

PROTÉINE C PAR SÉQUENÇAGE (CODE 20070)

Avis d'évaluation

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine.

1.2 Date de demande d'examen : 1^{er} janvier 2011.

1.3 Date de transmission de l'avis au ministre : 12 avril 2013.

Mise en garde :

Le présent avis est fondé sur les informations scientifiques et commerciales [déposées par le(s) demandeur(s) ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire] selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE(S)

2.1 Nom de la technologie

Analyse mutationnelle du gène de la protéine C (*PROC*) par séquençage.

2.2 Description brève de la technologie

Le séquençage par la méthode conventionnelle (aussi appelée méthode didésoxy) requiert six étapes : 1) choix d'une amorce spécifique complémentaire à un seul brin d'une matrice d'ADN amplifiée (PCR ou RT-PCR), 2) incubation de la matrice, de l'amorce et de l'ADN polymérase en présence de désoxynucléotides (dNTP) non marqués et de didésoxy nucléotides (ddNTP) marqués d'un fluorophore unique, 3) polymérisation jusqu'à l'incorporation d'un ddNTP qui termine la polymérisation de chaque molécule de façon aléatoire, 4) purification des polymères de tailles différentes selon le poids moléculaire par électrophorèse en capillaire, 5) excitation du fluorophore terminal de chaque fragment au moyen d'un laser qui parcourt le capillaire sur toute sa longueur, 6) lecture et interprétation de la séquence en fonction des signaux de fluorescence émis (appel des bases) [Wilson *et al.*, 1990].

Figure 1 Représentation schématique du séquençage par la méthode didésoxy

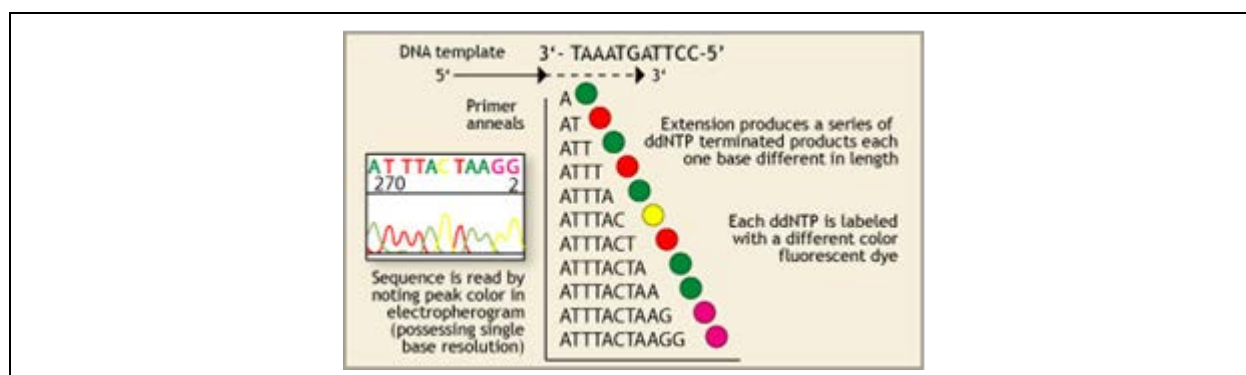


Image gracieusement fournie par National Forensic Science Technology Center, from NIJ's DNA analyst training program (Figure tirée du site Web de la NFSTC, disponible à : http://projects.nfstc.org/gallery/main.php?g2_itemId=3566).

2.3 Société ou développeur

Protocole maison utilisant les trousse d'essai et l'analyseur suivants¹ :

- Quick gene mini 80 (Autogen);
- Ampli Taq Gold (Invitrogen);
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies);
- ABI 3100-avant (Applied Biosystems).

2.4 Licence(s) : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Les trousse d'essai et systèmes mentionnés n'ont pas été repérés dans la Liste des instruments médicaux homologués (MDALL) de Santé Canada.

2.7 Valeur pondérée : 563,0.

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Dépistage familial chez les personnes avec une histoire de thrombophilie familiale. L'analyse est particulièrement utile pour le diagnostic prénatal puisque les sujets avec une déficience grave ont une condition peu compatible avec la vie et le traitement de remplacement nécessite des injections presque quotidiennes de concentré de protéine C, dont le coût annuel serait de 1 000 000 \$ pour un adulte (selon les informations du demandeur).

3.2 Description de la ou des maladies visée(s)

La protéine C est une glycoprotéine dépendante de la vitamine K qui joue un important rôle régulateur de la coagulation sanguine grâce à sa capacité à inactiver par protéolyse les facteurs de la

¹ Selon les informations fournies par le demandeur.

coagulation sous leur forme activée (facteurs Va et VIIIa). Le gène de la protéine C est localisé sur le chromosome 2q13-q14 et comprend neuf exons répartis sur 11 kb d'ADN. Un déficit constitutionnel en protéine C, de transmission autosomique dominant, est lié à des mutations variées dans le gène de la protéine C. Ce déficit est associé à une augmentation du risque de thrombose veineuse (thrombophilie) [Millar *et al.*, 2000]. La thrombophilie est liée à des anomalies de l'hémostase qui se manifestent cliniquement par des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires. Il existe des formes constitutionnelles plus fréquentes ou acquises [HAS, 2006]. Habituellement, le diagnostic repose sur un dosage plasmatique de l'activité de la protéine C par test de coagulation ou test chromogénique et un dosage de l'antigène de la protéine C (valeur normale de 70 % à 140 %).

Une déficience de l'activité de la protéine C peut être associée à d'autres désordres génétiques qui prédisposent aux thromboses, incluant une résistance à la protéine C activée due à la mutation G1691A du facteur V (facteur V Leiden) et la mutation G20210A de la prothrombine [Tjeldhorn *et al.*, 2010]. La prévalence de la thrombophilie avec déficience de l'activité de la protéine C est inconnue et variable selon le bagage génétique dans une population multiethnique comme celle de la région de Montréal (selon les informations fournies par le demandeur).

3.3 Nombre de patients visés

Selon les prévisions du demandeur, une ou deux analyses sont prévues par mois, soit une dizaine par année.

3.4 Spécialités médicales concernées (et autres professionnels, le cas échéant)

Hématologie, pédiatrie et gynécologie-obstétrique.

3.5 Modalités d'administration du test

L'analyse est effectuée à partir de l'ADN génomique extrait de leucocytes sanguins périphériques.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Selon les informations fournies par le demandeur, cette analyse remplacerait la recherche de la mutation Ins C 3363 (code 20986) du gène *PROC*. D'autres analyses visant des mutations du gène *PROC* sont inscrites au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*, soit R178Q (code 20987), Splice 3222 (code 20988) et T298M (code 20989). Le CHUM² effectue la recherche des trois mutations (Ins C 3363, R178Q et T298M) par PCR.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Les mutations Ins C 3363 ainsi que les deux mutations faux-sens (R178Q et T298M) ont été identifiées chez sept familles canadiennes françaises présentant un déficit de protéine C de type I. La mutation Ins C 3363 a été probablement introduite en Amérique du Nord par un couple de colons français (en 1669) installés au Québec et au Vermont [Couture *et al.*, 1998]. En 2001, Couture et ses collaborateurs ont montré que tous les hétérozygotes pour cette même mutation (sur 10 générations) vivant en Amérique du Nord sont reliés à ce couple de Français.

² Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Laboratoires – Protéine C (mutation) [site Web]. Disponible à : http://www.chumontreal.com/laboratoires/index.php?option=com_content&view=article&id=1591Aproteine-c-mutation&catid=46%3Aanalyseshemato&Itemid=58.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le séquençage permet d'identifier n'importe quelle mutation connue ou inconnue, plutôt que de chercher la mutation en cause une par une (selon les informations fournies par le demandeur).

4.4 Le coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 La pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Selon les informations fournies par le demandeur, cette analyse remplacerait la recherche de la mutation Ins C 3363 du gène de la protéine C. Puisque le séquençage permet d'identifier n'importe quelle mutation connue ou inconnue, cette analyse remplacerait la recherche des mutations une par une.

5.1.2 Utilité et validité cliniques

Selon la littérature, la PCR suivi d'un séquençage de l'ADN permet d'identifier de nombreuses mutations, qu'elles soient nouvelles ou déjà connues et enregistrées dans une base de données sur les mutations continuellement mise à jour [Reitsma, 1996]. Environ 200 différentes mutations du gène de la protéine C sont enregistrées dans la *PROC Database* [Reitsma *et al.*, 1995, cité dans Tjeldhorn *et al.*, 2010]. Parmi elles, les mutations faux-sens³/non-sens⁴ représentent environ les deux tiers des mutations du gène *PROC*. Les autres mutations comprennent des mutations d'un site d'épissage⁵, des mutations par petite insertion et des mutations par délétion. Les tableaux 1 et 2 présentent un résumé des études retenues.

Dépistage familial

Les formes de déficit de l'activité en protéine C les plus graves sont généralement homozygotes et se manifestent sur le plan clinique par des accidents thrombotiques graves à un âge précoce. Parmi les six études retenues qui ont rapporté des résultats d'un dépistage familial, la majorité des probants⁶ étaient homozygotes et avaient un déficit grave de l'activité de la protéine C (< 10 %). Pour Millar et ses collaborateurs [2000], ni le niveau d'activité de la protéine C ni la nature des lésions détectées du gène *PROC* ne constitue des facteurs pronostiques de l'âge d'apparition ou de la gravité des symptômes cliniques thrombotiques. D'autres facteurs peuvent compliquer la relation entre le génotype et le phénotype clinique. En effet, chez deux patients, la présence du facteur V Leiden, en plus des lésions génétiques de la protéine C, pourrait avoir précipité les événements thrombotiques.

Dépistage non familial

Les études recensées ont permis d'identifier une ou plusieurs mutations dans différentes populations de patients avec un déficit de l'activité de la protéine C. Ces mutations sont à l'origine d'une variabilité de l'expression clinique. Le taux de détection des mutations dépend du pourcentage de l'activité en protéine C. Comme le confirment Caspers et ses collaborateurs

³ Mutation faux-sens (en anglais *missense mutation*) est une mutation qui remplace un codon spécifiant un acide aminé par un codon qui en spécifie un autre.

⁴ Mutation non-sens (en anglais *nonsense mutation*) est une mutation qui remplace un codon spécifiant un acide aminé par un codon stop (cause la troncation de la protéine).

⁵ Épissage (en anglais *splicing mutation*) est un processus englobant l'excision des introns et la réunion des exons dans l'ARN [Chartier, 1991].

⁶ Sujet qui attire l'attention sur un problème génétique dans une famille.

[2012], un taux de détection de mutation de 100 % est présent lorsque l'activité de la protéine C déficiente est de 10 % à 25 %. Le taux de détection de mutation est supérieur à 60 % pour des taux d'activité de la protéine C de 50 % ou plus et il est absent pour l'activité de la protéine C de plus de 70 %, et l'analyse du profil génotypique n'est pas conseillée pour ces derniers par les auteurs. En somme, plus le niveau d'activité de la protéine C est bas et plus le taux de détection des mutations augmente. Dans une autre étude incluant un criblage mutationnel sur gel gradient en condition dénaturante (DGGE) préalable au séquençage, un diagnostic de déficit germlinal en activité de la protéine C a été confirmé chez 39 % des patients qui ont un niveau antigénique sanguin de protéine C à l'intérieur des valeurs limites selon lesquelles l'analyse du gène *PROC* améliore le diagnostic de déficit en protéine C chez ces patients [Alhenc-Gelas *et al.*, 2000].

Le risque de thrombose est plus élevé chez les patients porteurs de mutations que chez les patients non porteurs, mais le risque de développement de la thrombose veineuse est variable comme l'indiquent Tjeldhorn et ses collaborateurs [2010]. Dans cette étude, bien que quatre frères et sœurs sur six aient été homozygotes pour la mutation A267T du gène *PROC*, associée à des niveaux d'activité de la protéine C variant de 8 % à 41 %, un seul d'entre eux a développé une thrombose veineuse. Ces résultats indiquent que la relation génotype-phénotype de cette famille avec une protéine C déficiente est très complexe.

En somme, la technique de séquençage est largement utilisée et son intérêt est justifié pour le dépistage familial des formes graves de déficit en protéine C et pour la recherche de la mutation en cause chez les membres de la même famille afin de confirmer la nature constitutionnelle du déficit. Compte tenu du nombre de mutations que l'on peut déceler, il n'est pas conseillé de rechercher un type de mutation spécifique ni de procéder au dépistage génétique en dehors d'un contexte familial.

Tableau 1 Études sur l'analyse génétique du déficit en protéine C (dépistage familial)

ÉTUDE (ORIGINE DE LA POPULATION)	N	PROTÉINE C ACTIVITÉ		FORME GÉNÉTIQUE		MUTATION (N)
		PROBANTS (DIAGNOSTIC)	MEMBRES DE LA FAMILLE	PROBANTS	MEMBRES DE LA FAMILLE	
Cafolla, 2012 (italienne)	15	Proband 1 : 5 % (TE) Proband 2 : 9 % (TE)	13 membres de 18 % à 60 % (hétérozygotes), 99 % et 120 % (type sauvage)	Homozygotes	11 hétérozygotes 2 de type sauvage	1
Tang, 2012 (chinoise)	34*	34 probants : de 6,3 % à 62,3 % (TE)				18 mutations dont 12 nouvelles
Yu, 2012 (chinoise)	11	1 probant : 5 % (T) [†]	10 membres de 33 % à 42 % (hétérozygotes) de 80 % à 95 % (type sauvage)	Homozygote	5 hétérozygotes 5 de type sauvage	1
Park, 2011 (coréenne)	5	1 probant : 30 % (EP)	de 26 % à 83 %	Hétérozygote	Hétérozygotes : 1 oncle maternel et 1 sœur	1 nouvelle
Tjeldhorn, 2010 (libanaise)	9	1 probant : 8 % (TVR)	Filles du probant : 3 % et ND Autres membres : de 33 % à 63 % 2 membres : 95 % et 100 %	Homozygote	Parents hétérozygotes pour cette mutation, un frère, deux sœurs et la fille du probant sont homozygotes	1 nouvelle
Millar, 2000‡	9	9 probants : entre 1 % et 8 % (DPCS)	de 30 à 100 %§ de 32 à 65 %	5 homozygotes 4 hétérozygotes		7 dont 3 nouvelles

Abréviations : DPCS : déficit en protéine C sévère; EP : embolie pulmonaire; N : nombre de patients qui ont subi le séquençage du gène de la protéine C; ND : non déterminé; PC : protéine C; T : thrombose; TE : thrombo-embolie; TVR : thrombose veineuse récidivante.

* Il s'agit de 34 probants avec un déficit héréditaire de la protéine C et des antécédents personnels et familiaux de maladies thrombo-emboliques.

[†] Thrombose ilio-fémorale droite et vaso-occlusion partielle.

‡ Origine indienne, finlandaise, britannique, suédoise, vénézuélienne.

§ Père de chacun des probants.

|| Mère de chacun des probants.

Tableau 2 Études sur l'analyse génétique du déficit en protéine C non familial

ÉTUDES (ORIGINE DE LA POPULATION)	N (DIAGNOSTIC)	PROTÉINE C ACTIVITÉ	NOMBRE DE MUTATIONS IDENTIFIÉES	NOMBRE DE MUTATIONS DIFFÉRENTES	NOUVELLES MUTATIONS
Ding, 2013 (chinoise)	23 (TVP)	de 19 % à 69,4 %	15	15	6
Lu, 2013 (chinoise)	40 (IC)	NR	6	6	1
Caspers, 2012 (allemande)	211 (TE)	de 27,5 % à 67 % pour les nouvelles mutations	146	77	31
Pai, 2012 (indienne)	102 (TV)	de 9 % à 63 %	8	7	2
Takagi, 2009 (japonaise)	6 (TVP ou PF ou EP)	Un cas : < 10 % de 10 % à 52 %	8 (2 mutations pour un même patient)	6*	NR
Altinisik, 2008 (turque)	50 (TV)	NR†	9 patients (18 %) avec mutations	NR	NR
Labrousche, 2003 (non décrite)	17 (TV ou EP)	de 4 % à 74 %	11	8	1
Alhenc-Gelas, 2000‡	129§	Valeurs selon le type de déficit	104	78	33

Abréviations : EP : embolie pulmonaire; IC : ischémie cérébrale; N : nombre de patients qui ont subi le séquençage du gène de la protéine; PC : protéine C; PF : purpura fulminant; TE : thrombo-embolie; TV : thrombose veineuse; TVP : thrombose veineuse profonde.

* Toutes décrites précédemment dans la population japonaise excepté pour une mutation (c.439G>A) décrite dans deux familles allemandes.

† Sept patients sur neuf avec un niveau d'activité de la protéine C bas (pas de valeur rapportée), deux patients ont des valeurs limites : 73 % et 80 %.

‡ Population de n=122 (France); n=2 (Suisse); n=1 (Tunisie), n=1 (Canada); n=1 (Allemagne).

§ Il s'agit de patients avec des antécédents personnels ou familiaux de thrombose.

|| Valeurs exprimées en moyenne : type I : 0,49 (0,06 à 0,66); type IIAC (selon l'activité anticoagulante) : 0,45 (0,11 à 0,68); type IIAM (selon l'activité amidolytique) : 0,47 (0,11 à 0,68); classification inconnue : 0,33 (0,06 à 0,58); niveau de protéine C limite : 0,70 (0,53 à 0,90).

5.1.3 Valeur thérapeutique : ne s'applique pas.

5.2 Validité analytique (ou technique)

La recherche documentaire ciblée pour l'analyse et l'indication demandées n'a pas permis de repérer des études sur la validité analytique du séquençage. Toutefois, la technique de séquençage est la même pour beaucoup de maladies. Le demandeur est un leader dans le domaine et il précise dans sa demande qu'un contrôle de qualité est réalisé pour chacune des étapes. De plus, le laboratoire suit les lignes directrices du Canadian College of Medical Geneticists (CCMG) et de l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) et prévoit la participation à des contrôles externes.

5.3 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

Les guides de pratique recensés n'abordent pas la question du séquençage.

6 RÉPERCUSSIONS À ANTICIPER DE L'INTRODUCTION ÉVENTUELLE DE L'ANALYSE

6.1 Impact sur les ressources matérielles et humaines : n'a pas été analysé.

6.2 Conséquences économiques d'une introduction dans le système de santé et de services sociaux québécois : n'ont pas été analysés.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique) : n'ont pas été analysés.

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Protéine C par séquençage (code 20070)

Le statut de la technologie diagnostique :

- ☐ Établie
- ☒ Innovatrice
- ☐ Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- ☐ Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète

La recommandation de l'INESSS :

- ☒ Avis de recommandation de maintien pour la maladie et dans les conditions décrites dans la demande
- ☐ Avis de refus de maintien
- ☐ Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle :

- ☐ Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- ☐ Décision de production d'un guide d'usage optimal
- ☐ Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Aubry ML, Aiach M. Thirty-three novel mutations in the protein C gene. French INSERM network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S. *Thromb Haemost* 2000;83(1):86-92.
- Altinisik J, Ates O, Ulutin T, Cengiz M, Buyru N. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and protein C mutation frequency in Turkish venous thrombosis patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14(4):415-20.
- Cafolla A, D'Andrea G, Baldacci E, Margaglione M, Mazzucconi MG, Foa R. Hereditary protein C deficiency and thrombosis risk: Genotype and phenotype relation in a large Italian family. *Eur J Haematol* 2012;88(4):336-9.
- Caspers M, Pavlova A, Driesen J, Harbrecht U, Klamroth R, Kadar J, et al. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S – Practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thromb Haemost* 2012;108(2):247-57.
- Chartier A. Glossaire de génétique moléculaire et génie génétique. Paris, France : Institut national de la recherche agronomique (INRA); 1991.
- Couture P, Bovill EG, Demers C, Simard J, Delage R, Scott BT, et al. Evidence of a founder effect for the protein C gene 3363 inserted C mutation in thrombophilic pedigrees of French origin. *Thromb Haemost* 2001;86(4):1000-6.
- Couture P, Demers C, Morissette J, Delage R, Jomphe M, Couture L, Simard J. Type I protein C deficiency in French Canadians: Evidence of a founder effect and association of specific protein C gene mutations with plasma protein C levels. *Thromb Haemost* 1998;80(4):551-6.
- Ding Q, Shen W, Ye X, Wu Y, Wang X, Wang H. Clinical and genetic features of protein C deficiency in 23 unrelated Chinese patients. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50(1):53-8.
- Haute Autorité de Santé (HAS). Test de résistance à la protéine C activée ; Recherche de la mutation Facteur V Leiden ; Recherche de la mutation g.20210G>A de la prothrombine. Saint-Denis La Plaine, France : HAS; 2006. Disponible à : http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_recherche_mutations_fv_leiden_et_fii_2010.pdf.
- Labrousche S, Reboul MP, Guérin V, Vergnes C, Freyburger G. Protein C and protein S assessment in hospital laboratories: Which strategy and what role for DNA sequencing? *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14(6):531-8.
- Lu X, Tang L, Xu K, Ma J, Guo T, Mei H, et al. Novel association of a PROC variant with ischemic stroke in a Chinese Han population. *Hum Genet* 2013;132(1):69-77.
- Millar DS, Johansen B, Berntorp E, Minford A, Bolton-Maggs P, Wensley R, et al. Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum Genet* 2000;106(6):646-53.
- Pai N, Ghosh K, Shetty S. Hereditary protein C deficiency in Indian patients with venous thrombosis. *Ann Hematol* 2012;91(9):1471-6.

- Park HJ, Chong SY, Oh D, Huh JY, Kim HJ, Yun-Choi HS, Park S. A novel insertion mutation 718dupG in the PROC gene in a Korean thrombophilic family. *Thromb Res* 2011;127(2):176-8.
- Reitsma PH. Protein C deficiency: Summary of the 1995 database update. *Nucleic Acids Res* 1996;24(1):157-9.
- Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, et al. Protein C deficiency: A database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995;73(5):876-89.
- Takagi A, Tanaka R, Nakashima D, Fujimori Y, Yamada T, Okumura K, et al. Definite diagnosis in Japanese patients with protein C deficiency by identification of causative PROC mutations. *Int J Hematol* 2009;89(4):555-7.
- Tang L, Guo T, Yang R, Mei H, Wang H, Lu X, et al. Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population. *PLoS One* 2012;7(4):e35773.
- Tjeldhorn L, Sandset PM, Haugbro K, Skretting G. Hereditary protein C deficiency caused by the Ala267Thr mutation in the protein C gene is associated with symptomatic and asymptomatic venous thrombosis. *Thromb Res* 2010;125(3):230-4.
- Wilson RK, Chen C, Avdalovic N, Burns J, Hood L. Development of an automated procedure for fluorescent DNA sequencing. *Genomics* 1990;6(4):626-34.
- Yu T, Dai J, Liu H, Wang J, Ding Q, Wang H, et al. Homozygous protein C deficiency with late onset venous thrombosis: Identification and in vitro expression study of a novel Pro275Ser mutation. *Pathology* 2012;44(4):348-53.