

Christian HERVE¹, Nejma AMEZIANE^{1,*}, Pascal GUIET^{1,**}

Mise en œuvre de la biologie moléculaire dans un laboratoire de biologie médicale : l'expérience du CH de Sens

RÉSUMÉ

L'essor récent de la PCR en temps réel a permis la pratique de la biologie moléculaire au sein de notre service. De nouvelles analyses du domaine infectieux ont pu être développées, ainsi que quelques analyses de génétique après obtention des autorisations réglementaires. Si nous envisagions l'utilisation de cet outil performant depuis plusieurs années, le recrutement d'une biologiste confirmée a constitué le facteur déclenchant de développement de ce nouveau secteur d'activité. Partant de l'expérience concrète du CH de Sens, nous présentons les caractéristiques, les contraintes et les atouts associés à la réalisation de cette activité dans l'environnement d'un laboratoire de biologie polyvalente. Les implications organisationnelles liées à la pratique des examens de génétiques ont nécessité une révision de l'ensemble du processus biologique depuis la prescription de l'acte biologique au rendu des résultats au patient. Il en est de même pour les procédures d'archivage de l'ensemble des documents afférents. Au total, le rôle du service de biologie est renforcé par les prises de décisions thérapeutiques optimisées dans le temps et l'établissement d'un nouveau dialogue avec les cliniciens. La nécessité du développement de cette activité a été confirmée par l'ensemble des instances du centre hospitalier.

MOTS-CLÉS

Biologie moléculaire, génétique, microbiologie

Implementation of molecular biology in a clinical chemistry laboratory : the Sens Hospital's experiment

SUMMARY

The recent rise of real-time PCR has allowed the practice of molecular biology within our service. New analysis of the infectious field could be developed as well as some genetic tests after obtaining the lawful authorizations. If the use of this powerful tool has been considered for several years in our service, the recruitment of an experienced clinical chemist was the starting factor of development of this new branch of activity. The goal of this article is to show the reality of this new activity in a service of general-purpose biology. The organisational implications related to the practice of genetic tests required a revision of our process from the prescription of the tests to the delivery of the results. It is the same for the procedures for all related documents filing. The role of the clinical chemistry service is reinforced, some therapeutic decisions are now time-optimized and a new dialogue has been established with the clinicians. The need for its development was confirmed by the whole authorities of the hospital.

KEYWORDS

Molecular biology, genetics, microbiology

¹Service de biologie – Pôle Activités transversales – Centre Hospitalier Gaston Ramon – 1, avenue Pierre de Coubertin – BP 108 – 89108 Sens cedex
Tél. : 03 86 86 12 50 – Fax : 03 86 86 12 61 – E-Mail : cherve@ch-sens.fr – www.biosensens.fr/

* Tél. : 03 86 86 12 52 – Fax : 03 86 86 12 61 – E-Mail : nameziane@ch-sens.fr

** E-Mail : pguiet@ch-sens.fr

Mise en œuvre de la biologie moléculaire dans un laboratoire de biologie médicale : l'expérience du CH de Sens

I - Introduction

La biologie moléculaire est longtemps restée réservée à des structures très spécialisées de par la complexité de sa mise en œuvre. En effet, les techniques disponibles étaient délicates, non automatisables et nécessitaient des contraintes d'organisation de locaux extrêmement contraignantes. Toutefois, l'évolution des techniques a depuis quelques années contribué à décloisonner cette activité et à la mettre à la portée de laboratoires de biologie médicale non spécialisés. Comme il est mentionné dans le GBEA (Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale) (1), « *la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire fondées sur une amplification de nucléotides impose des contraintes structurelles visant à limiter les possibilités de contamination croisée par les produits d'amplification* », avec trois zones distinctes et indépendantes : une zone dédiée à la préparation des réactifs, une zone pour la préparation des échantillons et enfin une zone pour la réalisation des étapes d'amplification et l'analyse des produits amplifiés. Le législateur avait néanmoins prévu l'émergence de nouvelles techniques en précisant que « *l'automatisation des analyses de biologie moléculaire peut modifier les exigences concernant les locaux* ».

Ainsi, le développement récent de techniques de PCR (polymerase chain reaction) en temps réel ou real-time PCR allège fortement les contraintes, et ceci d'autant plus que des solutions automatisées sont actuellement disponibles sur le marché. Au total, la pratique de la biologie moléculaire nécessite le respect des règles élémentaires « classiques » inhérentes à l'exercice de tout acte de biologie médicale conventionnel.

Des contraintes réglementaires fortes persistent quant à la réalisation de l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales. En effet, le Code de la Santé Publique (CSP), dans ses articles R. 1131-1 à R. 1131-20, définit les modalités d'exercice de la recherche de mutations chez des sujets symptomatiques ou asymptomatiques de maladie génétique.

Aussi, le propos de cet article est de décrire les modalités selon lesquelles le service de biologie du CH de Sens a pu mettre en œuvre la biologie moléculaire dans un but de diagnostic, dans le domaine infectieux et en génétique. Cette activité est réalisée en routine depuis le début de l'année 2006.

Nous aborderons également les impacts organisationnels des dispositions réglementaires du CSP.

Le déploiement de ce nouvel outil de la biologie a été facilité par le recrutement en novembre 2004 d'une biologiste expérimentée dans ce domaine, Nejma Ameziane (2-4).

Tous les efforts ont été soutenus par la direction générale, la Commission Médicale d'Etablissement et la direction du pôle « Activités transversales », pôle regroupant le service de biologie, les urgences, la réanimation, le service de néphrologie-hémodialyse ainsi que ceux d'imagerie médicale et de pharmacie-stérilisation.

II - Présentation du centre hospitalier

Le centre hospitalier de Sens présente une capacité de 700 lits dont 340 en Médecine-Chirurgie-Obstétrique (MCO). Il comprend 3 sites distincts, dont 2 dévolus à l'activité moyens et longs séjours.

Le service de biologie réalise une activité polyvalente d'environ 25 M de B par an, seules les activités d'immuno-hématologie ne sont pas réalisées, mais transmises à l'Etablissement Français du Sang-Bourgogne Franche Comté (EFS-BFC). L'équipe comprend 3 ETP (équivalent temps plein) biologistes, 20 ETP techniciens et 3 ETP secrétaires.

III - Les moyens mis en œuvre

1. Définition du catalogue des actes

Le catalogue des actes a été déterminé par :

- l'étude des analyses transmises à notre principal prestataire biologiques externes, le laboratoire LCL (Ivry sur Seine, 94) ;

- les nécessités nouvelles de fournir aux cliniciens des résultats dans des délais les plus brefs pour une meilleure efficacité thérapeutique.

Dans le domaine infectieux, la biologie moléculaire est un outil précieux pour sa rapidité et sa sensibilité.

En effet, en bactériologie, l'obtention de résultats à partir de techniques classiques peut nécessiter plusieurs jours à plusieurs semaines, avec pour conséquence des diagnostics tardifs à l'origine de complications et/ou d'infections de l'entourage et/ou nosocomiales. En virologie, les techniques de cultures sont délicates, les sérologies peu informatives en cas d'infection récente et les recherches d'antigènes viraux peuvent manquer de sensibilité et de spécificité.

Ainsi, notre catalogue inclut dans le domaine infectieux :

- les recherches de *Chlamydiae trachomatis* ;
- les recherches de mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*) ;
- les recherches du bacille de la coqueluche (*Bordetella pertussis*) ;
- les recherches du cytomégalovirus (CMV) ;
- les recherches du parvovirus B19.

Dans le domaine de la génétique, les analyses sont les suivantes :

- les recherches des mutations de l'hémochromatose : mutations C282Y, H63D et S65C du gène HFE1 ;
- les mutations liées aux thromboses : mutation Q506R ou facteur V Leiden et mutation G20210A du facteur II ou prothrombine.

2. Les moyens techniques

La technique retenue devait être polyvalente pour l'ensemble des analyses et ne nécessiter que de légères modifications d'organisation.

La technique de PCR en temps réel s'est imposée :

NOTE 1

Distribution en
France : Labgene
Bât. Athena-Entrée 2
74160 Archamps
www.labgene.fr

les amplicons étant détectés au fur et à mesure de leur formation, l'étape de détection post PCR n'est plus nécessaire. Aussi, les tubes contenant les amplicons n'étant plus ouverts, les risques de contamination, redoutés en PCR classique, sont nuls.

Concernant l'équipement mis en oeuvre, notre choix s'est arrêté sur l'automate Rotor-Gene 3000 de la société Corbett Life Science (Sydney, Australie, voir note 1), en raison notamment de sa convivialité et de sa polyvalence. Cet appareil peut traiter jusqu'à 72 tubes simultanément incluant contrôles positifs, contrôles négatifs et contrôles internes. Il est utilisé avec des réactifs adaptés à chaque application et fournis par la société Qiagen (Qiagen, Amsterdam, Pays-Bas).

Des étapes préalables sont nécessaires :

- lyse cellulaire ;
- extraction de l'ADN.

L'étape de lyse cellulaire est réalisée sous une hotte à flux laminaire classiquement utilisée dans les services de biologie.

L'étape d'extraction de l'ADN est réalisée sur l'automate X-Tractor Gene (Corbett Life Science). Cet extracteur réalise une purification de l'ADN par chromatographie sur des membranes en fibre de verre. L'ensemble des opérations est automatisé, jusqu'à l'obtention de l'ADN à analyser. Le tube final reçoit les réactifs complémentaires (sonde, enzyme, contrôle interne) pour l'étape d'amplification et détection à l'aide du thermocycleur Rotor-Gene 3000. Au total, moins de quatre heures sont nécessaires pour l'obtention du résultat final.

3. L'organisation des locaux

Les risques de contamination étant maîtrisés, la réalisation des différentes étapes nécessaires à la réalisation des analyses n'implique que peu de contraintes :

- la préparation des réactifs est réalisée sous une hotte de paillasse, située dans une pièce dans laquelle aucun échantillon n'est jamais introduit ; cette pièce de seulement quelques mètres carrés était précédemment utilisée pour la réalisation de quelques prélèvements de patients externes ;
- la préparation des échantillons, et en particulier de lyse bactérienne, est réalisée sous la hotte utilisée quotidiennement en bactériologie pour le traitement des échantillons à fort risque de contamination ;
- l'extracteur X-Tractor Gene est installé au sein du laboratoire de biochimie, sans précaution particulière ;
- le thermocycleur Rotor Gene 3000 est placé dans une pièce sans particularité, située dans la partie technique du service, à usage de bureau et stockage (congélateur - 80°C).

Au final, aucune contrainte particulière n'a affecté l'organisation des locaux, sauf pour la préparation des réactifs de PCR, pour laquelle l'utilisation d'une salle de prélèvement non utilisée a été réaffectée.

4. Les investissements

Cette activité étant créée ex-nihilo, les investissements ont été importants avec l'acquisition de nombreux équipements :

- le petit matériel spécialement dédié à cette activité : pipettes diverses, un agitateur, une centrifugeuse... ;
- une hotte de paillasse ;
- un congélateur -80 °C compartimenté pour la conservation des prélèvements et de réactifs ;
- un extracteur d'ADN X-Tractor Gene ;
- un automate Rotor Gene 3000.

Au total, la valorisation de l'ensemble de l'équipement s'élève à environ 70 000 €.

L'activité est entièrement supervisée par le biologiste responsable de ce nouveau secteur. N'ayant pu obtenir de moyens humains supplémentaires, une optimisation du temps de travail des autres activités du service a dû être envisagée et le seul technicien affecté a été déployé par une restructuration interne de l'ensemble du pool technique. Le technicien a été formé en interne par le biologiste responsable et par des stages en externe.

IV - Le bilan de l'activité et perspectives

Sur une période de 18 mois, le service a pu répondre à de nombreuses demandes émanant des services cliniques et des consultations externes des médecins du centre hospitalier. Afin de développer cette activité, des contacts seront pris avec des structures externes (LABM privés et centres hospitaliers voisins) après la consolidation de notre production et le renforcement de notre équipe technique.

Nos délais de réponse varient de quelques heures à quelques jours pour les analyses non urgentes, notamment pour la génétique. Les délais constatés pour les analyses auparavant transmises ont été réduits de façon significative, par la suppression des temps de transport et d'acheminement et par la réalisation quotidienne de nombreux tests. A titre d'exemple, la recherche de mycobactéries ne nécessite que quelques heures alors que l'obtention du résultats de notre sous traitant nécessite au minimum 48 heures en période ouvrée.

Au total, ont été réalisées pendant cette période :

- 50 recherches de mutations du gène de l'hémochromatose ;
- 200 recherches de mutations du gène du facteur II ;
- 200 recherches de mutations du gène du facteur V ;
- 200 recherches de *Chlamydiae trachomatis* ;
- 500 recherches de *Mycobacterium tuberculosis* ;
- 15 recherches du bacille de la coqueluche ;
- 20 recherches de cytomégalovirus ;
- 10 recherches de parvovirus B19.

Le faible nombre de des trois dernières recherches est dû à une prescription moindre et surtout à leur mise au point récente.

Dans le domaine infectieux, le fait de disposer du panel d'analyses décrit a permis d'optimiser la prise en charge des patients. Ainsi, les recherches de *Mycobacterium tuberculosis* permettent l'instauration rapide de thérapeutiques anti-tuberculeuses précoces et la mise en place très réactives de mesures de précaution pour l'entourage des patients.

Mise en œuvre de la biologie moléculaire dans un laboratoire de biologie médicale : l'expérience du CH de Sens

Il apparaît encore aujourd'hui prématuré d'envisager une étude médico-économique précise de part l'impact encore fort des phases de mise au point. Néanmoins, le coût des consommables mandaté pendant cette période de référence est d'environ 40 000 €. L'évaluation devrait prendre en compte le service rendu aux patients et le différentiel entre nos coûts de revient et le prix facturé par notre prestataire externe.

Concernant les examens de génétique, le journal officiel du 30 mars 2007 a introduit un nouveau chapitre à la nomenclature des actes de biologie médicale : « *Diagnostic biologique des maladies héréditaires* » comprenant seulement la « *recherche de la mutation C282Y du gène HFE1* ». Ce point constitue assurément un signe fort en faveur du développement des analyses de génétique.

Sur le plan scientifique, la mise en place d'une activité de biologie moléculaire nous a conduit à prendre part à des études multi-centriques (6), par ailleurs indispensables dans le cadre de l'évaluation de la qualité.

De nouvelles analyses sont en cours de développement :

- recherche combinée des virus de la grippe A et B et VRS (virus respiratoire syncytial) : cette recherche sera effectuée par analyse « multiplex » avec 3 fluorophores spécifiques à chacune des 3 sondes spécifiques et nécessitera une étape préalable de transcription reverse pour générer une séquence d'ADN complémentaire des séquences ARN cible ;

- détection et quantification des légionelles dans les eaux, avec comme guide la norme XP T90-471 de l'Afnor et comme méthode comparative notre technique en culture réalisée selon la norme NF T90-431.

Là encore, une meilleure efficacité est attendue en terme de délai de prise de décision par rapport aux recherches d'antigènes viraux (sensibilité accrue) et de gestion des circuits d'eau (2 semaines sont nécessaires pour une recherche de légionelles négative et 3 jours minimum en cas de positivité).

D'autres analyses sont également envisagées, comme par exemple :

- le dépistage des staphylocoques résistant à la métiline ;

- les virus et bactéries responsables de méningites, comme notamment *Neisseria meningitidis*, bactérie pour laquelle la mise en évidence par microscopie optique peut se révéler délicate, la recherche des antigènes solubles peu sensible et la culture difficile.

V - Les contraintes liées à l'exercice de la biologie moléculaire en génétique

Si toute analyse de biologie médicale doit être réalisée conformément au GBEA, le Code de la Santé Publique formule des contraintes réglementaires pour tout acte de génétique.

1. Les conditions de prescriptions

Les conditions de prescription sont strictement définies par les articles R. 1131-1 à R. 1131-5.

La pratique des analyses de génétique ne peut être envisagée qu'après obtention du consentement libre et éclairé du patient ou le titulaire de l'autorité parentale pour un mineur. Ce consentement étant nécessairement écrit, il a fallu définir et diffuser auprès des prescripteurs un formulaire adapté (art. R. 1131-4).

La prescription ne peut avoir lieu que dans le cadre d'une consultation médicale individuelle et le médecin doit remettre au biologiste réalisant l'examen une attestation certifiant qu'il a informé le patient des caractéristiques de la maladie recherchée, des moyens de la détecter, des possibilités de prévention et de traitement (art. R. 1131-4).

De plus, la prise en charge par l'assurance maladie de la recherche de la mutation du gène de l'hémochromatose est soumise à des préalables :

- augmentation du coefficient de saturation de la transferrine (> 45 %) sans étiologie connue ;

- présence de signes cliniques, biologiques, d'imagerie ou d'histologie suggérant une hémochromatose ;

- dans le cadre d'étude familiale, seul peut être étudié le sujet ayant un parent porteur de la mutation à l'état homozygote, à l'exclusion des sujets mineurs et des mères ménopausées ou ne désirant plus avoir d'enfant.

Ces différents éléments nécessitent une concertation forte entre les prescripteurs et le biologiste, avec un engagement de responsabilité clairement défini au delà de la phase pré-analytique.

2. Les conditions de réalisation des examens de génétique

Les articles R. 1131-6 à R. 1131-13 précisent les « *conditions d'agrément et d'autorisation de la pratique des examens des caractéristiques génétiques d'une personne* ».

Les analyses de génétique ne peuvent être réalisées que sous la responsabilité d'un biologiste agréé. Cet agrément est délivré par arrêté préfectoral, après avis de la « *Commission consultative nationale en matière d'examens des caractéristiques génétiques à des fins médicales* ».

Un dossier complet a été présenté à cette commission ; il comprenait les titres et travaux du biologiste, les ressources techniques et humaines déployées et les objectifs. L'agrément a été obtenu par arrêté préfectoral en date du 4 avril 2006, avec un biologiste nommément désigné comme responsable, Nejma Améziane, et limité à l'étude des facteurs impliqués dans les thromboses et dans l'hémochromatose. Cette autorisation est accordée pour une durée de 5 ans renouvelables.

En conséquence de l'article R. 1131-7, seule cette biologiste est habilitée à signer les comptes rendus d'analyses : il ne peut être envisagé pour la validation ni délégation à un autre biologiste, ni,

a fortiori, au système de validation par ordinateur (VAO) mis en œuvre dans notre laboratoire, Valab (Erems, Flourens 31).

Des aménagements spécifiques du paramétrage de notre système de gestion de laboratoire (SGL), Galaxie (Agfa HealthCare, Lognes 77) ont dus être réalisés à ces fins.

3. Les conditions de communication des résultats

L'article R. 1131-14 précise que le compte rendu d'analyse, commenté et signé par le biologiste responsable doit être adressé exclusivement au prescripteur des examens génétiques, qui lui-même ne doit communiquer les résultats qu'à la personne concernée, ou le titulaire de l'autorité parentale si le patient est mineur. La personne concernée peut refuser que les résultats lui soient communiqués.

Ces conditions de communication ont également eu un impact sur notre système d'information : les résultats des analyses étant diffusés via notre serveur de résultats intranet (SRI Global, Agfa HealthCare) et le système de gestion du dossier patient (Actipidos, Ares, Les Ulis 91), des précautions ont donc été prises pour que seuls les utilisateurs autorisés aient accès à ces informations (7).

4. Les conditions de conservation des documents

Si le GBEA précise les modalités de conservation des archives, l'article R. 1131-15 impose des conditions plus drastiques pour les biologistes réalisant des examens de génétique. Ainsi, les consentements, les prescriptions, les comptes rendus et leur commentaire explicatif doivent être conservés pendant une durée de trente ans.

Des contraintes similaires s'appliquent également au prescripteur et son dossier médical.

De plus, considérant l'article L 1148-28 du CSP qui dispose que « *les actions tendant à mettre en cause la responsabilité des professionnels de santé ou des établissements de publics ou privés à l'occasion d'actes de prévention, de diagnostic ou de soins se prescrivent par dix ans à compter de la consolidation de dommage* », les procédures d'archivages

ont été spécifiquement redéfinies, tant pour les documents papier que les fichiers électroniques (SGL, SRI, fichiers informatiques du thermocycleur).

Afin d'optimiser les procédures d'archivage, nous envisageons lors du déploiement prochain de notre nouveau SGL (Hexalis, Agfa HealthCare) l'utilisation d'une GED (gestion électronique de documents) pour tous les documents papiers qui seraient alors scannés, avec duplication sur plusieurs supports informatiques.

VII - Conclusion

Le développement de la technique de PCR en temps réel et son automatisation permet à des laboratoires de biologie polyvalente et non spécialisée d'accéder à une nouvelle approche de la biologie.

L'efficacité diagnostique, objectivée par la sensibilité, la spécificité et les délais de rendu des résultats constitue un atout important expliquant et favorisant le développement actuel de la biologie moléculaire au sein des laboratoires.

Au niveau technique, la PCR en temps réel possède également plusieurs atouts clés qui permettent aux utilisateurs de s'affranchir des contraintes qui freinent la pratique de la PCR classique. Toutefois, l'exigence d'un encadrement biologique spécifiquement compétent persiste.

Le catalogue d'analyse caractérisant notre activité recouvre à la fois des analyses de microbiologie et des recherches de mutations génétiques.

Afin de pouvoir pratiquer les analyses de génétique humaine, l'agrément attribué à un biologiste est un préalable indispensable ; il implique le respect de nouvelles contraintes réglementaires, avec en conséquence la révision et la définition de procédures depuis la prescription médicale jusqu'au rendu des résultats.

Si une parfaite maîtrise technique de l'ensemble de la chaîne biologique est primordiale, le développement du dialogue et de la coopération avec les prescripteurs et les cliniciens constitue également un élément essentiel pour la réussite de cette évolution du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. Journal officiel du 11 décembre 1999.

(2) AMEZIANE N., BOGARD M., LAMORIL J., Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Campus référence. Elsevier. 2005

(3) LAMORIL J., BOGARD M., AMEZIANE N., DEYBACH JC, BOUIZEGARENE P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007, *généralités, partie 1. Immuno-analyses et biologie spécialisée*, 2007, 22, 5-18.

(4) LAMORIL J., BOGARD M., AMEZIANE N., DEYBACH JC, BOUIZEGARENE P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007, *les applications et leur avenir, partie 2. Immuno-analyses et biologie spécialisée*, 2007, 22, 73-94.

(5) Décision du 24 janvier 2007 relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie. Journal officiel du 30 mars 2007.

(6) AMEZIANE N., LAMORIL J., BOGARD M., KAISER T., BOUIZEGARENE P., GUIET P., ERBA G., TRICHET C., GOURLIN N., HERVE C., Factor V Leiden (G1691A) and prothrombin (G20210A) genotyping by high-resolution melt analysis (HRM) and Syto 9 fluorescent dye on the Rotor-Gene 6000 HRM device. Poster présenté au Congrès de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Genève le 8 juillet 2007.

(7) HERVE C., AMEZIANE N., FOURRE M., FERNANDEZ J., Intégration de la biologie clinique au dossier médical hospitalier, l'exemple du CH de Sens. *Spectra Biologie*, 2005, 144, 40-44.