



11-13
SEPT.
2024

LILLE
GRAND PALAIS

CONGRÈS FRANÇAIS d'HÉMOSTASE



Université
Paris Cité



Apport du séquençage gène entier
pour l'exploration
des déficits constitutionnels en protéine C

Laetitia MAUGE – 12 septembre 2024

Université Paris Cité – Hématologie biologique HEGP

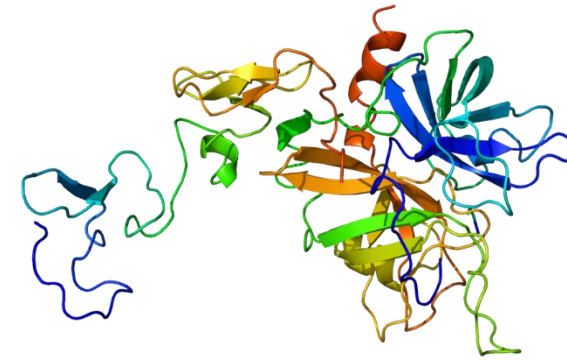
Université Lyon 1 – Génétique de l'Hémostase GH-Est HCL



Introduction : Les déficits en protéine C

Le déficit en protéine C :

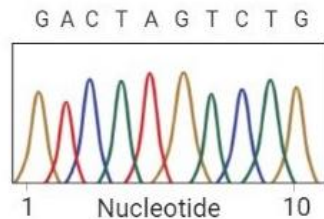
- Augmentation du risque thrombotique (Di Minno *et al*, Thromb Res 2015)
- Déficits quantitatifs et qualitatifs
- Dépistage basé sur des tests plasmatiques :
→ mesure de l'activité de la protéine C activée



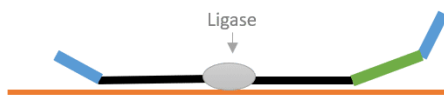
Place de l'exploration génétique : confirmer l'origine constitutionnelle et proposer une enquête familiale

Introduction : Les déficits en protéine C

Séquençage des exons et des régions flanquantes de *PROC* par méthode Sanger



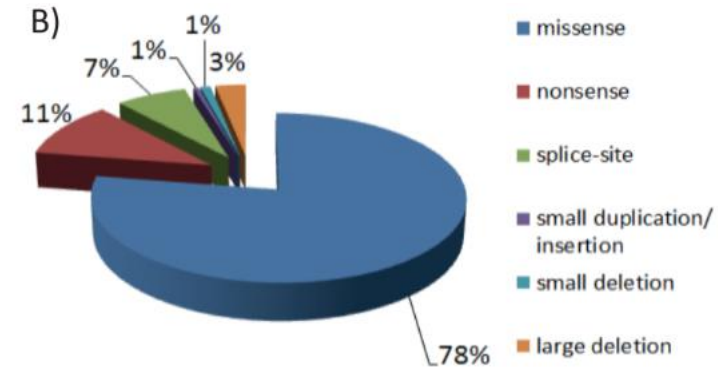
Recherche de grand réarrangement génique par MLPA
(*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)



PROC, 2q13-2q14, 9 exons, 10,8 kb → >400 variants



Caspers *et al*, TH 2012



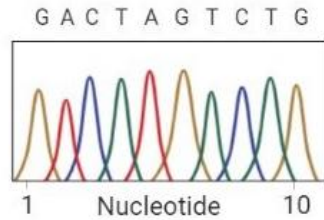
➔ Entre 10-30% des déficits non expliqués

Hypothèse :

Variants dans les régions introniques de *PROC*
(Vaz Drago *et al.* 2017, Hall *et al.* 2024)

Introduction : Les déficits en protéine C

Séquençage des exons et des régions flanquantes de *PROC* par méthode Sanger

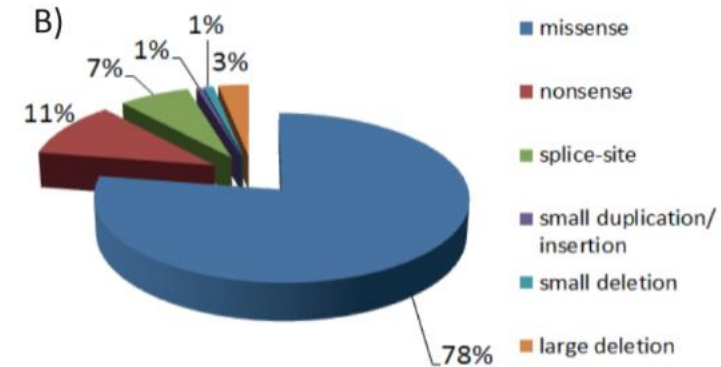


- Recherche de grand

PROC, 2q13-2q14, 9 exons, 10,8 kb



Caspers *et al*, TH 2012

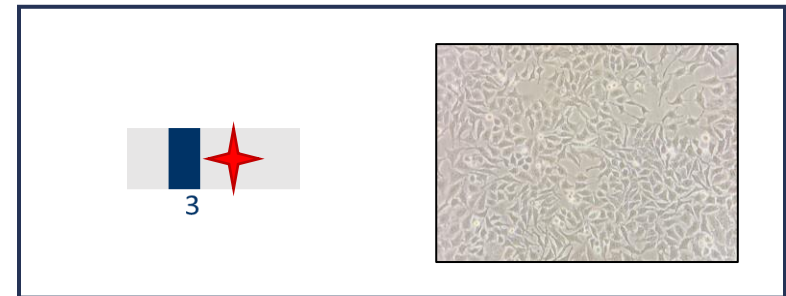
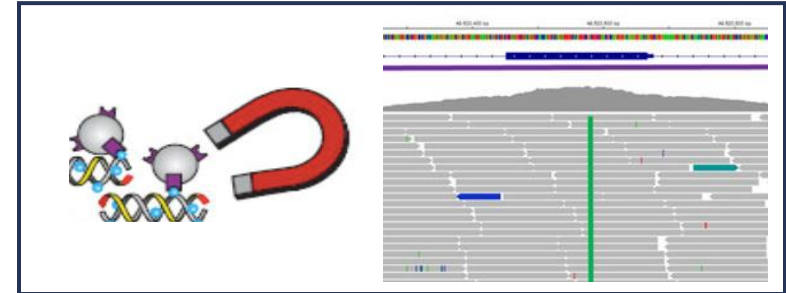


Objectif

Séquencer le gène *PROC* entier par NGS après enrichissement par capture chez des patients ayant un déficit en protéine C non expliqué par les explorations usuelles.

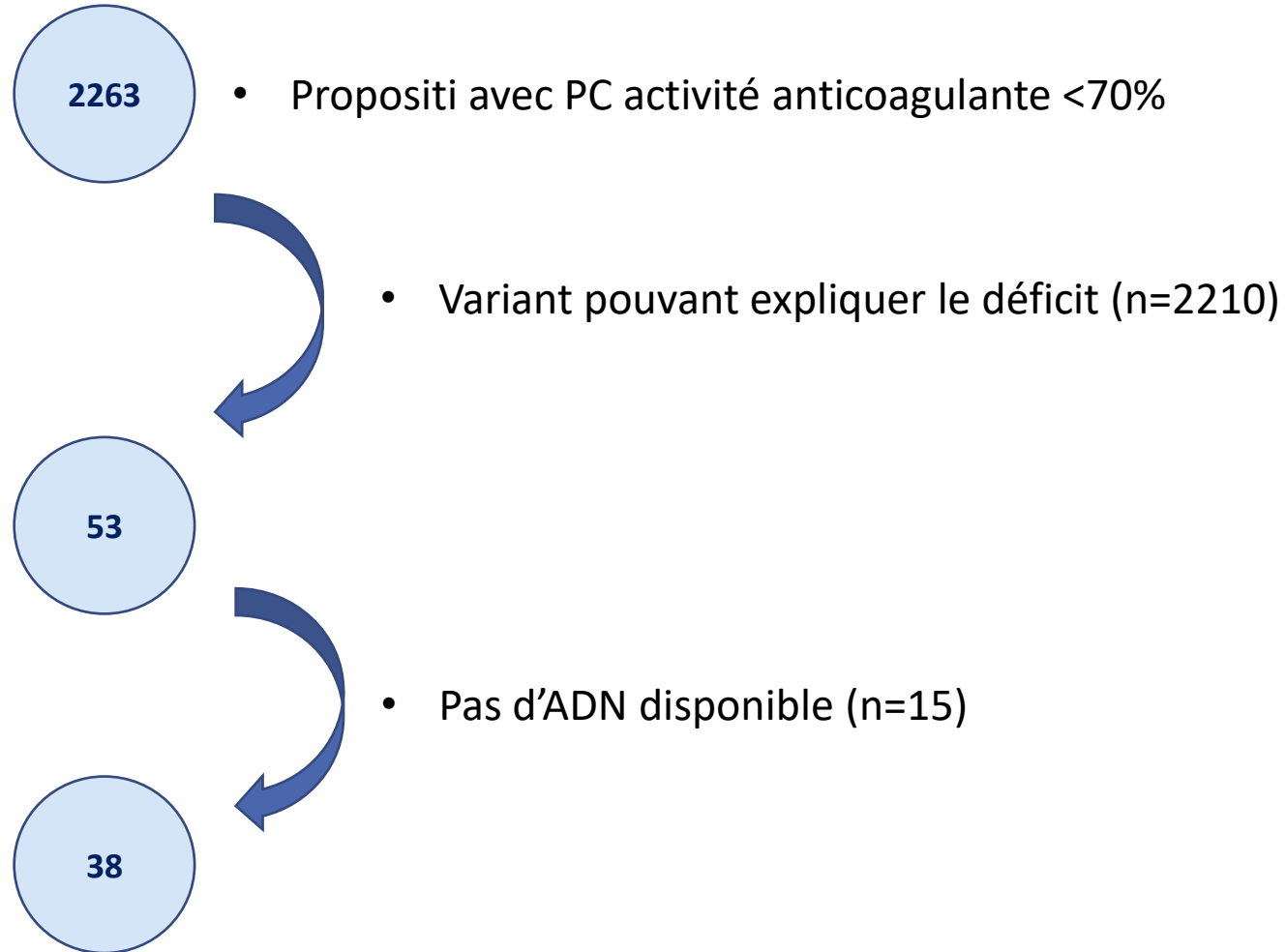
Méthodologie

- Patients avec étude du gène PROC entre 2000 et 2020 pour suspicion de déficits en protéine C (CHU HEGP et Bordeaux)
 - Cas index avec PC activité <70%
 - Pas de variant pour expliquer le déficit
 - Cause acquise ou interférence exclus
- Etude du gène PROC entier
 - séquençage NGS après capture (Twist/Roche/Illumina) (couverture à 99,2%)
 - confirmation des variants par :
 - PCR spécifiques des points de cassure → variants de structure
 - séquençage Sanger → substitution
- Evaluation de l'impact des substitutions introniques sur l'épissage :
 - Prédiction *in silico* : MaxEntScan et SpliceAI
 - Etude fonctionnelle des variants introniques par minigène
- Prédiction de la pathogénicité selon les critères ACMG-AMP (Richards *et al. Genet Med* 2015)



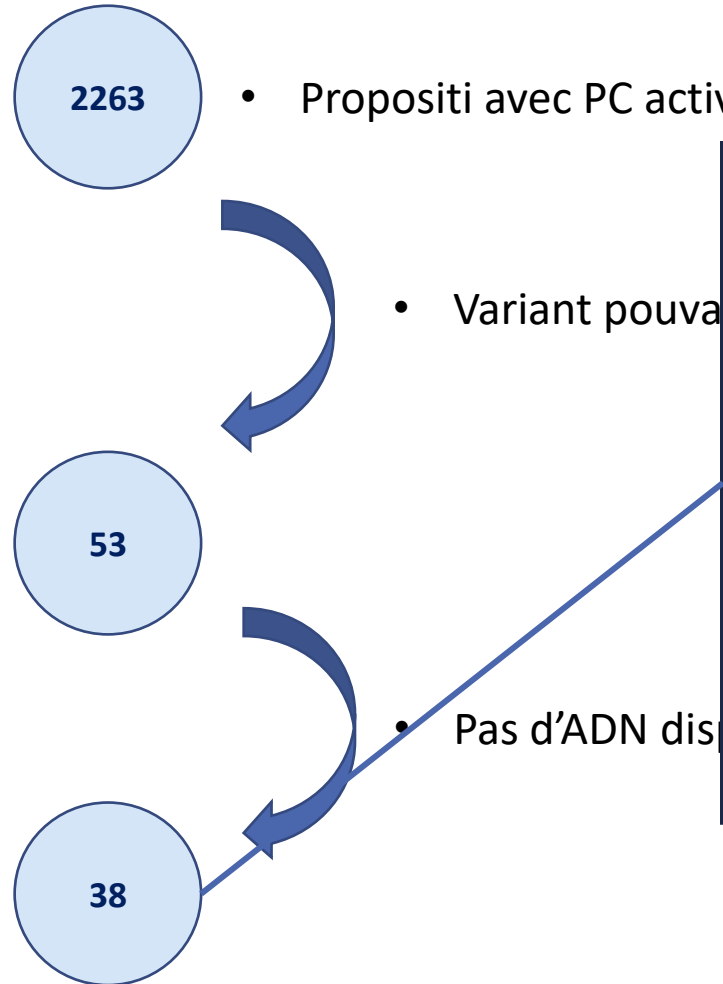
Résultats : population de l'étude

Entre 2000 et 2020 :



Résultats : population de l'étude

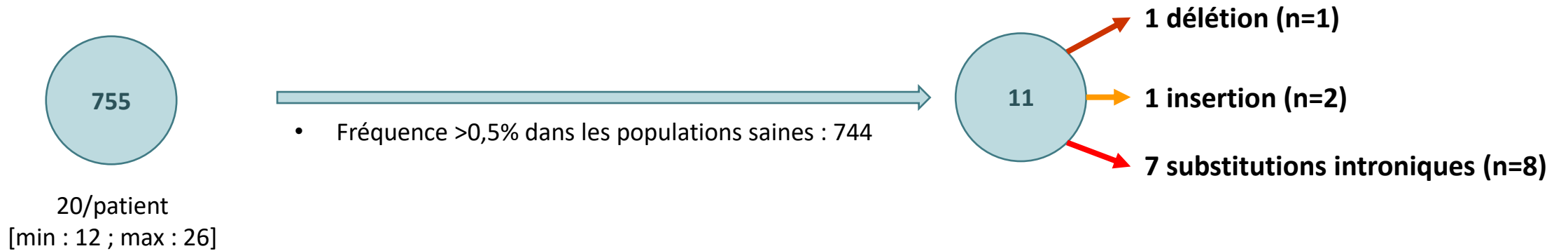
Entre 2000 et 2020 :



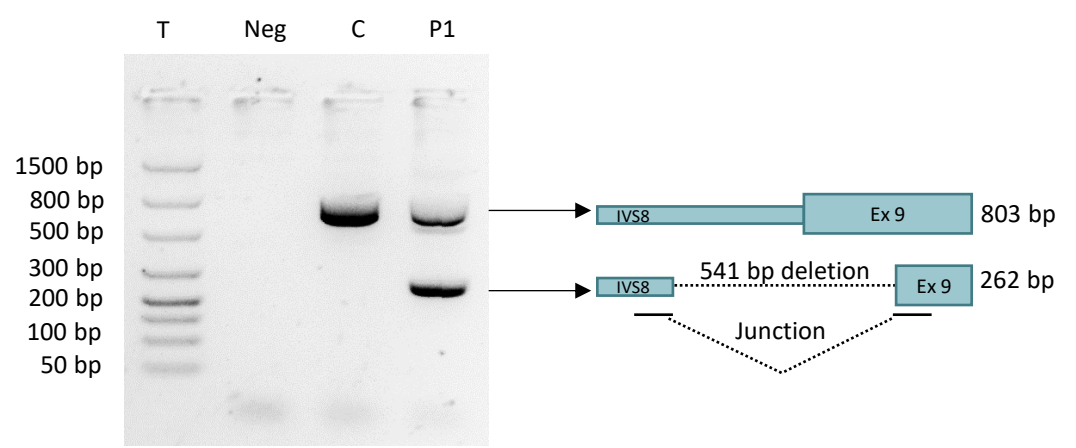
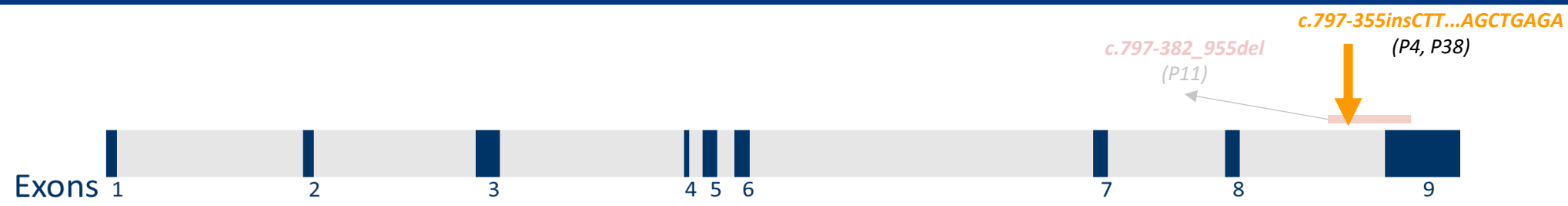
Caractéristiques des patients :

- Hommes : 39,5 %
- Age médian au moment du génotypage : 38 ans [IQR: 28-46]
- Histoire thrombotique personnelle : 23 patients (60,5 %)
- Histoire thrombotique familiale : 11 (28,9%)
- PC activité : 55% [42-62] ; PC antigène : 58% [46-62]

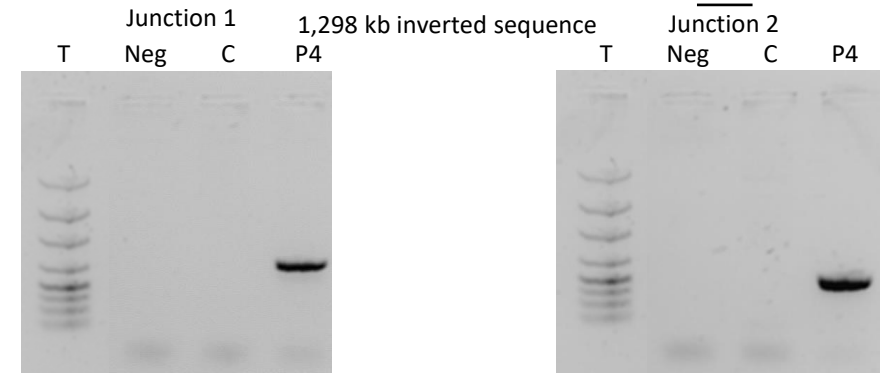
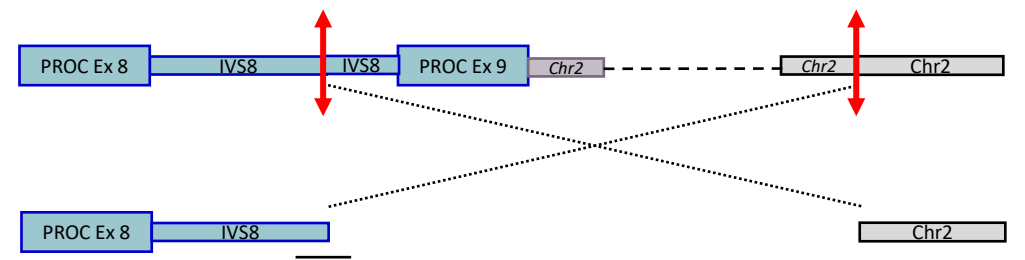
Résultats : NGS



Résultats : variants de structure

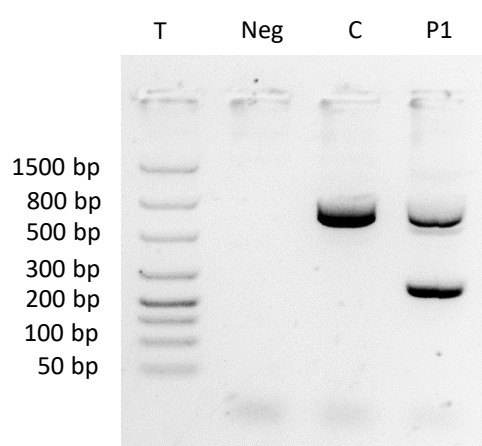
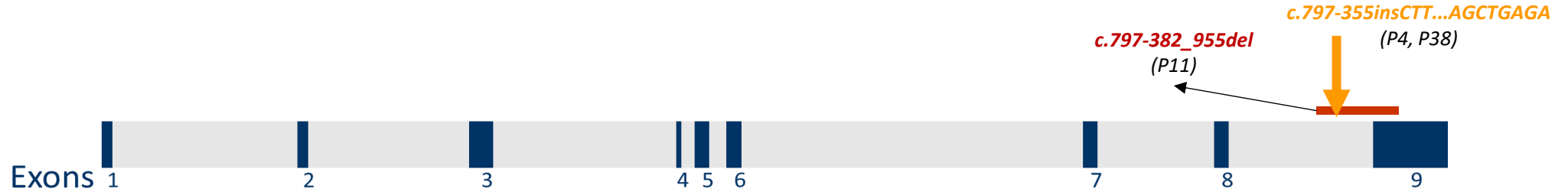


→ c.797-382_955del
(chr2:127427975_127428515del)

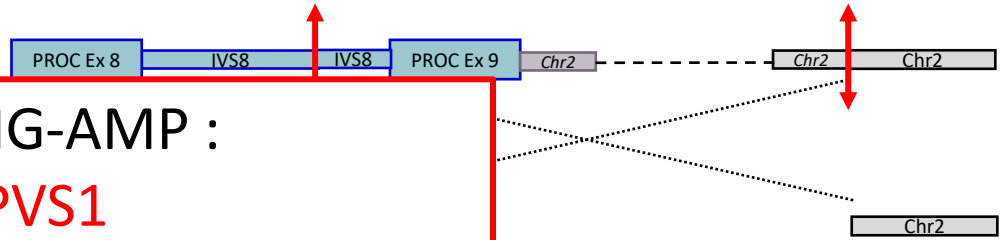


→ c.797-355insCTT...AGCTGAGA
(chr2:127428011_128726404inv)

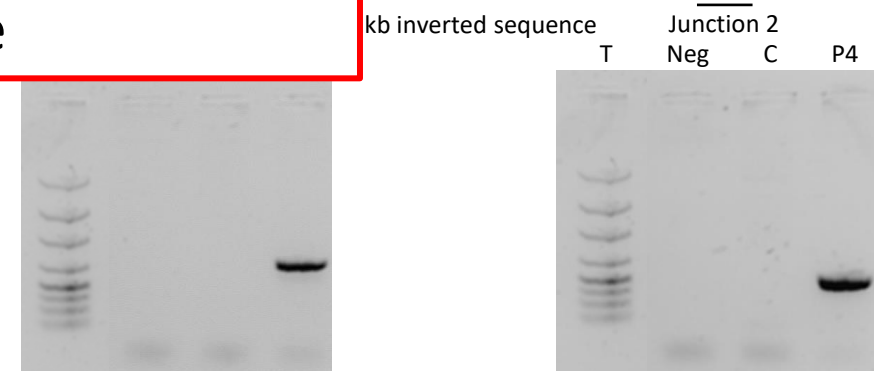
Résultats : variants de structure



Classification ACMG-AMP :
PM2 + PP4 + PVS1
 Classe 5 : pathogène

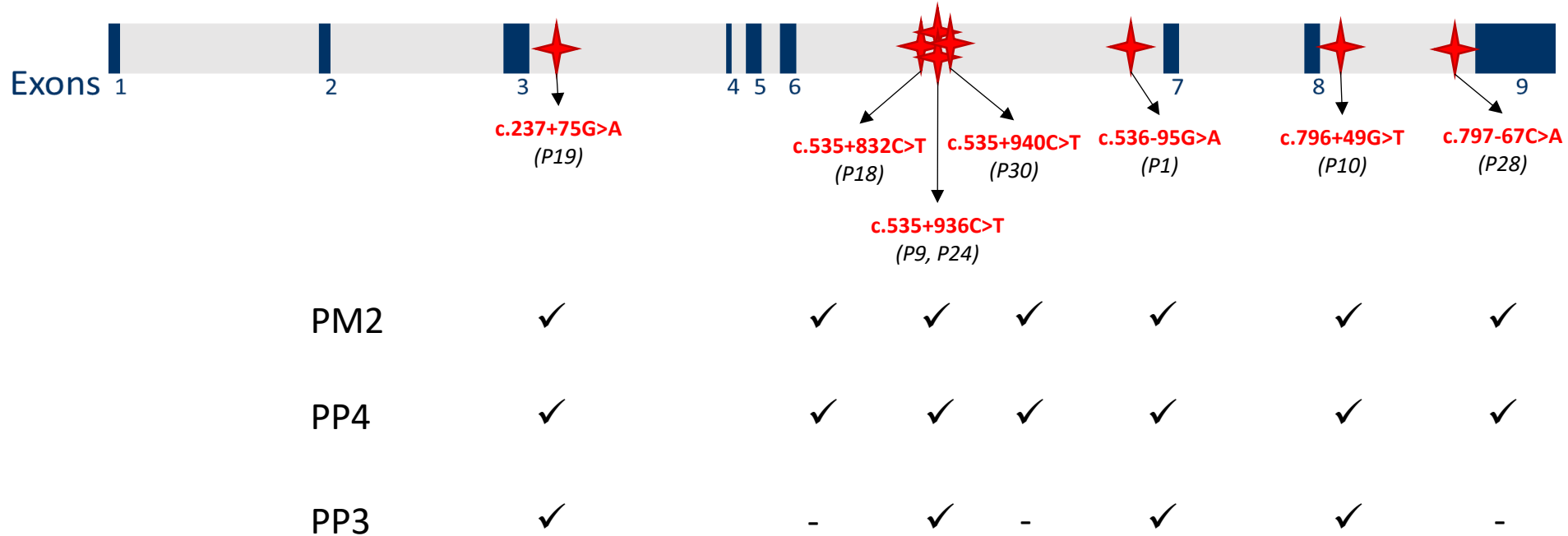


→ c.797-382_955del
 (chr2:127427975_127428515del)



→ c.797-355insCTT...AGCTGAGA
 (chr2:127428011_128726404inv)

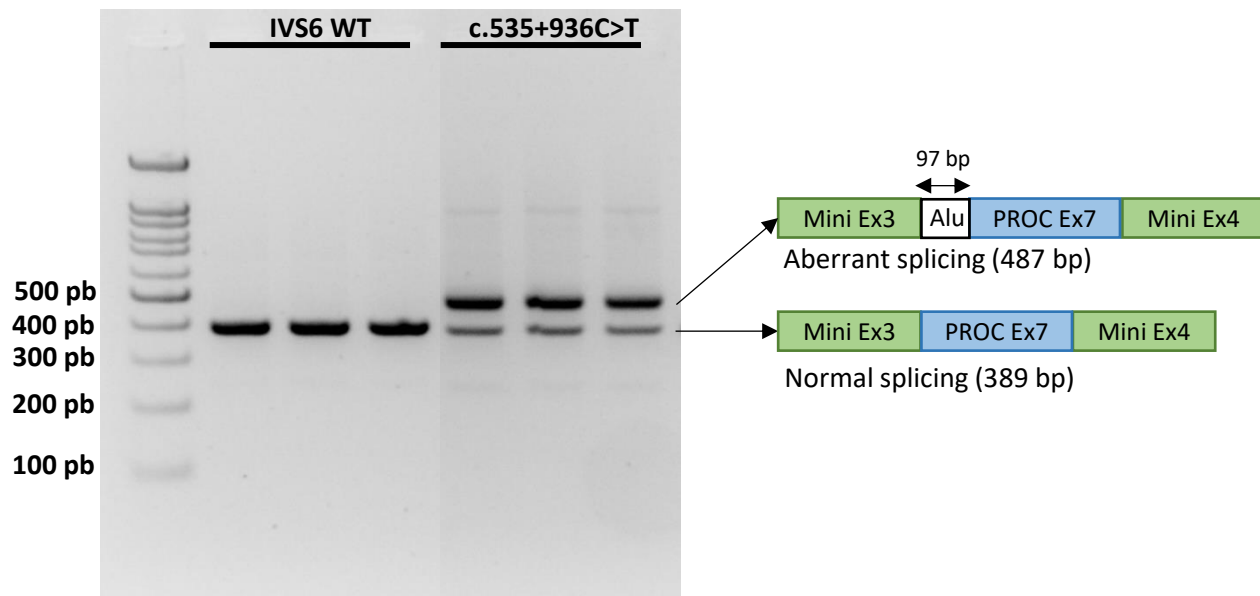
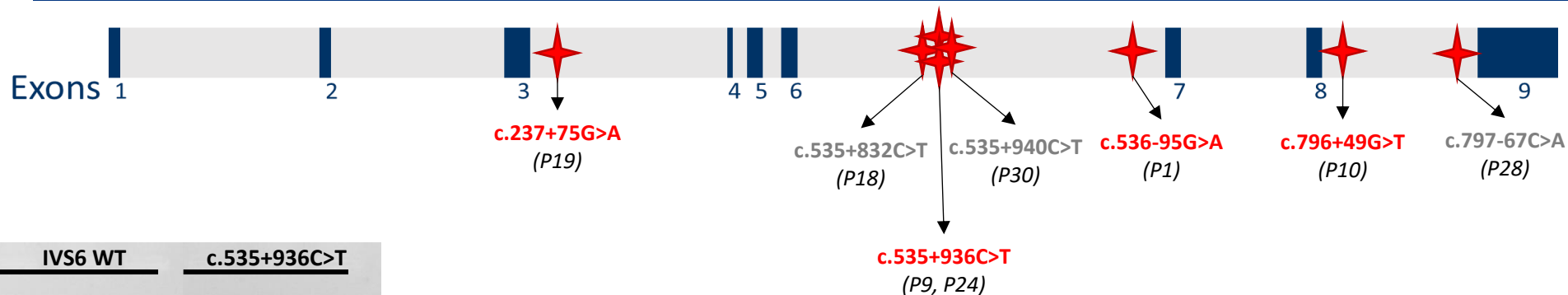
Résultats : substitutions introniques



Classification ACMG-AMP :
Classe 3 : signification indéterminée

PM2 : fréquence allélique <0,002 dans les populations contrôles (GnomAD v.4.1)
PP4 : phénotype plasmatique évocateur d'un déficit
PP3 : prédictions *in silico* en faveur d'un effet sur l'épissage avec les deux logiciels

Résultats : analyse fonctionnelle

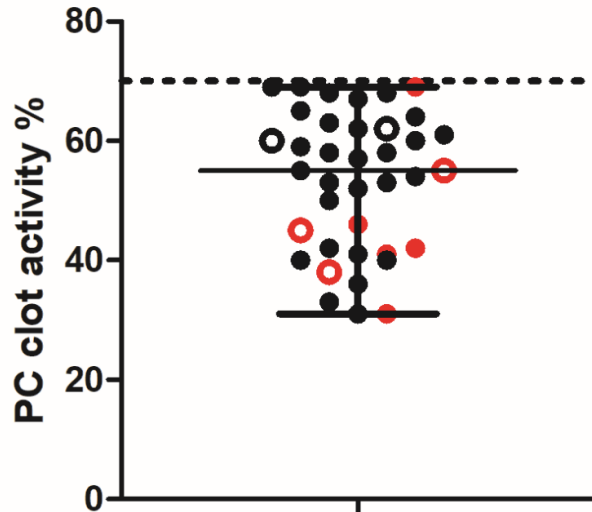
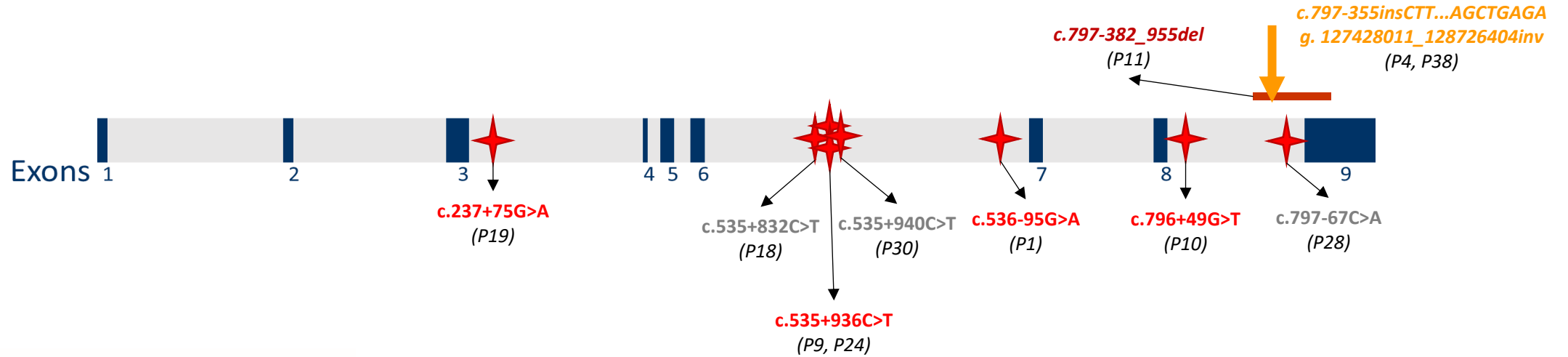


+PS3
analyse fonctionnelle démontrant
l'effet du variant sur l'épissage

Classification ACMG-AMP :
4 variants / 7
Classe 4 : probablement pathogène

Création d'un site donneur GT en c.535+934
→ Exonisation d'une séquence Alu de 97nt, p.(Val179Glyfs*29)

Conclusion - Perspectives



Explication du déficit chez 8 patients/38 (21%)

→ séquençage gène entier augmente le taux de résolution

Conclusion - Perspectives

Exploration du gène entier par NGS :

- Mise en évidence des variants de structure (points de cassure dans les régions introniques)
→ 1^{ère} observation d'une inversion dans le gène *PROC*
- Identification de variants introniques profonds
- Permet de pallier les limites du Sanger et du MLPA

Analyse fonctionnelle en minigène :

- A permis de démontrer un effet de variants introniques profonds sur l'épissage et notamment 1^{ère} description d'une exonisation d'une séquence Alu dans le gène *PROC*

Perspectives :

- 30 cas encore non expliqués → étude de ségrégation, autre technique?, étude d'autres gènes ?

Remerciements



HEGP – Université Paris Cité

Pr Dominique Helley
Dr Sophie Gandrille
Carla Rial
Isabelle Présot
Sébastien Bertil



Dr Clarisse Billon
Annabelle Venisse
Karine Auribault
Eric Clauser



Ambroise Paré – UVSQ



Pr Philippe De Mazancourt

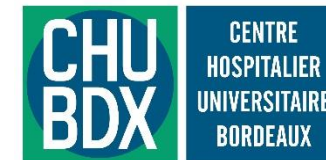
GH-Lyon Est – Université Lyon 1

Pr Yessim Dargaud
Pr Christine Vinciguerra
Dr Yohann Jourdy
Stéphanie Delorme



CHU Bordeaux

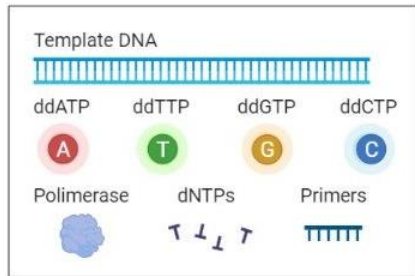
Dr Sylvie Colomer



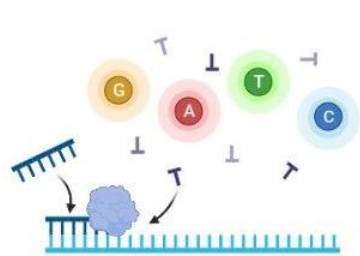
Principe SANGER et MPLA

Séquençage SANGER :

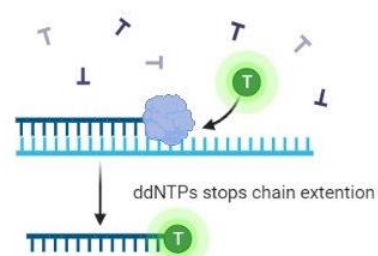
Reagents



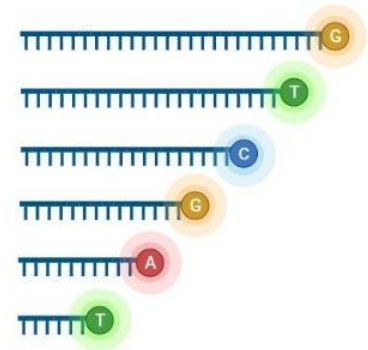
① Primer annealing and chain extension



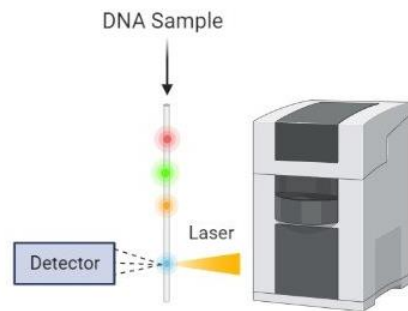
② ddNTP binding and chain termination



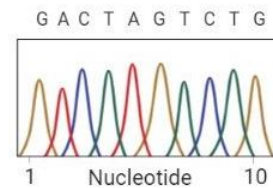
③ Fluorescently labelled DNA sample



④ Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection

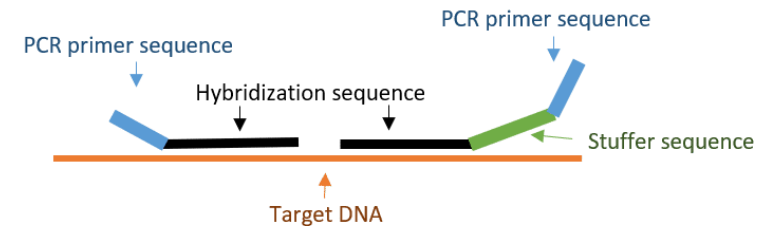


⑤ Sequence analysis and reconstruction

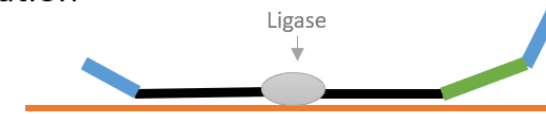


MLPA :

1 – Denaturation; 2 – Hybridization



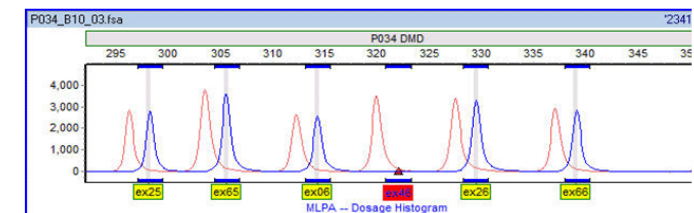
3 – Ligation



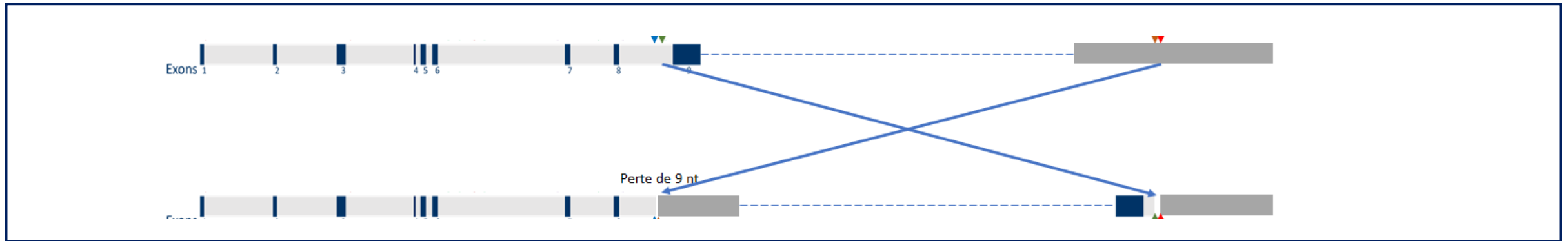
4 – Amplification



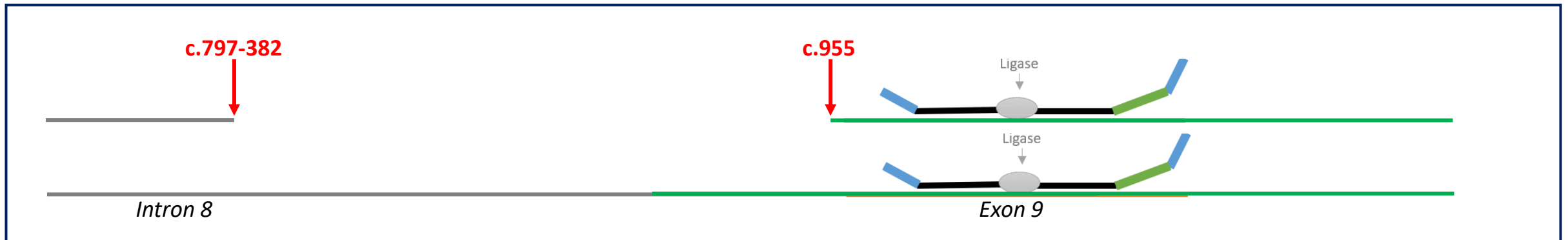
5 – Fragment separation and Data analysis



Identification de variants de structure



➔ Dont les points de cassure sont présents dans les zones introniques sans variation de nombre des zones exoniques

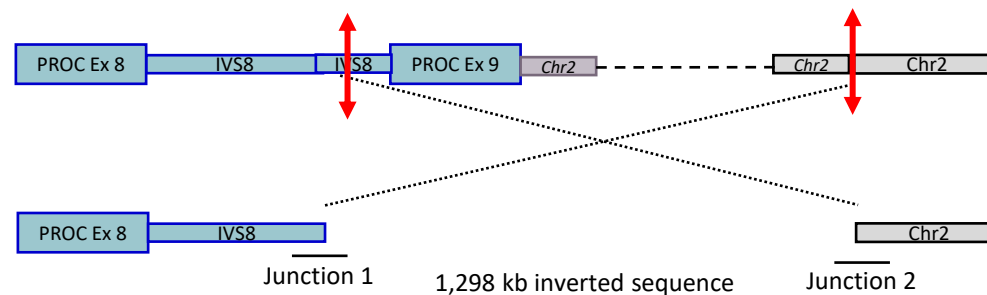
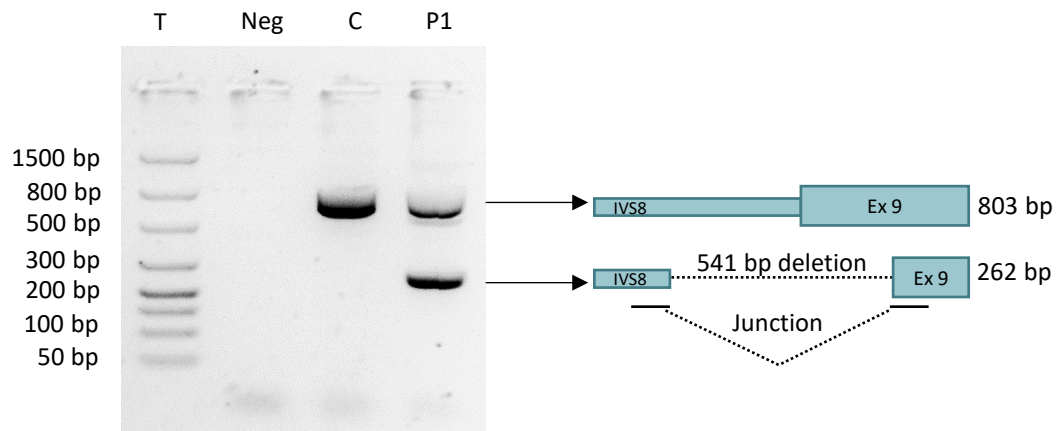
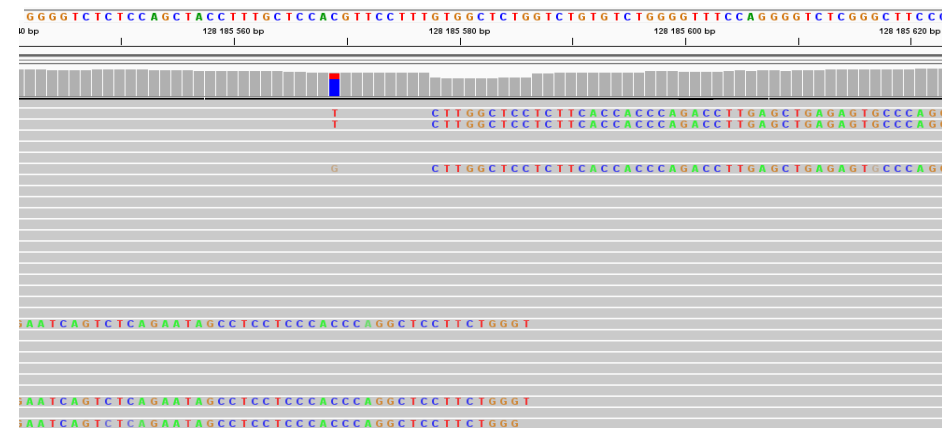
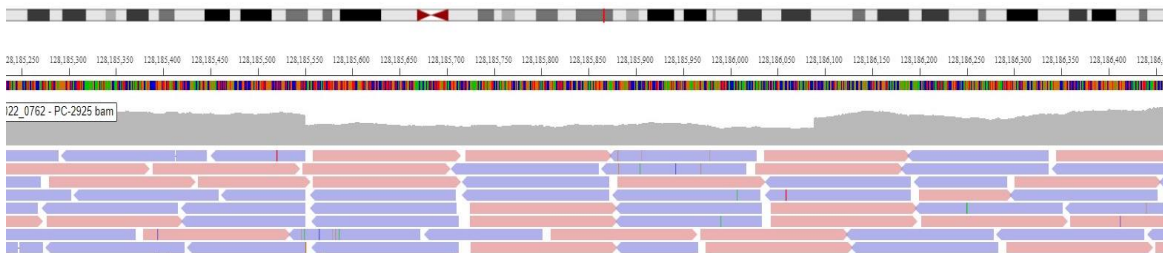


➔ Non détectable avec le MLPA

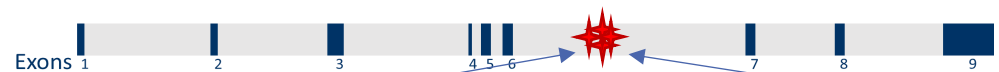
Résultats : variants de structure

c.797-382_955del
 (chr2:127427975_127428515del)

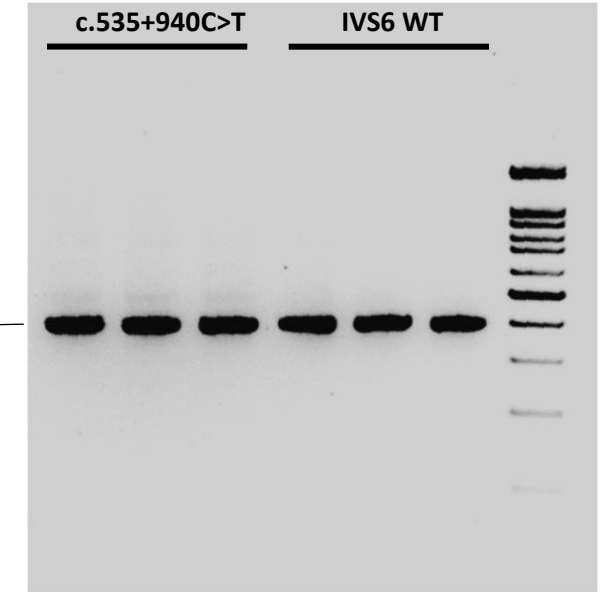
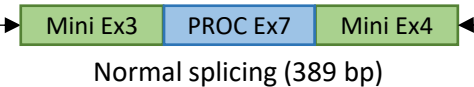
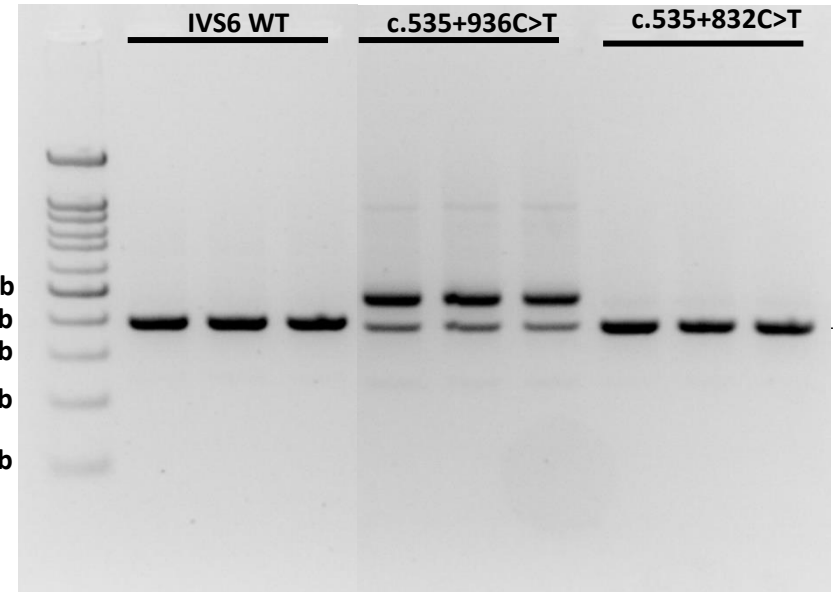
c.797-355insCTT...AGCTGAGA
 (chr2:127428011_128726404inv)



Résultats : substitutions introniques



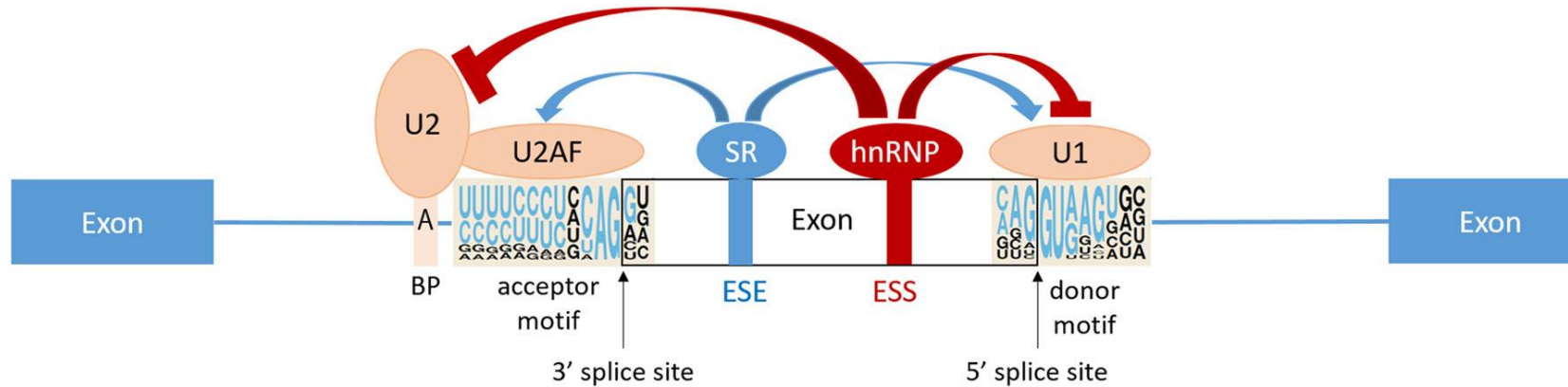
c.535+832C>T (P18) **c.535+936C>T** (P9, P24) **c.535+940C>T** (P30)



Pas d'effet des variants c.535+832C>T et c.535+940C>T sur l'épissage

REF Alu Sp	<i>CTTTCAGGGAAC</i> TTTCTTTTTTTCTTTTTTTT <i>ACTCTTGTTGT</i> CC <i>CAGGCTGGAGTGCAATGACGTGATCTCAGCTCACCACAACCTCCGCTCCTGGATTCAAGCGATTCTCTGCCGCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGG</i> CATGCGCCA
c.535+832C>T	<i>CTTTCAGGGAAC</i> TTTCTTTTTTTCTTTTTTTT <i>ACTCTTGTTGT</i> T <i>C</i> CAGGCTGGAGTGCAATGACGTGATCTCAGCTCACCACAACCTCCGCTCCTGGATTCAAGCGATTCTCTGCCGCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCGCCA
c.535+936C>T	<i>CTTTCAGGGAAC</i> TTTCTTTTTTTCTTTTTTTT <i>ACTCTTGTTGT</i> C <i>C</i> CAGGCTGGAGTGCAATGACGTGATCTCAGCTCACCACAACCTCCGCTCCTGGATTCAAGCGATTCTCTGCCGCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTATGCGCCA
c.535+940C>T	<i>CTTTCAGGGAAC</i> TTTCTTTTTTTCTTTTTTTT <i>ACTCTTGTTGT</i> C <i>C</i> CAGGCTGGAGTGCAATGACGTGATCTCAGCTCACCACAACCTCCGCTCCTGGATTCAAGCGATTCTCTGCCGCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGTGCCA

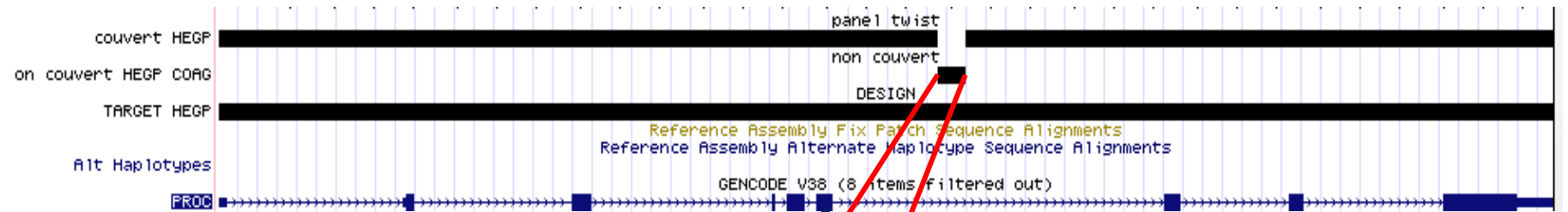
Deep intronic mutations and human disease



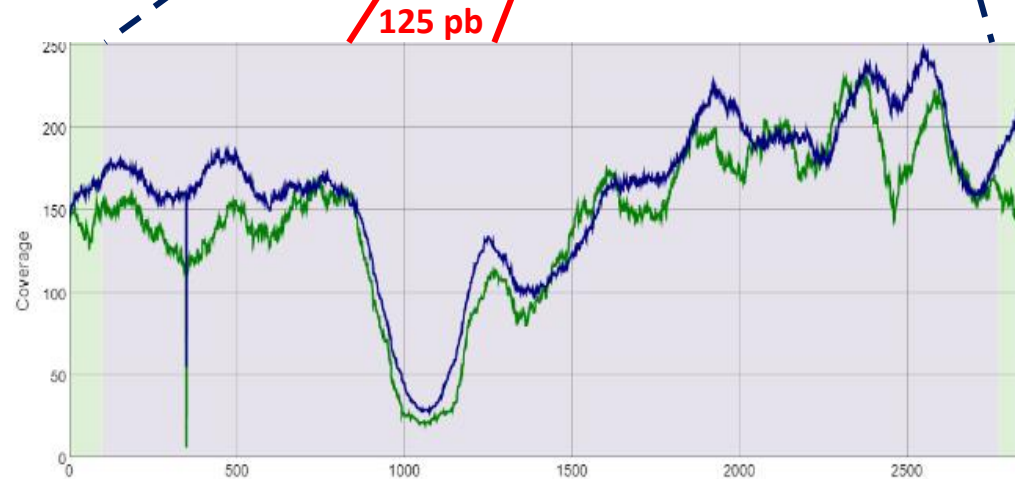
- Facteurs pouvant modifier la reconnaissance des séquences consensus par le spliceosome :
 - Liaisons des protéines de régulation du spliceosome au pre-mRNA
 - Formation des structures secondaires du pré-mRNA
 - Taux d'élongation transcriptionnelle par la Pol II
 - Modification épigénétique
- Mécanismes de pathogénicité des introns mis en évidence :
 - Inclusion de pseudo-exons
 - Compétition avec les sites d'épissage classiques (le + svt si <150 pb des jonctions introns-exons)
 - Interruption d'un motif de régulation de la transcription
 - Inactivation de gènes ARN non codants
 - Réarrangements génomiques

Couverture du gène PROC

Gène PROC complet



- Profondeur moyenne de 340X (IQR : 328-350)
- Couverture à 99,2%
- % de bases avec un score >Q30 >90%



intron 6 de *PROC*

Résultats : substitutions introniques

Patients	HGVS cDNA NM_000312 (genomic position, GRCh38)	Status	Intron	Allele frequency GnomAD, %	In silico analysis		Criteria of pathogenicity (ACMG)	Clinical Significance
					MaxEntScan (MES)	Splice AI		
P19	c.237+75G>A (chr2:127421524G>A)	heterozygous	3	not referenced	DSS gain at c.237+72 (6.92 > 9.46 ; +37%)	DSS gain at c.237+72 (0.57)	PM2 + PP4 + PS3	Likely pathogenic
P18	c.535+832C>T (chr2:127424240C>T)	heterozygous	6	not referenced	ASS gain at c.535+837 (7.86 > 9.28 ; +18%)	ASS gain at c.535+837 (0.43)	PM2 + PP4	uncertain significance
P9, P24	c.535+936C>T (chr2:127424344C>T)	heterozygous	6	not referenced	DSS gain at c.535+934 (9.37)	DSS gain at c.535+934 (0.63) ASS gain at c.535+837 (0.64)	PM2 + PP4 + PS3	Likely pathogenic
P30	c.535+940C>T (chr2:127424348C>T)	heterozygous	6	0.0399	No impact	No impact	PP4	uncertain significance
P1	c.536-95G>A (chr2:127425990G>A)	heterozygous	6	not referenced	ASS gain at c.536-93 (2.86)	ASS gain at c.536- 93 (0.73)	PM2 + PP4 + PS3	Likely pathogenic
P10	c.796+49G>T (chr2:127427271G>T)	heterozygous	8	not referenced	DSS gain at c.796+43 (4.66 > 6.86 ; +47%)	DSS gain at c.796+43 (0.57)	PM2 + PP4 + PS3	Likely pathogenic
P28	c.797-67C>A (chr2:127428290C>A)	heterozygous	8	not referenced	No impact	No impact	PM2 + PP4	uncertain significance

PM2 : fréquence allélique <0,002 dans les populations contrôles (GnomAD v.4.1)

PP4 : phénotype plasmatique évocateur d'un déficit

PP3 : prédictions *in silico* en faveur d'un effet sur l'épissage avec les deux applications utilisées

Résultats : NGS

755

20/patient
 [min : 12 ; max : 26]



- Fréquence >0,5% dans les populations saines : 744

11

9 variants chez 11 patients

1 insertion (n=2)

1 délétion (n=1)

7 substitutions introniques (n=8)

