCA au niveau de l'arginine 506 qui donnera un FV partiellement procoagulant comme précédemment, soit être totalement dégradé dès que la PCA s'attaque à l'arginine 306 (figure 2). C'est donc des concentrations relatives en IIa, Xa et PCA que résulte le devenir de chaque molécule de FV. L'importance du rôle anticoagulant du FVac clivé en 506 est démontrée par le phénotype pseudo-homozygote des patients présentant une double hétérozygotie avec la mutation Leiden sur un allèle et une mutation « null » sur l'autre allèle (absence d'ARN détectable) abolissant complètement l'activité du gène. La perte du FV normal fait perdre la fonction FVac et aboutit à une résistance fonctionnelle de type homozygote.

1.4 - La résistance à la protéine C activée

Le phénotype de « résistance à la PCA » a été décrit chez certains patients par l'équipe de Dahlbäck qui en a rapidement élucidé le mécanisme avec la substitution de l'arginine en position 506 par une glutamine (2) Chez les sujets porteurs, la mutation fait donc disparaître la première cible de la PCA au niveau du FV, ce qui va retarder la dégradation du cofacteur procoagulant, et empêcher la forme clivée anticoagulante FVac. Au niveau du gène, cela correspond à la substitution d'une guanine par une adénine en position 1691 qui définit la mutation Leiden.

Cette anomalie est la plus fréquente parmi les mutations touchant les facteurs de la coagulation, avec de fortes variations géographiques : de l'ordre de 5 % de la population dans le nord de l'Europe et aux Etats-Unis, sa fréquence diminue vers le sud de l'Europe, avec des fréquences de l'ordre de 2 % chez les hispaniques, 1 % chez les noirs américains et africains et 0,5 % chez les asiatiques. La fréquence des homozygotes a été évaluée à 0,02 % (3). La mutation présente une expression semi-dominante, puisque les hétérozygotes comme les homozygotes présentent un risque accru de présen-

ter des ETE. Cependant, le risque relatif est moins élevé chez les hétérozygotes (4 à 7) que chez les homozygotes (30 à 80).

La sensibilité clinique correspond à la proportion des individus porteurs de l'anomalie qui présentera durant son existence un ou plusieurs ETE. Elle se situe entre 20 et 50 % (4).

1.5 - Les autres mutations du FV entraînant une résistance à la PCA

Deux autres mutations du FV ont été décrites au même locus, la mutation Cambridge (R306T) (5) et la mutation Hong Kong (R306C) (6). Elles sont rares et leur association avec le risque semble faible, avec un phénotype intermédiaire entre le type sauvage et le phénotype R506G hétérozygote (7). L'allèle R2 est un autre variant qui est retrouvé fréquemment. Il correspond à la mutation du nucléotide 4070 A>G, ou de l'acide aminé H1299R. Il est présent chez 11 à 13 % des populations d'origine caucasienne et asiatique, deux fois moins présent dans les populations noires. Sa présence pourrait augmenter le risque thrombotique (8), surtout quand il est associé avec la mutation Leiden hétérozygote (9, 10). N'étant pas présent sur le même haplotype que la mutation Leiden, il n'est pas retrouvé chez les homozygotes Leiden. Il n'est pas étudié en routine dans le cadre des bilans de thrombose.

2. Mutation 20210 de la prothrombine

La prothrombine est la sérine protéase de la phase finale de la coagulation. Elle est transformée en thrombine par la prothrombinase, complexe formé des facteurs Xa, Va, de phospholipides et de calcium. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine et exerce un grand nombre d'autres fonctions régulatrices.

La concentration de prothrombine est, avec l'antithrombine, l'un des deux déterminants majeurs de la génération de thrombine (11). En effet des taux de prothrombine à 150 % avec un taux d'antithrombine à 50 % vont générer 7 fois plus de thrombine que des taux à 100 % des deux facteurs (12).

La mutation 20210 de la prothrombine, décrite en 1996 par Poort (13), s'accompagne de taux plus élevés de prothrombine circulante, ce qui explique le risque plus élevé de thrombose lié à cette mutation. Sa prévalence se situe entre 1 et 3 % de la population en Europe avec un gradient augmentant vers le sud (à l'inverse de ce que l'on observe pour la mutation Leiden). Elle est rare dans les populations d'Afrique et d'Asie. Elle augmente le risque de thrombose d'un facteur de 3 à 5. Sa sensibilité clinique se situe entre 5 et 19 % (4).

2.1 - Augmentation de la prothrombine et mutation 20210 G>A : bases moléculaires

La mutation se situe en aval de la séquence codante, dans la zone 3' non traduite. En effet, l'extrémité 3' des ARNm est caractérisée par la pré-

sence d'un site de clivage endonucléolytique et de polyadénylation post-transcriptionnelle, deux étapes nécessaires à la maturation nucléaire des ARN messagers avant leur libération dans le cytoplasme. La mutation 20210 est située dans la région 3'UTR (3'untranslated region) à la position la plus extrême où le pré-ARNm est clivé et polyadénylé. C'est la première mutation décrite dans cette zone qui s'accompagne d'une augmentation de fonction par rapport au gène sauvage. En effet l'activité fonctionnelle de l'allèle physiologique G au niveau du site de clivage est moins efficace pour la maturation de l'extrémité 3' que celle de l'allèle muté. La substitution d'une guanine par une adénine lui confère une activité supérieure avec une meilleure reconnaissance du site de clivage, et une accumulation supérieure d'ARNm mature dans le cytoplasme, aboutissant à une augmentation de la synthèse protéique (figure 3).

Deux mutations touchant les nucléotides 20209 et 20221 ont été décrites depuis (16,17). Rares mais touchant d'autres populations que la 20210, qui est presque exclusivement retrouvée chez les individus d'origine caucasienne, elles s'accompagnent également d'une augmentation de maturation de l'ARNm de la prothrombine et de la synthèse protéique. Un polymorphisme A19911G a également été décrit comme modulateur du risque de l'allèle 20210A (18). Il s'accompagne d'un taux de prothrombine augmenté chez les patients ne présentant pas de mutation au niveau du nucléotide 20210 ou hétérozygotes Leiden. Ce polymorphisme est associé avec un risque global de thrombose veineuse profonde (TVP) multiplié par 1,5, et par 2 chez les hétérozygotes Leiden (19,20).

3. Les interactions entre facteurs de risque

La fréquence des mutations Leiden du V et du II étant élevée dans les populations d'origine européenne (tableau 1)(21-28), elle induit dans un nombre non négligeable de cas la coségrégation des deux anomalies chez le même individu. Cette double hétérozygotie s'accompagne d'un risque supérieur à la simple sommation du risque de l'hétérozygotie limitée à un des deux gènes. Elle est retrouvée dans 4-5 % des cas de mutations V Leiden et 8-10 % des cas de mutations II Leiden (données personnelles).

Elle a aussi été trouvée en association avec le risque de thrombose veineuse cérébrale (29).

Les mutations des facteurs V et II peuvent être également combinées à d'autres facteurs environnementaux fréquents (hormonothérapie orale, grossesse), plus rarement à un déficit touchant d'autres anticoagulants (antithrombine, Protéines C et S), à des facteurs acquis comme le lupus anticoagulant, et très fréquemment au génotype 677C->T de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR). Cette mutation est en effet retrouvée dans 30-40 % de la population générale sous forme hétérozygote et dans à 10-15 % sous forme homozygote. L'implication de l'hyperhomocystéinémie dans les

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

Figure 3

Influence de la mutation 20210 sur la polyadénylation de l'ARNm de la prothrombine.

L'extrémité 3' des ARNm est caractérisée par la présence de nombreux résidus A qui sont ajoutés après la transcription grâce au signal de polyadénylation (AAUAAA). L'ARN pré-messager est coupé à une vingtaine de nucléotides en aval du signal de polyadénylation, puis, par un mécanisme de synthèse complexe faisant intervenir une douzaine de protéines, une queue poly(A) de l'ordre de 200 nucléotides est ajoutée. Au niveau de la région 3'UTR, la première coupure survient en général au niveau d'un nucléotide A. Dans le cas de la prothrombine, le type sauvage présente un G au site de coupure qui va être coupé, mais de façon moins efficace. La mutation rétablit à ce site un nucléotide A (14). Le CPSF (Cleavage Stimulatory Polyadenylation Factor) est le « facteur de stimulation du site de clivage-polyadénylation », et le CStF (Cleavage Stimulatory Factor) est le « facteur de stimulation du clivage » (15). Après la coupure, une poly(A) polymérase (PAP) et sa protéine porteuse (PABPII) assurent la polyadénylation. CFI, II : Cleavage Factors. Schéma inspiré de Proudfoot NJ, EMBO reports, 2001, 2,891-893.

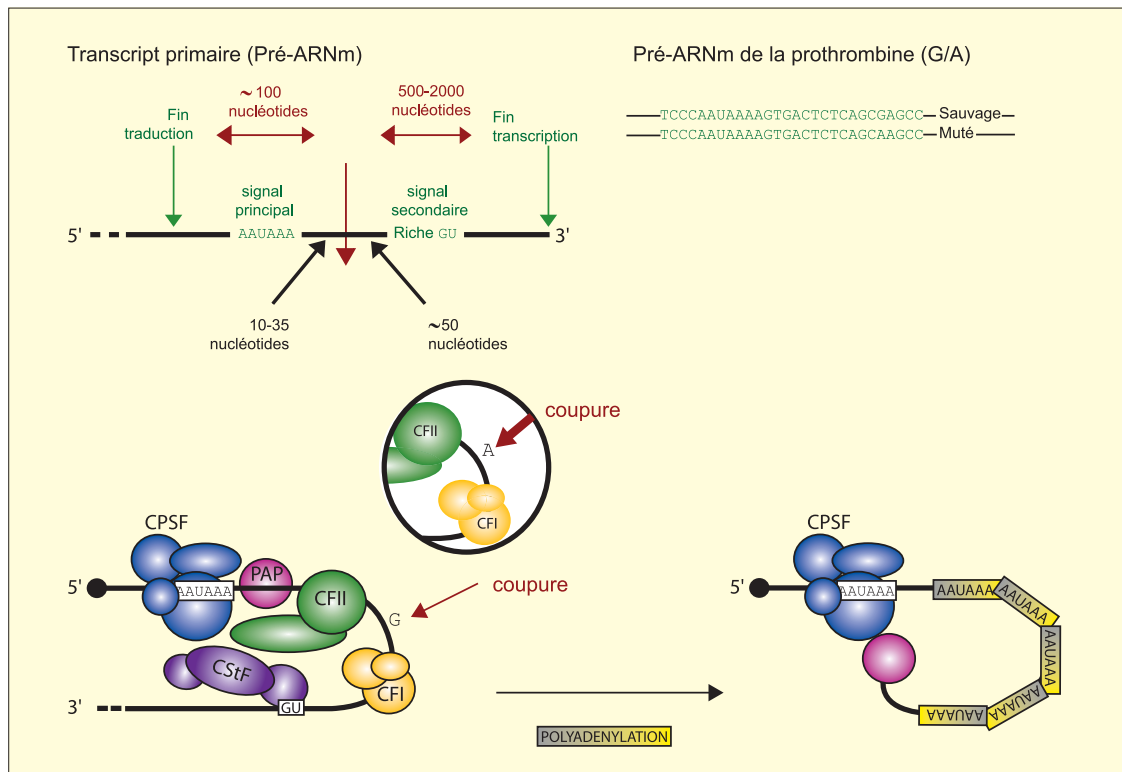


Tableau I
Fréquence et risque associé aux mutations Leiden V et II.

Fréquence V Hétérozygote	0,7-4 % (21) 4-7 % Europe du nord, plus faible dans le sud. Pour les nord américains d'origine caucasienne 5,27 %, d'origine hispanique 2 %, d'origine africaine 1,25 %, d'origine asiatique 0,45 %. (22, 23)
Fréquence II Hétérozygote	1-2 % dans la population européenne, avec une plus forte fréquence dans le sud (3 %) et plus faible dans le nord (1,7 %). Très rare dans les populations d'origine africaine et asiatique. (24)
Fréquence V+II Hétérozygote	Dans la population générale, 0,1 à 0,3 % (1). En cas de thrombose récidivante, 13 % de patients avec V Leiden portent aussi la mutation du II (25).
Fréquence V Homozygote	0,02 % (3)
Fréquence II Homozygote	0.014 %-0.0025 % (fréquences attendues) (13)
Risque V Hétérozygote	3-7x (2, 26)
Risque II Hétérozygote	2-3x (13, 27)
Risque V+II Hétérozygote	2,6x plus élevé chez les doubles hétérozygotes V+II par rapport aux hétérozygotes V isolés (28).
Risque V Homozygote	80x (3, 22)
Risque II Homozygote	?

thromboses veineuses reste un sujet controversé, et la mutation homozygote de la MTHFR ne rend compte que du tiers des cas d'hyperhomocystémié. C'est pourquoi la plupart des organisations qui font autorité Outre-atlantique, comme notamment le Collège américain de génétique médicale (American College of Medical Genetics (ACMG), www.acmg.net), préconisent le dosage de l'homocystéine à jeun plutôt que la détermination moléculaire (30).

Il est intéressant de noter que sur une étude d'association entre 7 polymorphismes touchant des gènes impliqués dans la coagulation et la maladie coronaire (66 155 patients), seules les mutations Leiden V et II présentent une relation significative, avec des risques relatifs pour les porteurs de l'allèle respectivement de 1,17 [IC 95 % ; 1,08-1,28] et 1,31 [IC 95 % ; 1,12-1,52] (21).

Fréquentes, clairement associées au risque de thrombose, liées à des mécanismes bien compris d'hypercoagulation par augmentation du potentiel procoagulant (pour le II) ou par freination d'un mécanisme anticoagulant (pour le V) les deux mutations Leiden sont devenues des prescriptions majeures au laboratoire d'hémostase moléculaire. Les techniques fonctionnelles (pour le V) et moléculaires ont connu un développement rapide et foisonnant qu'il est intéressant de connaître pour établir une stratégie diagnostique adaptée à la situation de chaque laboratoire.

III - Les méthodes d'exploration

1. Populations concernées par la recherche des mutations V ou II

Les recommandations internationales (AMG, Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2006 Edition (31)) posent l'indication de la recherche des anomalies du V et du II, ainsi que les autres anomalies du bilan de thrombose (anti-thrombine, Protéines C et S), dans les circonstances suivantes :

- thrombose veineuse avant 50 ans quelles que soient les circonstances ;
- thrombose veineuse à un site inhabituel (veines hépatiques, mésentériques, cérébrales...) ;
- thrombose veineuse récurrente ;
- thrombose veineuse avec histoire familiale de thrombose ;
- thrombose veineuse lors de la grossesse ou sous contraception orale ;
- infarctus du myocarde chez la femme fumeuse de moins de 50 ans.

Une deuxième série de circonstances peut justifier ces recherches :

- thrombose veineuse après 50 ans sans cancer actif ;
- apparentés des sujets ayant une mutation Leiden ;
- fausses couches à répétition, prééclampsie ou retard de croissance intra-utérin.

Ne sont pas recommandées les explorations :

- Systématiques de toute la population (bilan pré-contraception en particulier)
- Des patients ayant une histoire personnelle ou familiale de thrombose artérielle (à l'exception des femmes de moins de 50 ans fumeuses avec infarctus du myocarde, et des patients avec thrombose artérielle de moins de 50 ans sans facteur de risque identifié).
- Des autres mutations décrites pour le facteur V. Une circonstance particulière indique spécifiquement le dosage de la protéine C et S sans que l'implication des mutations Leiden II et V ait jamais été faite. Il s'agit de la nécrose cutanée à l'induction d'un traitement par anti-vitamine K (AVK) ou purpura fulminans du nouveau-né en dehors du sepsis

2. Stratégie diagnostique

En ce qui concerne la mutation du facteur V qui peut être dépistée par un test fonctionnel, l'ACMG considère qu'il est pertinent de réaliser dans un premier temps la recherche du phénotype de résistance à la PCA et de ne rechercher la mutation par biologie moléculaire que chez les patients résistants, de façon à distinguer avec certitude les sujets hétérozygotes et homozygotes mutés. Le choix entre l'option test fonctionnel puis diagnostic moléculaire chez les patients résistants à la PCA ou l'option diagnostic moléculaire d'emblée reste ouvert. Le coût supérieur de la biologie moléculaire selon les méthodes actuelles, mais sa plus grande praticabilité (conservation de l'échantillon à température ambiante versus conservation du plasma décanté congelé) constituent des paramètres essentiels à considérer pour arrêter une décision. Parmi les méthodes fonctionnelles, le test historique de recherche de la résistance à la PCA est jugé sensible mais trop peu spécifique, et les techniques de deuxième génération, plus spécifiques de la mutation du V et aussi sensibles, lui sont préférées.

La double détermination n'est pas requise pour la recherche des mutations II et V Leiden. Seule l'établissement d'une carte de groupe ABO et du phénotype rhésus, C, c, E, e et Kell impose une double détermination dans un même laboratoire (CNAMTS – Biolam, janvier 2006).

Il faut noter que les recommandations américaines réservent une place comparable aux taux d'homocystéine par rapport au dosage des 5 facteurs classiquement dosés en France dans le cadre du bilan de thrombose (AT, PC, PS, II et V).

3. Les méthodes fonctionnelles

Les raisons conduisant à l'utilisation d'un test fonctionnel ne sont pas équivalentes pour les mutations V et II Leiden.

Concernant la mutation du facteur V, l'intérêt du test est de trier les patients qui présentent une résistance fonctionnelle à la PCA, et de rechercher

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

dans un second temps la mutation causale chez les patients résistants seulement. Le test fonctionnel appartient alors à part entière à la stratégie diagnostique menant au génotypage.

Dans le cas de la mutation G20210A, le dosage du facteur II n'a pas la valeur prédictive du génotype individuel. Les différences de taux circulants, qui sont impliquées dans l'augmentation du risque de thrombose, ne présentent qu'une valeur épidémiologique. La Figure 4 présente les valeurs trouvées chez les patients non porteurs et porteurs de la mutation G20210A (données personnelles) : si l'on observe bien des taux en moyenne plus élevés chez les porteurs de la mutation, le dosage du facteur II se caractérise par une très mauvaise valeur prédictive de la mutation. Il paraît néanmoins intéressant à titre individuel de connaître le taux de facteur II circulant d'un patient muté, puisque pour un même génotype II hétérozygote, il est possible d'observer des taux très variables de facteur II ainsi qu'un risque potentiellement différent.

On peut aussi noter que le taux de prothrombine (avec TP >70 % pour éliminer l'influence des AVK sur le taux) est associé à celui du fibrinogène (R=0,524 chez les non mutés, n=727, p<0,0001) et de la protéine C (R=0,397, n=896, p<0,0001), que ce soit dans la population des patients porteurs de l'allèle 20210GG ou 20210GA (données personnelles). Il apparaît ainsi que, outre la régulation des taux circulants par le génotype dans la zone 3'UTR, des mécanismes supplémentaires entrent en jeu et peuvent être communs avec la régulation d'autres protéines circulantes de la coagulation.

3.1 - Les tests de recherche d'une résistance à la protéine C activée

Le test historique décrit par Dahlbäck (32) repose sur un temps de céphaline activée réalisé en présence ou non de PCA. Sensible à d'autres perturbations que la mutation du facteur V, il a ensuite évolué vers une version dans laquelle le plasma du patient à tester est dilué dans du plasma déficient en facteur V. Dans ces conditions, seule l'influence du temps de dégradation du facteur V du patient (dépendant de la présence ou non de la mutation Leiden) intervient sur le ratio, et la discrimination entre patients porteurs ou non de la mutation est excellente. La Figure 5, issue de données personnelles publiées en 1996 (33), montre la contribution de la prédilution en plasma déficient V sur la discrimination entre plasmas issus de patients mutés (en rouge) ou non mutés (en noir).

Selon les données de la littérature, les tests actuellement sur le marché ont une sensibilité à la mutation V Leiden le plus souvent excellente (100 %). En revanche la susceptibilité à d'autres facteurs de perturbation, et donc la spécificité, varie selon les tests.

Quand la spécificité est faible, la perturbation du test peut correspondre à une perturbation de la voie de la protéine C (taux de PC et de PS circulantes abaissés), à l'inflammation (taux de VIII et de fibrinogène augmentés), à des conditions cliniques

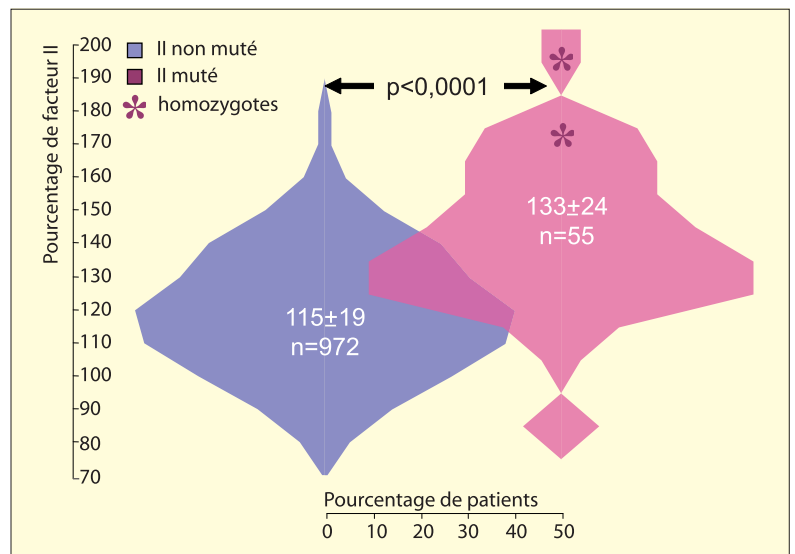


Figure 4

Répartition des taux de facteurs II chez des patients présentant le génotype 20210 sauvage (bleu) ou muté (mauve) (les patients sous AVK ont été exclus).

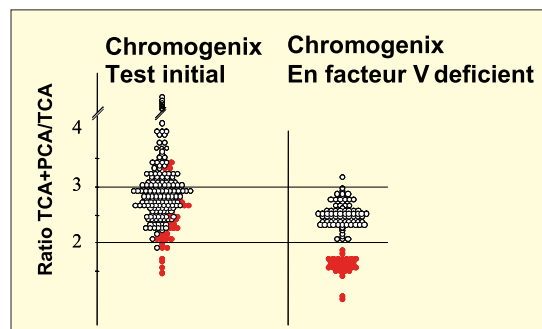


Figure 5

Apport de la prédilution du plasma à tester par du plasma déficient en facteur V sur le pouvoir discriminant du test historique COATEST APC Resistance de Chromogenix sur la mutation V Leiden.

(grossesse, pilule, âge, groupe ABO, insuffisance hépatique, divers déficits) ayant une incidence sur les facteurs circulants impliqués dans le schéma réactionnel. Un certain nombre de ces méthodes est sensible au taux circulant de facteur V qui allonge les temps de coagulation et peut masquer une résistance sur les méthodes en un seul temps de mesure.

Par ailleurs, les très rares doubles hétérozygotes, ayant le génotype null sur un haplotype et le génotype R506Q sur l'autre, peuvent présenter un phénotype de type homozygote Leiden V, du fait de la perte de la fonction anticoagulante du facteur V non muté.

A l'exception du test non spécifique (test historique de Chromogenix, COATEST APC Resistance, actuellement commercialisé par Instrumentation Laboratory et Haemochrom Diagnostica), la présence d'héparine non fractionnée (HNF) n'est pas un obstacle à la réalisation du test du fait de l'ajout d'un inhibiteur d'héparine aux réactifs. La plupart de ces tests présentent également une insensibilité aux AVK notamment ceux qui mettent en œuvre une dilution dans du plasma déficient en facteur V. Les modes d'activation distaux (activation des fac-

	Fournisseur	Test sensible à ...	Principe	Spécificité
Coatest APC Resistance	Chromogenix, Instrumentation laboratory (www.ilww.com)	Facteur V-L + VIII, V, PS + AVK et HNF	TCA silice colloïdale ± PCA colyophilisée avec la céphaline. 2 temps.	-
Test historique	Haemochrom Diagnostica (www.haemochrom.net)	+ toutes causes de TCA allongé		
APC resistance V	Instrumentation laboratory	Facteur V-L 100 % Facteur V R306T	Prédilution en plasma déficient V puis TCA silice colloïdale ± PCA colyophilisée avec la céphaline. 2 temps.	+
Hemoclot Factor V-L	HYPHEN BioMed www.hyphen-biomed.com	Facteur V-L + V Insensible à AC lupique, AVK, HNF	Prédilution en [Fg+II+VIIIc+PS] puis X ± PCA, puis IXa+PL+Ca++. 2 temps.	+
Hemoclot Quanti-V-L	HYPHEN BioMed	Facteur V-L	Prédilution en [Fg+II+VIIIc+PS+PCA] puis Xa+PL puis Ca++. 1 temps et gamme d'étalonnage.	+
Staclot APCR	Diagnostica Stago www.stago.fr	Facteur V-L + V (faux négatifs si diminué) Insensible à AC lupique, AVK, HNF, déficit en PS	Prédilution en plasma déficient V avec activation du X par le venin (4) puis déclenchement par Ca++ +PCA. 1 temps.	+
ProC global	Dade-Behring www.Dade-Behring.com	Facteur V-L 100 % + PC (90 %), PS (60-90 %) + AVK, Fg, V et VIII (peu spécifique des anomalies de la voie de la protéine C	± Activation de la PC endogène par venin de serpent (1) en présence de céphaline puis activation coagulation par Ca++. 2 temps.	-
ProC Ac R	Dade-Behring	Facteur V-L + Facteur V R306T et R306C + PC Insensible à AC lupique, AVK, HNF	± Activation de la PC endogène par venin de serpent (1), puis activation du X par RVV-X(2)+PL+Ca++. 2 temps.	+
Gradithromb PCP Test	Life diagnostics www.life-diagnostics.com	Facteur V-L (100 %) + PC (95 %), PS (65 %), mutation du II, OP, grossesse... Insensible à HNF	± Activation de la PC endogène par venin de serpent (1), puis activation du X par RVV(2)+PL+Ca++. 2 temps.	-
Gradileiden V	Life diagnostics	Facteur V-L + PC, AVK Peu sensible à AC lupique, Insensible à VIII, facteurs contact, PC, PS, HNF	± Activation de la PC endogène par venin de serpent (1), puis activation du X par RVV-X+PL+Ca++(2) à concentration optimisée. 2 temps.	±
Cryocheck Clot APCR	PrecisionBiologic www.precisionbiologic.com			
APC Resistance kit	Technoclone www.technoclone.com	Facteur V-L Insensible à AC lupique, VIII, AVK, HNF	Prédilution en « plasma de dilution » puis activation du V par RVV-V(2)± PCA, puis activation du II venin (3) dépendant du V résiduel. 2 temps.	+
Pefakit APC-R Factor V Leiden	Pentapharm Ltd www.pentapharm.com	Facteur V-L (100 % ssb, 100 % sp) Insensible à AC lupique (ni Ca++, ni PL), au VIII (en amont), AVK, HNF, déficit en PS et PC	Prédilution en plasma déficient V puis activation du V par RVV-V ± PCA puis activation du II par venin (3) dépendant du V résiduel. 2 temps.	+

Tableau II

Principaux tests de recherche d'une résistance à la protéine C activée.

Caractéristiques des venins utilisés dans les différentes méthodes : (1) *Agkistrodon contortrix contortrix*, ou *mocassin à tête cuivrée du sud*, activateur de la PC (Protac). – (2) RVV, venin de vipère Russell (*Daboia russelii*), peut être activateur du facteur X (RVV-X) ou activateur du facteur V (RVV-V) selon les composants isolés à partir du venin complexe. – (3) *Noscarine* issue du venin de *Notechis scutatus scutatus*, activateur du facteur II en présence de facteur V. – (4) Venin de *Crotalus Viridis helleri*, activateur du X.

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

teurs V, X ou II par les venins 2, 3 ou 4, voir légende du tableau II) et la concentration en phospholipides permettent d'éliminer l'influence des anticoagulants de type lupique..

Le choix entre tests sensibles à la « résistance à la PCA », quels que soient les paramètres impliqués dans cette résistance, et tests de dépistage de la mutation Leiden a été et reste débattu. Les premiers revendiquent une capacité à reconnaître un risque global, lié à la perturbation de plusieurs mécanismes potentiellement impliqués dans le risque thrombotique, les seconds sont des outils dans la stratégie de dépistage de la mutation Leiden.

Les industriels ont ainsi décliné des solutions techniques variées (mais parfois très proches les unes des autres). Le Tableau II résume les principales d'entre elles.

On peut ainsi différencier ces tests selon :

- Leur polarité vers un test d'exploration globale de la voie de la protéine C (test de dépistage du risque thrombotique) ou vers le dépistage spécifique de la mutation V Leiden. La majorité des tests présentant une excellente sensibilité à la mutation Leiden, le manque de spécificité (risque de faux positifs), ou test de dépistage perturbé sans mutation Leiden) se trouve avant tout associé à une problématique économique, avec la génération de contrôles par biologie moléculaire plus nombreux.

- Les moyens mis en œuvre pour assurer cette spécificité : ou bien prédilution dans du plasma déficient en facteur V ou bien déclenchement de la coagulation la plus distale possible dans la cascade par des venins activateurs du V, du X ou du II. L'optimisation des concentrations de venin influence également la spécificité (comme l'illustrent les deux versions du test de la société Life Diagnostics (anciennement Gradipore, Clarkston, Etats-Unis, tableau II). La prédilution du plasma à tester dans un pool de plasmas normaux est également préconisée dans certaines méthodes qui restent sensibles à la présence de 25 % de taux de facteur V Leiden.

- La mesure de deux temps (avec ou sans PCa) ou d'un seul temps. La réalisation du temps de coagulation en l'absence de PCa permet d'identifier d'éventuelles autres causes d'allongement du temps de coagulation. Les ratios sont le plus souvent valables malgré les allongements des temps de base, mais le contrôle du diagnostic par une autre méthode est recommandé en cas d'allongement important des temps. Certaines méthodes recommandent l'expression des résultats sous forme de ratio entre le résultat du patient sur le résultat d'un

pool normal ou d'un plasma lyophilisé (ratios normalisés).

- L'implication de la protéine C par activation de la PC endogène ou par ajout de PCa exogène. Le recrutement de la PC endogène activée par le venin d'*Agkistrodon contortrix* pour dégrader le facteur V peut entraîner une sensibilité du test aux déficits en PC.

- L'activation de la coagulation par des modes d'activation traditionnels (comme le TCA) ou situé plus en aval de la cascade (comme l'activation du facteur V ou de la prothrombine), ce qui donne une indépendance du test vis-à-vis des facteurs d'amont (au facteur VIII en particulier) et des autres causes d'allongement des temps de coagulation traditionnels (déficits en facteurs, insuffisance hépatique, lupus anticoagulant).

3.2 - Les tests de dosage de la prothrombine

La méthode traditionnelle de dosage de la prothrombine repose sur une mesure en un temps en plasma déficient en facteur II. Très satisfaisante en cas de diminution du facteur II, elle est moins adaptée à ses augmentations (non linéarité de la diminution des temps de coagulation par rapport à l'augmentation du taux). Elle nécessite donc d'être réalisée sur un plasma dilué pour se trouver dans la zone de linéarité du test.

Des alternatives existent, elles reposent sur des méthodes immunologiques (type Laurell ou ELISA) ou sur l'activation de la prothrombine par des venins de serpent et un dosage chromogénique de la thrombine.

La classification des venins de serpent activateurs de prothrombine a été récemment modifiée. Elle comporte maintenant 4 classes (voir tableau III) (34). Les noms sont formés à partir d'un préfixe dérivé du nom latin des espèces auquel est associé le suffixe « -arine » ou (activase), et il est recommandé d'associer la lettre du groupe auquel appartient l'activateur. Les activateurs de prothrombine appartenant aux groupes A et B sont des métalloprotéinases, les activateurs de prothrombine appartenant aux groupes C et D sont des sérines protéinases, de structure proche du complexe Va-Xa pour le groupe C et du facteur Xa pour le groupe D.

Ainsi, parmi les venins du groupe A, les espèces *Bothrops* ou *Echis* convertissent la thrombine en meizothrombine de façon indépendante du facteur V, du calcium et des phospholipides. Les techniques utilisant l'écarine nécessitent donc un

Classe	Cofacteur nécessaire	Exemple	Ancien nom	Type
Groupe A	Aucun	Ecarine	Groupe IA	Métalloprotéinase
Groupe B	Ca ²⁺	Carinactivase	Groupe IB	Métalloprotéinase
Groupe C	Ca ²⁺ , phospholipides	Pseutarine (ex textarine)	Groupe III	Sérine protéase Xa (+Va)
Groupe D	Ca ²⁺ , phospholipides, Va	Notécarine (ex noscarine)	Groupe II	Sérine protéase Xa

Tableau III
Classification des activateurs de prothrombine issus de venins de serpent. D'après (35).

substrat sensible à la meizothrombine. Les venins du groupe D issus du serpent tigre australien (*Notechis sculatus*) contiennent des activateurs de la prothrombine fortement stimulés par la présence de Va, de calcium et de phospholipides. Les venins du groupe C issus des espèces *Pseudonaja* et *Oxyuranus*, contiennent des activateurs de la prothrombine très dépendants du calcium et des phospholipides mais peu dépendants du Va. Le temps de coagulation en présence de pseutarine (textarine) peut donc être perturbé par la présence d'anticoagulants de type lupique et par les déficits en facteur V.

L'utilisation des différentes méthodes de dosage de la prothrombine confirme l'augmentation des taux circulants chez les porteurs de l'allèle 21210A, sans différence notable entre les méthodes fonctionnelles.

Toutefois, le dosage immunologique est moins sensible que les méthodes fonctionnelles à la présence de la mutation 20210A (35). L'hypothèse d'une modification post-transcriptionnelle de la prothrombine chez les sujets mutés a été posée. L'utilisation du ratio entre le pourcentage de facteur II et le pourcentage du TP des patients serait plus discriminant que le pourcentage seul du facteur II et pourrait être utilisé chez les patients sous AVK. Ce simple calcul a d'ailleurs fait l'objet d'un dépôt de brevet en 1998, aux Etats-Unis et en Allemagne.

4. Les méthodes moléculaires

4.1 - Aspects légaux

En tant qu'examen touchant les caractéristiques génétiques, c'est à dire la nature intime de l'individu et ses liens familiaux, la recherche des mutations V et II obéit aux mêmes règles que tout autre test génétique. Ces règles ont été définies par décret du JO paru le 23 juin 2000 et insérées dans le code de la santé publique (livre I^{er}, titre VI, chapitre 1^{er}). Ce code définit que l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales a pour objet « soit de confirmer ou d'infirmer le diagnostic de maladie génétique chez une personne qui en présente les symptômes, soit de rechercher, chez une personne asymptomatique, les caractéristiques d'un ou plusieurs gènes susceptibles d'entraîner à terme le développement d'une maladie chez la personne elle-même ou sa descendance. » Quatre sections précisent respectivement les conditions de prescription, les conditions d'agrément et d'autorisation à la pratique, les conditions de communication du résultat, et les conditions de conservation du document.

La prescription suppose un entretien préalable avec le patient afin de lui expliquer la nature de l'examen, la signification du résultat, et les conséquences éventuelles de ce résultat sur son suivi thérapeutique et son pronostic. L'accord écrit du sujet est requis pour réaliser le test, et il peut refuser d'en connaître le résultat. L'information préalable à la réalisation du test (directe, puis consignée

par écrit) comme la remise du résultat doivent être faites par un médecin ayant des compétences en génétique médicale. Le secret médical doit être respecté vis-à-vis des tiers, y compris les autres membres de la famille qui ne peuvent être contactés que par le sujet lui-même. Les mineurs ne sont testés qu'en cas de bénéfice individuel direct attendu.

La réalisation des analyses est restreinte à des praticiens agréés exerçant dans des établissements ou organismes autorisés. L'agrément des praticiens est nominatif et attribué pour une durée de cinq ans renouvelable par arrêté du préfet de région pris après avis de la commission consultative nationale en matière d'examens des caractéristiques génétiques à des fins médicales.

Le compte rendu d'analyse commenté et signé par le praticien responsable agréé doit être adressé exclusivement au praticien prescripteur des examens génétiques, puis remis au patient dans le cadre d'une consultation médicale individuelle.

Le consentement écrit, le double des prescriptions et les comptes rendus d'analyse doivent être conservés par le médecin prescripteur dans le dossier médical du patient pour une durée de trente ans. Les comptes rendus d'analyse et leur commentaire explicatif sont également conservés par le laboratoire de biologie médicale pour une durée de trente ans.

Beaucoup de solutions techniques existent pour le diagnostic moléculaire des mutations Leiden II et V. Toutes sont acceptables à partir du moment où le laboratoire les a validées.

Les recommandations américaines font obligation d'adhérer à un système d'assurance qualité validé par l'Adult Medical Genetics Program (AMGP). Au niveau européen, la fondation de l'ECAT (www.ecat.nl) à fournir deux fois par an des échantillons de contrôle testés pour un ensemble de mutations (V, II, XIII, MTHFR, IIb/IIIa et PAI-1) pour le prix de 80 euros.

Les recommandations américaines sont en revanche moins exigeantes pour le consentement éclairé (qui n'est requis que dans certains états), et pour la compétence exigée du médecin prescripteur et habilité à transmettre le résultat, puisque le médecin traitant, qui n'a pas forcément une compétence particulière en génétique médicale, y est autorisé. Pour le cas des mutations II et V Leiden qui sont fréquentes et n'engagent pas le pronostic vital, les recommandations américaines sont plus pragmatiques. Elles correspondent davantage à la réalité de la situation française où la prescription est souvent faite par des médecins n'ayant pas de compétence validée en génétique médicale. Les médecins traitants sont de fait souvent les interlocuteurs directs des patients, et le consentement écrit n'est pas toujours transmis pour les patients hospitalisés. En revanche, les recommandations américaines insistent sur le recueil par le laboratoire des informations démographique et clinique du patient (date de naissance, indication du test, antécédents familiaux de thrombose) et mentionnent que les

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

données concernant les origines raciales sont souvent collectées, sans en faire une règle.

4.2 - Aspects méthodologiques : les principes techniques

Il existe aujourd'hui plusieurs dizaines de techniques différentes validées et adaptées au diagnostic de la mutation Leiden des facteurs II et V. La plupart des méthodes actuellement utilisées par les laboratoires restent encore des techniques « maisons ». Leurs réactifs n'ont pas les garanties apportées par les ASRs (Analyte Specific reagents) qui sont des réactifs obéissant aux bonnes pratiques de préparation (GMP, good manufacturing practice). Les kits de détermination qui possèdent la norme IVD (*in vitro* diagnostic) restent peu nombreux et plus coûteux que les méthodes « maison ». Le LightCycler® Factor V (II) kit a été le premier kit IVD en 2003. La responsabilité de la validité du résultat repose donc sur chaque laboratoire qui doit tout mettre en place pour assurer les performances de la technique qu'il utilise et garantir les différentes étapes des procédures en s'entourant de contrôles permettant d'évaluer l'efficacité des différentes étapes analytiques (amplification, digestion...). Les changements de lot de réactifs nécessitent une attention particulière.

L'utilisation de trois contrôles (normal, muté hétérozygote et homozygote) est nécessaire dans chaque série de détermination. Des contrôles commerciaux sont disponibles, mais il est possible d'utiliser la matrice de patients de génotype connu. Par ailleurs, Le NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) a produit des lignées cellulaires immortalisées issues de patients porteur des trois génotypes (normal, hétérozygote et homozygote pour la mutation V Leiden). Ces lignées constituent une source stable d'ADN et le premier panel de référence pour le facteur V Leiden (36). Pour les homozygotes Leiden II, très peu nombreux, l'utilisation d'un amplifiat secondaire est possible.

Les techniques actuelles sont fondées sur l'étude différentielle, dans un produit d'amplification entourant la mutation à rechercher, de la copie normale et de la copie mutée du gène. Les conditions de l'amplification doivent obéir aux recommandations générales pour les laboratoires de génétique médicale, avec les précautions nécessaires pour éviter les contaminations, l'utilisation de méthodes documentées, publiées et validées au sein du laboratoire réalisant les actes, l'utilisation de contrôles appropriés.

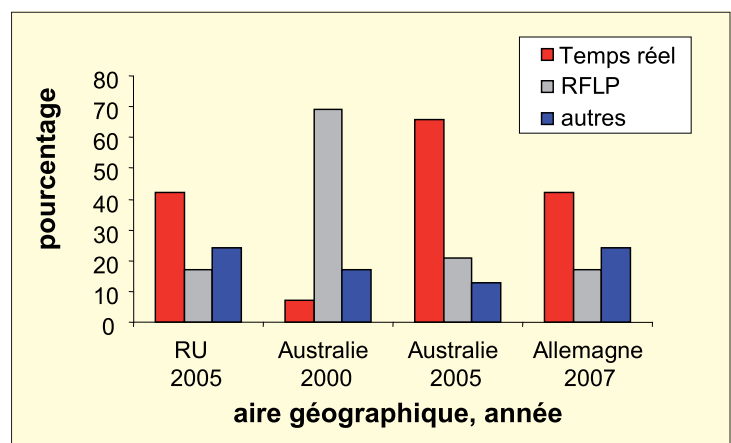
Toutes ces techniques, réalisées de façon rigoureuse en présence d'un blanc réactif et de contrôles tant positifs que négatifs, sont parfaitement sensibles et spécifiques. Du fait de l'importance d'établir un diagnostic fiable à 100 %, il serait souhaitable de réaliser soit deux déterminations indépendantes par la même méthode soit deux déterminations par des méthodes différentes pour vérifier l'absence d'erreur de prélèvement et de manipulation. Cette attitude n'est cependant pas

généralisée en pratique.

Les différentes technologies mises en œuvre pour réaliser la détection de la mutation à proprement parler sont trop nombreuses et variées pour être décrites dans cette revue de façon exhaustive et détaillée. Nous privilégierons plutôt la présentation didactique de certaines d'entre elles. Deux grandes familles dominent actuellement le marché : les méthodes nécessitant une étape de séparation sur gel d'électrophorèse (les premières à avoir été utilisées en 1994 lors de la découverte de la mutation V Leiden) et les techniques en temps réel. De nombreuses autres techniques nécessitant souvent des appareillages spécifiques, peuvent apporter des solutions élégantes aux laboratoires capables de rentabiliser les investissements qu'elles supposent par un débit d'analyse suffisant. La Figure 6 rassemble des données d'études collaboratives ou de contrôles de qualité externes publiées récemment par des auteurs issus de différentes régions du globe (36, 37, 38). Elle illustre la part grandissante prise par les techniques en temps réel aux dépens des techniques de type RFLP, ainsi qu'un taux d'erreur diagnostique stable autour de 1 %. Les erreurs surviennent plus souvent par intervention d'échantillons et erreurs de transcription que par erreurs analytiques (38). Cela confirme qu'outre les aspects analytiques développés ci-dessous, la robustesse et la fiabilité de l'organisation tout au

Figure 6
Répartition des techniques utilisées pour la recherche de la mutation V Leiden relevée dans le cadre d'études collaborative ou de contrôle de qualité.
*Société allemande de chimie clinique et de médecine de laboratoire, Deutsche Vereinigte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. - www.dgkl.de/

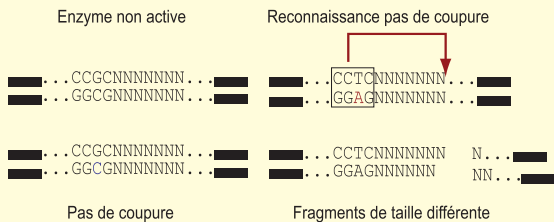
Référence	Gray et al., 2006 (36)	Hertzberg et al., 2006 (37)	DGKL*, 2007 (38)
Pays organisateur	Royaume-Uni	Australie	
Année d'étude	2005	2000	2005
PCR temps réel	42	7	66
RFLP	17	69	21
ASO	15	14	7
OLA	0	3	0
ARMS + miniséq	9	0	6
Taux d'erreur	0,7 %	1 %	1,54 %



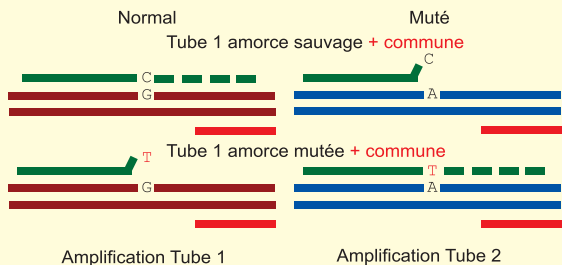
Encadré I

Différentes approches du diagnostic moléculaire.

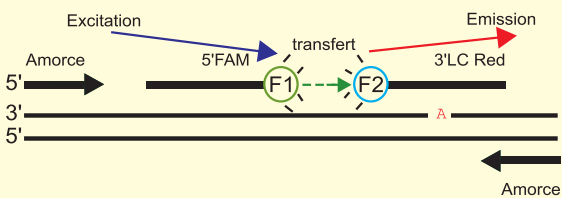
a) Polymorphisme de longueur de fragments de restriction



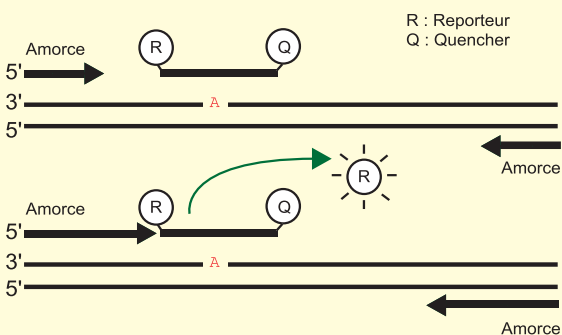
b) Amplification spécifique d'allèle



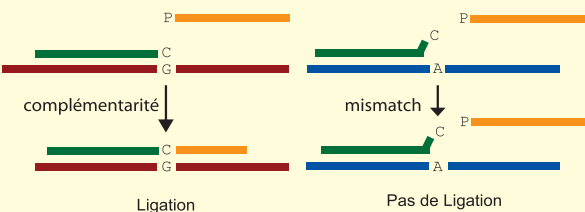
c) Sondes LightCycler™



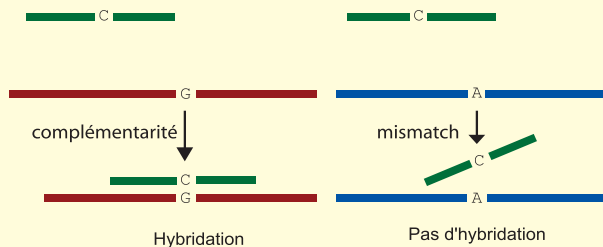
d) Sondes Taqman™



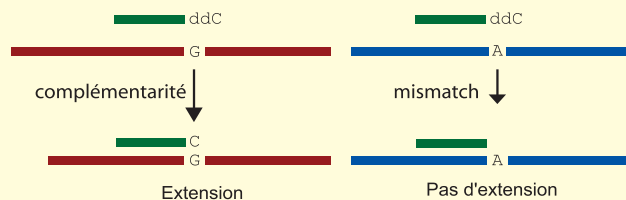
e) Ligation des oligonucléotides



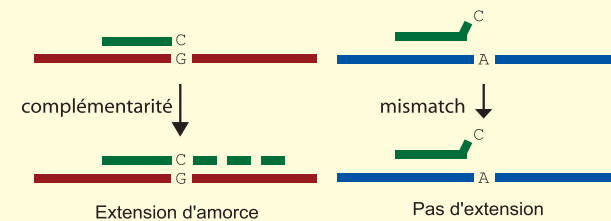
f) Hybridation spécifique d'allèle



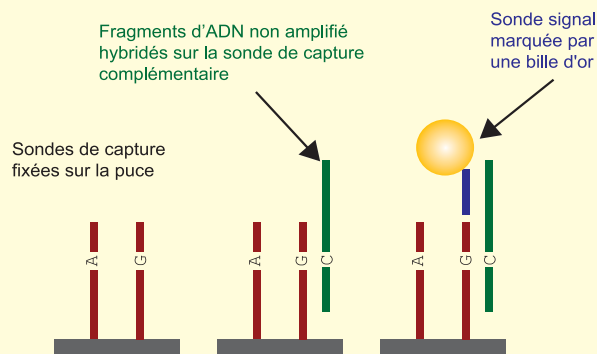
g) Extension d'amorces avec terminators



h) Extension d'amorces spécifiques d'allèle



i) Technologie Nanosphere



Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

long de la chaîne allant du pré au post-analytique sont les conditions sine qua non de la qualité.

4.3 - Techniques sur gel

Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP)

La digestion par une enzyme de restriction du matériel amplifié produit différents fragments de tailles variables en fonction de la séquence de l'amplifié (*encadré 1 a*). L'analyse de la longueur de ces fragments permet de rechercher des substitutions, des insertions ou des délétions qui modifient le nombre de sites de restriction et donc la longueur des fragments de restriction. La RFLP a constitué la première technique moléculaire de détection de la mutation Leiden V. En effet, celle-ci est à l'origine de la perte d'un site de restriction (MnII) d'où la possibilité de distinguer selon cette approche les homozygotes et les hétérozygotes. Une technique dérivée consiste à introduire un site de restriction artificiel par l'utilisation d'une amorce spécifique de la mutation.

De très nombreuses enzymes ont été décrites pour la recherche des mutations R506Q et 20210 G>A. Il est préférable de choisir des enzymes permettant de visualiser un site de restriction contrôle, toujours présent et localisé à un autre emplacement que la mutation recherchée. De même, il est recommandé d'utiliser des tests qui vont faire apparaître un site de restriction en cas de mutation plutôt que le faire disparaître.

PCR spécifique d'allèle (Allele-specific PCR ou amplification refractory mutation system ou ARMS)

Cette méthode est fondée sur le fait que la présence d'un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce ne permet pas l'amplification (*encadré 1 b*). Deux amplifications sont réalisées dans deux tubes contenant tous les deux une amorce commune mais différenciées par la présence d'une amorce spécifique de l'allèle sauvage dans le premier et d'une amorce spécifique de l'allèle muté dans le second. La séquence de l'amorce spécifique de l'allèle muté est conçue de façon à ce que le nucléotide muté corresponde à son extrémité 3'. Les homozygotes sauvages et mutés ne donneront d'amplification que dans un des deux tubes, les hétérozygotes conduiront à une amplification dans les deux tubes. Dans ce cas, le produit final est un amplicon double brin. Plusieurs variantes de cette technique ont été décrites impliquant notamment l'utilisation d'amorces spécifiques marquées par un fluorophore et l'utilisation de l'électrophorèse capillaire comme technique séparative.

L'analyse de conformation de l'ADN simple brin (Single Stranded Conformation polymorphism, SSCP), l'électrophorèse en gradients

d'agents dénaturants (Denaturing Gradient Gel electrophoresis, DGGE) et surtout le séquençage peuvent être adaptés au diagnostic des deux mutations Leiden bien que ces techniques soient plutôt dévolues à la recherche de mutations non ciblées

4.4 - Techniques en temps réel fondées sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)

Deux techniques associent amplification et fluorimétrie en exploitant le phénomène de FRET : soit grâce à des sondes allèles spécifiques de type LightCycler™ (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse), soit grâce à des sondes d'hydrolyse de type « Taqman™ » (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Dans les deux cas, un couple d'amorces amplifie la zone jouxtant le polymorphisme recherché

La méthode Lightcycler met en œuvre, deux sondes courtes marquées par deux fluorophores différents, l'une d'entre elle peut s'hybrider sur la zone du polymorphisme et l'autre à proximité (*encadré 1 c*). Le rapprochement physique de ces sondes sur les amplifiats permet le transfert d'énergie et l'augmentation du signal fluorescent est mesuré en temps réel. La présence d'une mutation modifie les propriétés de fusion des complexes sonde/produit d'amplification et la réalisation d'une courbe de fusion permet donc d'identifier les différents génotypes

La méthode TaqMan™ repose sur une sonde unique portant deux fluorophores (en 5' Reporteur FAM, TET, JOE, HEX ou VIC™, en 3' Quencher, habituellement TAMRA). La petite taille de la sonde (25 à 30 nucléotides, soit moins de 55 angströms), fait que l'énergie absorbée par le reporteur excité est transférée par FRET au quencher (*encadré 1 d*). Le spectre d'excitation du TAMRA ne chevauchant pas le spectre d'émission du reporteur, le quencher absorbe l'énergie sans émettre aucune fluorescence. Le système TaqMan™ utilise l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase qui hydrolyse la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces. Ainsi au cours des cycles d'amplification le fluorophore reporteur est libéré et l'émission de fluorescence augmente. L'utilisation de sondes TaqMan™ allèle-spécifique permet la détermination des génotypes.

On notera également l'existence d'une autre méthode fondée sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, la technologie Invader®, commercialisée par la société Third Wave Technology. Elle peut s'employer avec ou sans PCR préalable du fait de l'amplification considérable du signal fluorescent (6 à 7 log) par rapport au nombre de séquences cibles.

4.5 - Autres Techniques

Ligature des oligonucléotides (Oligonucléotide ligation assays, OLA)

Son principe est fondé sur une propriété de la ligase : cette enzyme ne lie deux oligonucléotides adjacents que s'ils sont parfaitement appariés à

leur séquence cible (*encadré I e, voir page 70*). La technique utilise donc, d'une part, un oligonucléotide complémentaire de la séquence d'ADN jouxtant le site du polymorphisme et, d'autre part, une sonde conçue de façon à ce que son extrémité 5' ou 3' soit terminée par un nucléotide spécifique de l'allèle sauvage ou muté. Le résultat de la réaction de ligation, le fait que ces deux oligonucléotides soient effectivement liés ou pas, permet de déterminer le génotype des fragments d'amplification étudiés.

Hybridation spécifique d'allèle (allele-specific hybridization, ASO)

Fondée sur la spécificité de la réaction d'hybridation cette technique se prête à de multiples variantes selon les techniques de marquages et de détection employées (*encadré I f, voir page 70*). L'approche « reverse dot-blot » consiste à fixer sur une membrane les sondes oligonucléotidiques. La réaction d'hybridation est réalisée dans des conditions de haute stringence assurant que l'ADN génomique préalablement amplifié et marqué ne s'hybride qu'avec la sonde dont la séquence lui est parfaitement complémentaire.

Extension d'amorces spécifiques d'allèle (allele-specific primer extension)

Une amorce est conçue pour s'hybrider une base en amont du site du polymorphisme (*encadré I g, voir page 70*). Mise en présence de l'ADN cible amplifié, des didésoxynucléotides (ddNTPs, terminators) et d'une enzyme permettant l'incorporation des ddNTPs, l'amorce est étendue d'une seule base (on parle de miniséquençage). Il existe de multiples déclinaisons de cette technique différenciées par leur format (réalisation en phase liquide, sur support solide,...) et le type de détection mis en œuvre (fluorescence, chimioluminescence, spectrométrie de masse,...). Une autre variante consiste à utiliser des amorces spécifiques d'allèle qui seront étendues si leur appariement avec la séquence cible est parfait (*encadré I h, voir page 70*). On notera qu'une extension peut survenir dans le cas de certains mésappariements. Ce phénomène est toutefois moins rapide que l'extension d'une sonde parfaitement appariée. La technique dite AMASE (apyrase-mediated allele-specific extension) exploite élégamment cette différence de cinétique et résout de la sorte ce problème d'extension de mésappariements.

Technologie xMAP

On doit cette technologie à la société Luminex (Austin, Texas). Des microsphères de polystyrène de 5,6 µm de diamètre sont marquées par des concentrations variables de 2 fluorophores (rouge et infrarouge) permettant de distinguer 100 sous-types de billes. Des oligonucléotides greffés à la surface des billes permettent la capture de séquences complémentaires dans l'échantillon à tester (chaque type de bille est couplé à un oligonucléotide unique). Une amorce est associée à

chaque oligonucléotide spécifique d'un des polymorphismes à étudier. Une première phase d'amplification est suivie d'une deuxième avec l'extension d'une amorce allèle spécifique et en présence de dNTP-biotinylés. L'identification des billes par cytométrie en flux est réalisée grâce à leur marquage fluorescent, et la streptavidine couplée à de la phycoérythrine permet de quantifier les séquences qui ont été reconnues et amplifiées. Le génotype est défini par la comparaison du signal obtenu sur les billes portant les allèles sauvage et muté. Les avantages de la méthode sont les très faibles quantités de réactifs et d'échantillons (de l'ordre du microlitre), le fait que 100 cibles puissent être analysées simultanément dans le même échantillon, l'automatisation potentielle de la lecture. Bien qu'aucun produit IVD ne soit encore disponible pour les recherches des mutations V et II de Leiden et que l'utilisation de la méthode requière l'étape de fixation des oligonucléotides d'intérêt sur les billes, L'ACMG retient la technologie xMAP comme une méthode simple et de haut débit. Ce type de solution se décline ensuite en de nombreuses variantes

Microarrays et nanotechnologies ?

Plusieurs types de microarrays commercialisés ou résultant d'un développement « maison » ont également été mis en œuvre. A titre d'exemple, on peut citer le système NanoChip™ proposé par la société Nanogen (San Diego, Etats-Unis) pour lequel les tests de détection des mutations G1691A et G20210A sont disponibles. Cette plateforme automatisée présente l'avantage de permettre la réalisation de nombreux tests en parallèle.

La société Nanosphere (Northbrook, Etats-Unis) présente pour sa part une alternative originale. A la différence des autres techniques moléculaires décrites dans ces pages, cette méthode ne requiert ni amplification du matériel génétique ni utilisation d'enzymes (39). Elle s'appuie sur deux hybridations séquentielles avec, d'une part deux sondes spécifiques de chaque allèle (ou sondes de capture) et, d'autre part, une sonde signal spécifique d'une portion de séquence proche du polymorphisme. Les sondes de capture sont fixées sur une puce et la sonde signal est portée par des nanoparticules d'or d'une quinzaine de nanomètres de diamètre (*encadré I i, voir page 70*). L'ADN génomique (0,5 à 5 µg) est fragmenté par des ultrasons (taille des fragments 500 paires de bases) et l'échantillon est mis en contact avec les sondes greffées par la puce puis, après une étape de lavage, avec la sonde signal portée par les nanoparticules. Après élimination des particules non hybridées la réaction est révélée à l'argent et une lecture optique est réalisée. Grâce à l'extrême sensibilité de la détection des billes d'or et à la spécificité apportée par les sondes (capture et signal), qui prennent la cible en sandwich, cette méthode au principe relativement simple s'affranchit des besoins d'amplification et de réduction de la complexité de l'ADN génomique.

Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques

Différentes applications ont été développées pour ce système et notamment un test multiplexé pour la détection des mutations V et II Leiden associées à la mutation 677C>T MTHFR. Les conditions d'hybridations sont homogènes (40 °C) et la stringence a été définie pour permettre une bonne discrimination simultanée des 3 polymorphismes. La technique se caractérise par sa sensibilité : 0,5 µg d'ADN génomique (150 000 copies) permet d'obtenir un signal suffisant pour une discrimination efficace.

IV - Conclusion

Le développement des méthodes de génotypage, des chimies et des plateformes automatisées est rapide et continu. Il est impossible de faire une revue exhaustive des techniques disponibles pour le diagnostic des mutations V et II Leiden. Chaque laboratoire fait des choix dépendant du nombre de ses prescriptions, de ses équipements et de son l'organisation. La tendance actuelle au

regroupement des activités moléculaires au sein de plateaux multidisciplinaires et l'augmentation du nombre de prescriptions d'analyses moléculaires devrait permettre l'acquisition de matériels plus automatisés et plus performants. Des économies en temps de travail et en volumes de réactifs devraient en découler, et les techniques historiques de RFLP, peu coûteuses en terme de réactifs et surtout d'équipement mais très consommatrices de temps humain devraient progressivement disparaître. Les règles générales (utilisation de blanc réactif et contrôles négatifs et positifs) s'appliquent à toutes les technologies, qui peuvent aussi nécessiter des contrôles propres. Entre méthodes IVD très coûteuses et les méthodes maisons plus économiques, le choix dépend du degré de responsabilité qu'est prêt à assumer le biologiste responsable et des contraintes économiques auxquelles il est confronté. Les années qui viennent devraient certainement voir les industriels s'engager plus fortement dans la certification des solutions techniques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) NICOLAES GA, DAHLBÄCK B., Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, 1, 22(4), 530-538.
- (2) BERTINA RM, KOELEMAN BPC, KOSTER T. *et al.*, Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 1994, 369, 64-67.
- (3) ROSENDAAL FR, KOSTER T., VANDENBROUCKE JP, REITSMA PH, High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*, 85(6), 1504-1508.
- (4) ENDLER G., MANNHALTER C., Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin. Chim. Acta.*, 2003, 330(1-2), 31-55.
- (5) WILLIAMSON D., BROWN K., LUDDINGTON R., BAGLIN C., BAGLIN T., Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306→Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*, 1998, 91(4), 1140-1144.
- (6) CHAN WP, LEE CK, KWONG YL, LAM CK, LIANG R., A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood*, 1998, 91(4), 1135-1139.
- (7) NORSTRØM E., THORELLI E., DAHLBÄCK B., Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood*, 2002, 100(2), 524-530.
- (8) ALHENC-GELAS M., NICAUD V., GANDRILLE S., VAN DREDEN P., AMIRAL J., AUBRY ML, FIESSINGER JN, EMMERICH J., AIACH M., The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.*, 1999, 81(2), 193-197.
- (9) FOLSOM AR, CUSHMAN M., TSAI MY, ALEKSIC N., HECKBERT SR, BOLAND LL, TSAI AW, YANEZ ND, ROSAMOND WD. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood*, 2002, 99(8), 2720-2725.
- (10) FAIONI EM, FRANCHI F, BUCCIARELLI P, MARGAGLIONE M., DE STEFANO V., CASTAMAN G., FINAZZI G., MANNUCCI PM, Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden). *Blood*, 1999, 94(9), 3062-3066.
- (11) BUTENAS S., MANN KG, Blood coagulation, *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67(1), 3-12.
- (12) BUTENAS S., VAN'T VEER C., MANN KG, "Normal" thrombin generation. *Blood*, 1999, 94(7), 2169-2178.
- (13) POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM, A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 1996, 15, 88(10), 3698-3703.
- (14) COLGAN D. & MANLEY J., Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Dev.*, 1997, 11, 2755-2766.
- (15) GEHRING NH, FREDE U., NEU-YILIK G., HUNDSDOERFER P, VETTER, B., HENTZE MW & KULOZIK AE, Increased efficiency of mRNA 3' end formation : a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat. Genet.*, 2001, 28, 389-392.
- (16) WARSHAWSKY I., HREN C., SERCIA L., SHADRACH B., DEITCHER SR, NEWTON E., KOTTKE-MARCHANT K., Detection of a novel point mutation of the prothrombin gene at position 20209. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2002, 11(3), 152-156.
- (17) WYLENZEK M., GEISEN C., STAPENHORST L., WIELCKENS K., KLINGLER KR, A novel point mutation in the 3' region of the prothrombin gene at position 20221 in a Lebanese/Syrian family. *Thromb. Haemost.*, 2001, 85(5), 943-944.
- (18) CEELIE H., BERTINA RM, VAN HYLCKAMA Vlieg A., ROSENDAAL FR, VOS HL, Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb. Haemost.*, 2001, 85(6), 1066-1070.
- (19) MARTINELLI I., BATTAGLIOLI T., TOSETTO A., LEGNANI C., SOTTILE L., GHIOTTO R., MANNUCCI PM, Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, 4(12), 2582-2586.
- (20) CHINTHAMMITR Y., VOS HL, ROSENDAAL FR, DOGGEN CJ, The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, 4(12), 2587-2592.

- (21) YE Z, LIU EH, HIGGINS JP, KEAVNEY BD, LOWE GD, COLLINS R, DANESH J, Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet.*, 2006, 25, 367(9511), 651-658.
- (22) RIDKER PM, MILETICH JP, HENNEKENS CH, BURING JE, Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women: implications for venous thromboembolism screening. *JAMA*, 1997, 277(16), 1305-1307.
- (23) GREGG JP, YAMANE AJ, GRODY WW. Prevalence of the factor V Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am. J. Med. Genet.*, 1997, 73, 334-336.
- (24) ROSENDAAL FR, DOGGEN CJM, ZIVELIN A., ARRUDA VR, AIACH M, SISCOVICK DS, HILLARP A., WATZKE HH, BERNARDI F., CUMMING AM, PRESTON FE, REITSMA PH, Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb. Haemost.*, 1998, 79, 706-708.
- (25) DE STEFANO V., MARTINELLI I., MANNUCCI PM, PACIARONI K., CHIUSOLO P., CASORELLI I., ROSSI E., LEONE G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341, 801-806.
- (26) RIDKER PM, HENNEKENS CH, LINDPAINTNER K., STAMPFER MJ, EISENBERG PR, MILETICH JP, Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332, 912-917.
- (27) MARTINELLI I., BUCCIARELLI P., MARGAGLIONE M., DE STEFANO V., CASTAMAN G., MANNUCCI PM, The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br. J. Haematol.* 2000, 111, 1223-1229.
- (28) TOSETTO A., RODEGHIERO F., MARTINELLI I., DE STEFANO V., MISSIAGLIA E., CHIUSOLO P., MANNUCCI PM, Additional genetic risk factors for venous thromboembolism in carriers of the factor V Leiden mutation. *Br. J. Haematol.*, 1998, 103, 871-876.
- (29) MARTINELLI I, SACCHI E, LANDI G, TAIOLI E, DUCA F, MANNUCCI PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338(25), 1793-1797.
- (30) GRODY WW, GRIFFIN JH, TAYLOR AK, KORF BR, HEIT JA, ACMG Factor V Leiden Working Group. American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing. *Genet. Med.*, 2001, 3(2), 139-148.
- (31) Factor V Leiden and Prothrombin 20210G>A Testing): A Disease-Specific Supplement to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, In Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2006 Edition. Consultable en ligne : http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/fv-pt.htm
- (32) DAHLBÄCK B., CARLSSON M., and SVENSSON PJ, Familial Thrombophilia Due to a Previously Unrecognized Mechanism Characterized by Poor Anticoagulant Response to Activated Protein C: Prediction of a Cofactor to Activated Protein C, *PNAS*, 1993, 90, 1004-1008.
- (33) FREYBURGER G., BILHOU-NABERA C., DIEF S., JAVORSCHI S., LABROUCHE S., LEREBELLER MJ, BOISSEAU MR, Technical and biological conditions influencing the functional APC resistance test, *Thromb. Haemost.*, 1996, 75(3), 460-465.
- (34) KINI RM, MORITA T., ROSING J., Classification and nomenclature of prothrombin activators isolated from snake venoms. *Thromb. Haemost.*, 2001, 85, 710-711.
- (35) DELAHOUSSE B., GILBERT M., NICHAM F., THIRION C., GIRAUDEAU B, GRUEL Y., Comparative evaluation of five different methods for the measurement of plasma factor II levels in carriers of the 20210A prothrombin variant, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 2002, 13(5), 465-470.
- (36) GRAY E., HAWKINS JR, MORRISON M., HAWKINS M., BYRNE E., KITCHEN S., JENNINGS I., MAKRIS M., PRESTON FE, METCALFE P., Establishment of the 1st International Genetic Reference Panel for Factor V Leiden, human gDNA. *Thromb. Haemost.*, 2006, 96(2), 215-219.
- (37) HERTZBERG MS, MAMMEN J., MCCRAW A., NAIR SC, SRIVASTAVA A., Achieving and maintaining quality in the laboratory, *Haemophilia*, 2006, Suppl 3, 61-67.
- (38) FV/01 survey for molecular biology of the reference institute for bioanalytics of the DGKL, Allemagne.
- (39) PAUL BAO Y., HUBER M., WIE TF, MARLA SS, STORHOFF JJ, & MÜLLER UR, SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticle probes, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(2), e15.