

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 1/58

Numéro de version : 2.0

Pour les versions révisées :

- Date de 1<sup>ère</sup> mise en application : 27/09/2018
- Numéro de l'ancienne version du document : ANPGM\_135 V1.0
- Date de révision : 19/10/2021

	Nom	Hôpital	Date
Rédacteur(s)	<u>Hypo-dys et a fibrinogénémies</u> Pr Philippe de Mazancourt	Hôpital Amboise Paré Boulogne-Billancourt	04/05/2021
	<u>Déficit en FII</u> Dr Emmanuelle de Raucourt Pr Philippe de Mazancourt	Hôpital Beaujon Hôpital Amboise Paré	04/05/2021
	<u>Déficit en FV</u> Dr Mathilde Fretigny	Hôpitaux civils de Lyon	11/06/2021
	<u>Déficit en FVII</u> Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	06/05/2021
	<u>Déficit en FX</u> Pr Dominique Helley	HEGP Paris	10/05/2021
	<u>Déficit combiné en FVII et X</u> Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	06/05/2021
	<u>Déficit en FXI</u> Pr Philippe de Mazancourt	Hôpital Amboise Paré	04/05/2021
	<u>Déficit en FXIII</u> Pr Philippe de Mazancourt	Hôpital Amboise Paré	04/05/2021
	<u>Déficit combiné en F vit Kdep</u> Dr Séverine Cunat	CHU Montpellier	19/10/2021
	<u>Déficit combiné en FV+VIII</u> Pr Philippe de Mazancourt	Hôpital Amboise Paré	04/05/2021
Vérificateur(s)	<u>Hypo-dys et a fibrinogénémies</u> Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	08/11/2021
	<u>Déficit en FII</u> Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	08/11/2021
	<u>Déficit en FV</u> Pr Christine Vinciguerra	Hôpitaux civils de Lyon	19/10/2021
	<u>Déficit en FVII</u> Pr Dominique Helley	HEGP Paris	10/05/2021
	<u>Déficit en FX</u> Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	08/11/2021

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 2/58

Numéro de version : 2.0

<u>Déficit combiné en FVII et X</u>		
Pr Dominique Helley	HEGP Paris	10/05/2021
<u>Déficit en XI</u>		
Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	08/11/2021
<u>Déficit en FXIII</u>		
Dr Muriel Giansily-Blaizot	CHU Montpellier	08/11/2021
<u>Déficit combiné en F vit Kdep</u>		
Dr Muriel Giansily-Blaizot		
<u>Déficit combiné en FV+VIII</u>	CHU Montpellier	08/11/2021
Dr Muriel Giansily-Blaizot		

Filière MHEMO

Approbateur(s) **Pour le CA de l'ANPGM :**

Cécile ACQUAVIVA-BOURDAIN CHU Lyon  
Marie-Pierre BUISINE CHU Lille

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 3/58

Numéro de version : 2.0

### Sommaire

**A- Stratégies d'études des gènes *FGA* et *FGB* et *FGG* impliqués dans les hypo, dys et afibrinogénémies**

**B- Stratégies d'études du gène *F2* impliqué dans le déficit constitutionnel en facteur (F) II de la coagulation**

**C- Stratégies d'études du gène *F5* impliqué dans le déficit constitutionnel en FV de la coagulation**

**D- Stratégies d'études du gène *F7* impliqué dans le déficit constitutionnel en FVII de la coagulation**

**E- Stratégies d'études du gène *F10* impliqué dans le déficit constitutionnel en FX de la coagulation**

**F- Stratégies d'études des gènes *F7* et *F10* impliqués dans le déficit combiné constitutionnel en FVII+X de la coagulation**

**G- Stratégies d'études du gène *F11* impliqué dans le déficit constitutionnel en FXI de la coagulation**

**H- Stratégies d'études des gènes *F13A* et *F13B* impliqués dans le déficit constitutionnel en FXIII de la coagulation**

**I- Stratégies d'études des gènes *GGCX* et *VKORC1* impliqués dans le déficit constitutionnel combiné en facteurs de la coagulation vitamine K dépendant.**

**J- Stratégies d'études des gènes *LMAN1* et *MCFD2* impliqués dans le déficit constitutionnel combiné en FV et VIII de la coagulation.**

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 4/58

Numéro de version : 2.0

### A- Stratégies d'études des gènes *FGA* et *FGB* et *FGG* impliqués dans les hypo, dys et afibrinogénémies

Ce document décrit :

- l'organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoire en fonction de leur niveau d'analyse des gènes.
- les arbres décisionnels décrivant les différentes étapes à suivre pour l'étude moléculaire des gènes codant la chaîne Aalpha (*FGA*), la chaîne Bbeta (*FGB*) et Gamma (*FGG*), impliqués dans les déficits quantitatifs et/ou qualitatifs en fibrinogène selon différentes indications d'étude.

#### I-Introduction

##### Description et mode de transmission

Le groupe des anomalies du fibrinogène présente une grande hétérogénéité clinique et moléculaire soulignant le rôle important du laboratoire lors du diagnostic.

Le dosage de l'activité et de l'antigène permettent en effet de classer ces anomalies en 3 grands groupes ; a et hypofibrinogénémies (déficits quantitatifs) et dysfibrinogénémies (déficits qualitatifs).

Les anomalies quantitatives sont transmises sur le mode récessif, les hypofibrinogénémies pouvant également être transmises sur le mode autosomique dominant (lorsque l'anomalie porte sur *FGB* ou *FGG*). Les anomalies qualitatives sont pour la plupart et contrairement aux autres déficits rares en facteurs de la coagulation, transmises sur le mode autosomique dominant

##### Pathologie moléculaire

Plusieurs centaines de variations différentes ont été répertoriées dans les banques de données et la littérature recensée sur la base de données du GEHT accessible à l'adresse suivante : <http://site.geht.org/base-de-donnees-fibrinogene/>. Il s'agit majoritairement d'anomalies moléculaires ponctuelles avec une forte proportion de variations dites privées décrites dans une seule famille. Tous les types de variations ponctuelles sont représentés : - non-sens, faux-sens, variations des sites d'épissage, délétion ou insertion ponctuelle décalant ou non le cadre de lecture. Les variations faux-sens sont les plus fréquentes, réparties sur l'ensemble des exons. Quelques cas de larges délétions ont été décrits.

##### Noms et références des gènes

Déficits qualitatifs et quantitatifs en Fibrinogène, N° OMIM : 134850 ; 616004, N° ORPHANET : ORPHA 9881 ; 335 ; 248408 ; 101041, gène *FGA* : NM\_000508.4 et NP\_000499.1 ; *FGB* NM\_005141.4 et NP\_5132.2 ; *FGG* NM\_000509.5 et NP\_000500.2

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 5/58

Numéro de version : 2.0

Localisation sur le chromosome 4 : FGA NC\_000004.12 (154583126 ...154590766), FGB : NC\_000004.12 (154562980 ...154572763), FGG : NC\_000004.12 (154604134 ...154612808).

### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

#### 1°) Les cas index

La première étape indispensable est de disposer des valeurs fonctionnelles (Clauss) et quantitatives du fibrinogène<sup>1</sup>. Ces notions sont indispensables pour une prise en charge clinico-biologique.

-Le cas des dysfibrinogénémies : dosage fonctionnel (C) inférieur aux valeurs de référence du laboratoire et dosage quantitatif (Q) normal. Le séquençage selon Sanger de deux exons (FGA exon 2 et FGG exon 8) explique plus de 2/3 des dysfibrinogènes. Cette analyse peut être réalisée dans des laboratoires dits de niveaux 1 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine.

-Tous les autres cas : a- et hypofibrinogénémies (C/Q dans les limites de la normale avec Q et C abaissées, quelles que soient les valeurs), hypodysfibrinogénémie (C, Q et C/Q abaissés) ou dysfibrinogénémies non expliquées par une variation pathogène ou probablement pathogène sur les exons 2 de FGA et 8 de FGG nécessitent ensuite le recours à un laboratoire capable de réaliser le séquençage de l'ensemble des 3 gènes FGA, FGB et FGG<sup>2</sup>.

-En absence d'identification de variant causal par séquençage (5% des hypofibrinogénémies) des exons et régions flanquantes, la quantification des copies d'allèles par QF-PCR<sup>3</sup> (*Quantitative Fluorescence – polymerase chain reaction*), QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments*) ou NGS (*Next Generation Sequencing*) avec une méthode adaptée et le séquençage des introns seront réalisés dans des laboratoires dits de niveaux 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine.

Enfin, si besoin, une approche complémentaire par l'étude fonctionnelle ex vivo de l'ARN et/ou minigènes devrait être envisagée à titre de recherche dans des laboratoires experts (Cependant, elle n'est pas disponible en routine en 2021).

La rareté des déficits quantitatifs n'a pas permis (et ne justifie pas) la création d'un réseau offrant une couverture nationale homogène selon un rationnel simple. Les laboratoires ne réalisant pas l'étude des gènes concernés ou n'explorant qu'une partie des gènes doivent adresser le prélèvement d'ADN, si une étude complémentaire est nécessaire, à un laboratoire de niveau 2 ou un laboratoire expert de niveau 2.

#### 2°) Les apparentés

Une fois la (les) anomalie(s) moléculaire(s) du cas index identifiée(s), seul(s) l'exon (ou les exons) concerné(s) seront analysé(s).

<sup>1</sup> Le recensement Orphanet au 10 décembre 2015 montre que cette prise en charge est proposée par Amiens, Argenteuil, Clermont-Ferrand, Lille, Lyon, Marseille, Montpellier, Nancy, Paris APHP (Beaujon, Bondy, Cochin, Debré, Kremlin Bicêtre, Pitié, Trousseau), Rennes, Saint-Etienne, Toulouse, Tours. En réalité la liste doit être étendue à l'ensemble des laboratoires disposant des dosages fonctionnels et quantitatifs, quelle que soit la méthode.

<sup>2</sup> Faute de hot spot en dehors des exons 2 de FGA et 8 de FGG

<sup>3</sup> La MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) n'est pas disponible pour ces gènes en 2021.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

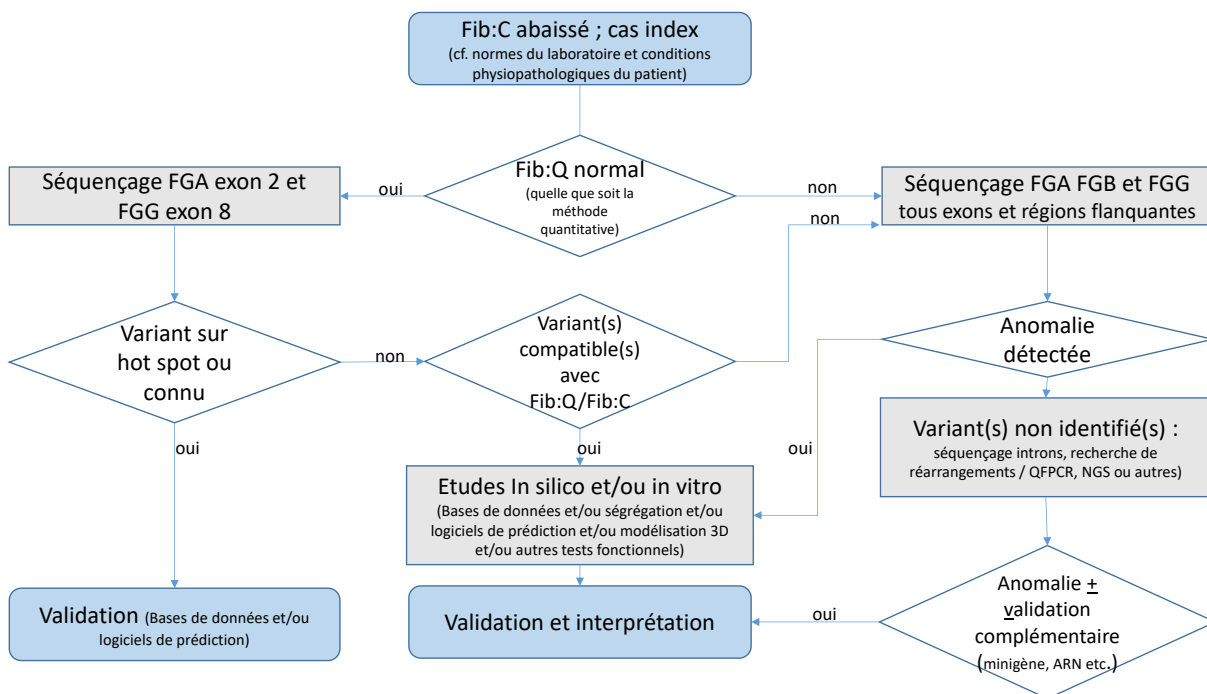
Référence : ANPGM\_135  
Page 6/58

Numéro de version : 2.0

3°) Le diagnostic prénatal des afibrinogénémies n'est envisageable que si les variations pathogènes familiales en cause sont déjà identifiées et l'ADN des deux parents est disponible. Il est réalisé sur rendez-vous et selon les recommandations ANPGM du diagnostic prénatal sur ADN extrait par le centre préleveur (villosités ou cellules amniotiques) dans un laboratoire accrédité.

4°) Le cas particulier des amyloses rénales par dépôt de fibrinogène : l'analyse peut être restreinte au gène *FGA* (Sanger) voire à l'exon 5 du gène *FGA*. En absence de démonstration que le dépôt est du fibrinogène, ou en absence d'identification d'anomalie moléculaire de *FGA* par séquençage selon Sanger, l'analyse des autres gènes en cause dans l'amylose sera réalisée dans des laboratoires dits de niveaux 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine.

### III-Arbres décisionnels des études des gènes *FGA*, *FGB* et *FGG*



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 7/58

Numéro de version : 2.0

### IV-Cotation pour l'étude des gènes *FGA*, *FGB* et *FGG*

#### CAS INDEX:

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger	N906 x 5	BHN 570 x5
Recherche de réarrangement par MLPA (ou QFPCR)	N318	BHN870

#### APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic ; Recherche ciblée :

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906		BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA ou QFPCR	N318	BHN 870
Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intra-cérébrales périnatales pouvant justifier un DPN	4082	B500

### V-Annexes pour l'étude des gènes *FGA*, *FGB* et *FGG*

#### 1- Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage des 3 gènes *FGA*, *FGB*, *FGG* codant pour les 3 chaînes du fibrinogène en France et Suisse

Déficit	Laboratoire spécialisé	Coordonnées mail + téléphone	
Fibrinogène	Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré Boulogne Billancourt	Pr. P. De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a>	01 49 09 55 30
	Service d'Angiologie et Hémostase Hôpitaux Universitaires de Genève 1211 Genève 14 - Suisse	Dr A. Casini <a href="mailto:alessandro.casini@hcuge.ch">alessandro.casini@hcuge.ch</a>	0041-22-37 29 750

#### 2- Principales bases de données locus spécifique

<http://site.geht.org/base-de-donnees-fibrinogene/>

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 8/58

Numéro de version : 2.0

### B- Stratégies d'études du gène *F2* impliqué dans le déficit constitutionnel en facteur (F) II de la coagulation

#### I-Introduction

##### Description clinique et mode de transmission

Le déficit constitutionnel en facteur II est le déficit le plus rare des facteurs de la coagulation. Sa prévalence est estimée à 1 cas pour 2 millions d'individus dans la population générale [1]. Le premier cas a été décrit en 1947 par Quick[2].

Deux types de déficits en facteurs II sont définis [3]:

- Les hypoprothrombinémies de type I (type quantitatif) où la diminution du facteur II activité coagulante est équivalente à celle de l'antigène du facteur II.
- Les hypoprothrombinémies de type II (type qualitatif ou dysprothrombinémie) caractérisées par une diminution de l'activité coagulante du facteur II (FII : C) contrastant avec un taux de facteur II antigène normal. Cela correspond le plus souvent à une atteinte du domaine de la sérine protéase.

L'aprotrombinémie (FII <1%) n'est pas décrite car vraisemblablement létale comme cela a été montré chez la souris [4].

Les manifestations hémorragiques sont d'importance variable, sans corrélation précise avec le taux de facteur II. Cependant, les manifestations hémorragiques les plus sévères sont observées pour des taux de facteur II < à 10%.

Le seuil hémostatique se situerait entre 20 et 40 % de Facteur II (FII : C).

Taux de facteur II	Manifestations hémorragiques	Anomalie moléculaire
<10%	Variables, souvent sévères (hémorragie à la chute du cordon, hémorragie intracérébrale, hémarthrose)	Homozygotes, Hétérozygote composite, Hémizygote
Entre 10 et 30%	Variables, modérées à minimes	Difficile à définir car il peut s'agir d'un homozygote, hétérozygote composite, hémizygote ou hétérozygote.
Entre 30 et 40%	Variables, modérées à minimes	Hétérozygote
>40%	Aucune	Hétérozygote



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 9/58

Numéro de version : 2.0

Le mode de transmission est autosomique récessif et le spectre mutationnel est surtout constitué de variations pathogènes ponctuelles majoritairement privées.

### Pathologie moléculaire et protéine

Le gène du FII (*F2*) est situé sur le bras court du chromosome 11 (11p11-q12). Ce gène est constitué de 14 exons et a une taille de 21 kb. Il code pour une protéine de 622 résidus qui contient 5 domaines : le domaine pré-propeptide, le domaine Gla (Acide  $\gamma$ -carboxyglutamique), le domaine Kringle-1, le domaine Kringle-2 et le domaine sérine protéase.

La forme circulante de la prothrombine est une protéine de 579 acides aminés par perte de son domaine pré-propeptide. L'activation de la prothrombine (II) en thrombine (IIa) se fait grâce au complexe prothrombinase constitué du facteur Xa, du facteur Va à la surface des phospholipides membranaires. La molécule de thrombine est composée d'une chaîne A de 36 acides aminés (Thr285-Arg320) liée par un pont disulfure à une chaîne B de 259 acides aminées portant le domaine sérine protéase (Ile321 – Glu579). La chaîne A de 36 résidus n'a pas de rôle fonctionnel, à l'inverse la chaîne B composée de 259 AA porte le site actif et les autres domaines fonctionnels de l'enzyme [1].

Le rôle de la thrombine est complexe. Il s'agit principalement d'une protéine pro-coagulante en transformant le fibrinogène en fibrine, en activant les facteurs V, VIII, XI de la coagulation et en inhibant la fibrinolyse (par activation du TAFI). La thrombine est également un puissant activateur des plaquettes par activation des PARs (récepteurs des protéases couplés aux protéines G). Cependant, la thrombine a également un rôle anticoagulant en activant la protéine C (après fixation de la thrombine à la thrombomoduline) et en se fixant à l'héparine cofacteur de l'antithrombine.

59 anomalies moléculaires ont été décrites dont 46 variations ponctuelles (<http://www.hgmd.org.cf.ac.uk>) avec une prépondérance de variants faux-sens, de rares insertions/délétions de courts fragments [5, 6].

### Noms et références des gènes

Déficit en FII, hypoprothrombinémie, dysprothrombinémie  
N° OMIM : 176930

N° ORPHANET : ORPHA325  
Gène *F2* : ENSG00000180210  
Localisation sur le chromosome 11p11.2

### II- Prise en charge de l'étude génétique du facteur II

Le laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré réalise l'étude génétique du gène *F2*. Ce laboratoire ne réalise pas directement de diagnostic prénatal (DPN).

L'étude fonctionnelle plasmatique comporte des dosages fonctionnels à l'aide de différents activateurs et le dosage antigénique du facteur II permettant de caractériser le type de déficit, quantitatif ou qualitatif [7].

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 10/58

Numéro de version : 2.0

Les déficits qualitatifs orientent vers une atteinte du domaine sérine protéase mais d'authentiques déficits quantitatifs peuvent également se situer dans cette région. Les variants pathogènes à l'origine des déficits quantitatifs sont répartis sur l'ensemble du gène.

### III-Arbre décisionnel d'étude du gène F2

L'étude génétique du facteur II sera effectuée :

1°/ Après exclusion des déficits acquis : hypovitaminose K, insuffisance hépatocellulaire mais dans ces cas il n'y a pas le plus souvent d'atteinte isolée du facteur II, il existe également de très rares cas d'inhibiteur anti-prothrombine, le plus souvent observés chez les enfants. Ces déficits acquis sont mis en évidence par la mesure du facteur II dans des mélanges de plasma Malade+Témoin.

2°/ Si le taux de facteur II (FII : C) est inférieur à 40%. Cette valeur est révisable selon l'évolution des connaissances.

3°/ Après si possible un dosage antigénique permettant de déterminer un déficit qualitatif.

#### Stratégie d'étude des patients déficitaires en FII

Trois situations possibles en fonction des taux en facteur II :

##### **1- Patients atteints d'un déficit en FII dont le taux est inférieur à 10%**

Dans ce cas le génotype attendu est de 2 allèles mutés. Il s'agit de patients homozygotes, hétérozygotes composites ou hémizyotes.

L'identification d'un seul allèle muté, voire d'aucun allèle muté, par séquençage (*Sanger ou Next Generation Sequencing* (NGS)) des exons et des jonctions introns-exons, doit inciter à rechercher des insertions/délétions. Selon la technique NGS utilisée, ces grands réarrangements pourront être directement mis en évidence. Cependant, ils devront être confirmés par une technique Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) ou QMPSF. En l'absence d'anomalie détectée, l'existence de variants dans les introns ou régions régulatrices promotrices et 3'UTR pourra être envisagée mais relève du domaine de la recherche scientifique.

##### **2- Patients atteints d'un déficit en FII dont le taux est compris entre 30 et 40% :**

Dans ce cas le génotype attendu est un allèle muté. Si on trouve un allèle muté (anomalie moléculaire ponctuelle par séquençage ou grand réarrangement par MLPA) on peut stopper les investigations. Dans le cas contraire, une analyse des introns et zones régulatrices peut être envisagée par NGS mais cette analyse reste du domaine de la recherche scientifique.

##### **3- Patients atteints d'un déficit en FII dont le taux est compris entre 10 et 30%**

Dans ce cas tous les génotypes sont envisageables et il faut par défaut rechercher deux allèles mutés (cas n°1)

La succession de méthodes à utiliser est différente selon qu'il s'agit de cas index (propositus) ou de sujets apparentés à un patient déficitaire.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : **ANPGM\_135**  
 Page 11/58

Numéro de version : **2.0**

### 1- Les cas index

Il n'existe pas de point chaud pour les variations pathogènes. Le séquençage d'emblée (selon Sanger ou NGS) des 14 exons et leurs régions flanquantes est donc indiqué.

En absence d'identification de variant causal par séquençage selon Sanger ou NGS des exons et régions flanquantes, la recherche de grandes insertions/délétions doit être réalisée par MLPA. Si cette recherche reste négative, le séquençage des introns par NGS avec une méthode adaptée sera envisagé dans le cadre de la recherche scientifique. La stratégie est résumée dans la Figure 1.

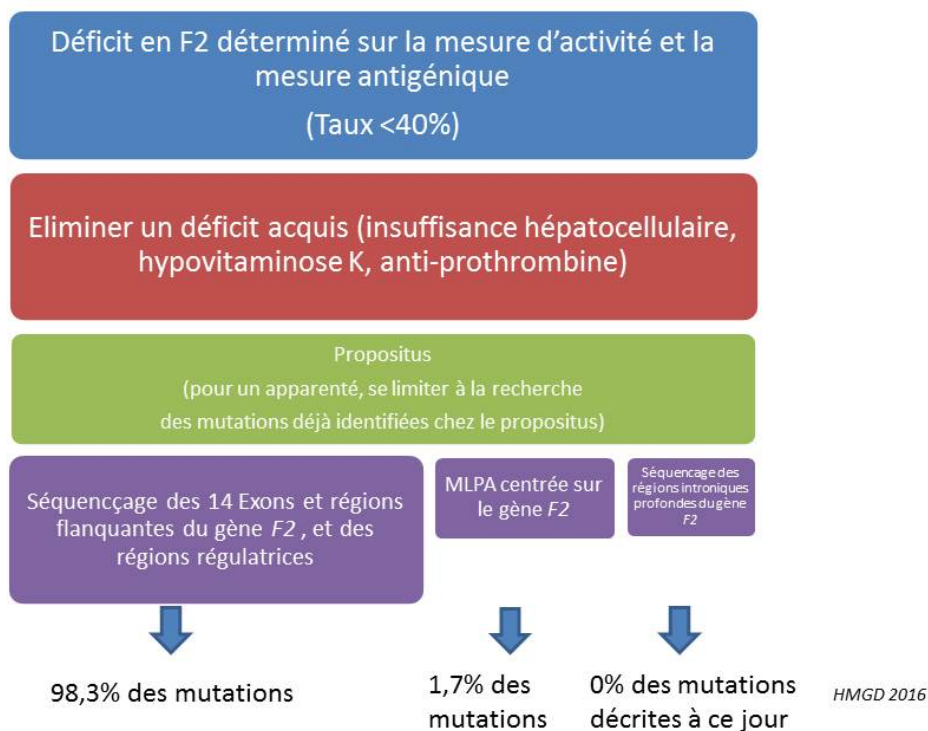


Figure 1 : Stratégie d'étude d'un déficit en Facteur II

### 2- Les apparentés

Une fois la (les) variation(s) pathogène(s) du cas index identifiée(s), seul(s) l'exon (ou les exons) concerné(s) seront analysé(s).

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 12/58

Numéro de version : 2.0

### IV-Cotation pour l'étude du gène F2

#### CAS INDEX:

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger	N906 x 5	BHN 570 x5
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

#### APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906		BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870
Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intra-cérébrales périnatales pouvant justifier un DPN	4082	B500

### REFERENCES

- (1) Bafunno V, Burry L, Tiscia GL and al. A novel congenital dysprothrombinemia leading to defective prothrombin maturation. *Thromb. Res.* (Nov2014), [134, Issue 5](#) :1135–1141
- (2) Quick Aj : Congenital hypoprothrombinemia. *Lancet* (1947), 2 : 379-382,
- (3) Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency – an update. *Semin ThrombHemost*(2013), 39:596–606
- (4) Sun Wy, White DP, Degen JL and al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonates lethality in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), 95 : 7597-7602.
- (5) Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency – an update. *Semin THromboHemost* (2003), 39 : 596 – 606
- (6) Harel R, Shani D, Donohoe K: A case of congenital prothrombin deficiency and idiopathic thrombocytopenic purpura in a pregnant female. *Blood Coagul Fibrinolysis* (2016 fev 15 Epub ahead of print)
- (7) Rouy S1, Vidaud D, Alessandri JL, Dautzenberg MD, Venisse L, Guillin MC, Bezeaud A. Prothrombin Saint-Denis: a natural variant with a point mutation resulting in Asp to Glu substitution at position 552 in prothrombin. *Br J Haematol.* (2006 Mar), 132(6):770-3.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 13/58

Numéro de version : 2.0

Principale database du gène *F2*

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

### ANNEXES

Coordonnées du laboratoire réalisant le génotypage *F2* en France

Laboratoires	Correspondants (courriel + téléphone)
Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré Boulogne Billancourt	Pr. P. De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a> 01 49 09 55 30

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 14/58

Numéro de version : 2.0

### C- Stratégies d'études du gène *F5* impliqué dans le déficit constitutionnel en FV de la coagulation

#### I-Introduction

Les indications de l'étude du gène *F5*, à ce jour, sont :

- Patients avec un déficit en Facteur V de la coagulation (propositus, apparentés et DPN éventuellement)
- Patients avec une discordance entre le test plasmatique de résistance à la protéine C activée et la présence du variant Facteur V Leiden. Chez ces patients, il y a le plus souvent un déficit en facteur V hétérozygote associé.
- Patients avec un syndrome hémorragique sans déficit quantitatif en FV (recherche d'anomalies moléculaires ponctuelles)

#### 1- Déficit en facteur V : description et mode de transmission :

Le déficit congénital en facteur V (FV) de la coagulation ou parahémophilie ou maladie de Owren est une maladie rare de transmission autosomique récessive (1). Il touche 1 personne sur 1000000 pour les formes homozygotes. OMIM : 227400, n° ORPHANET : 326.

Les déficits sévères se caractérisent par des taux plasmatiques de FV inférieurs à 15% et correspondent à des variants homozygotes ou hétérozygotes composites. Les déficits en FV modérés se caractérisent par des taux compris entre 20 et 30% et correspondent à des variants hétérozygotes.

Les premières manifestations cliniques surviennent généralement tôt à la naissance ou dans la petite enfance mais certains patients restent asymptomatiques pendant de nombreuses années et l'anomalie est découverte lors d'un bilan de coagulation fortuit. Les principaux symptômes sont des saignements cutanéomuqueux (épistaxis, ménorragies...) et des saignements post-traumatiques ou lors de chirurgie. Les saignements sévères sont rares et retrouvés chez des patients ayant des taux de FV indétectables. Les patients porteurs de variation pathogène à l'état hétérozygote sont le plus souvent asymptomatiques.

#### 2- Résistance à la protéine C activée et Facteur V Leiden :

La résistance à la protéine C activée (RPCa) est l'anomalie la plus fréquente du bilan de thrombophilie (OMIM : 188055, n°ORPHANET : 64738) (2). Le facteur V Leiden est la principale cause de RPCa. Facteur V Leiden ou Arg506Gln (NM\_000130.4 : c.1601G>A ; p.Arg534Gln).

La recherche isolée du variant facteur V Leiden n'est pas réalisée par l'étude du gène *F5*. Les patients avec une discordance entre le test plasmatique de résistance à la protéine C activée et la présence du variant Facteur V Leiden feront l'objet d'une étude plus ou moins complète du gène *F5*(2)(3). Chez ces patients, il y a le plus souvent un déficit en Facteur V et la démarche est celle des études de déficit en facteur V.

#### 3- Patients avec un syndrome hémorragique sans déficit quantitatif en FV

Dans ce cas, il faut rechercher une anomalie qualitative pouvant expliquer le syndrome hémorragique. A ce jour, 3 variations (FV Texas, FV Amsterdam et FV Atlanta) sont décrites pour interférer avec la voie du TFPI et entraîner une symptomatologie hémorragique (7)(8)(9).

**Pathologie moléculaire :**

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 15/58

Numéro de version : 2.0

Le gène du facteur V de la coagulation (*F5*) est un gène constitué de 25 exons réparti sur 80kb. Il est transcrit en un ARNm de 7kb qui code pour un précurseur de 2224 acides aminés. Ce précurseur va subir des glycosylations pour finalement être libéré dans le plasma.

La structure du FV est similaire à celle du facteur VIII de la coagulation et comprend 3 domaines A (A1, A2 et A3) de 330 acides aminés, un domaine B et 2 domaines C (C1etC2) de 150 acides aminés. 20% du facteur V est situé dans les plaquettes.

La majorité des variations pathogènes sont des variants faux-sens ou non-sens. Il y a aussi des petites délétions ou insertions. Les variations sont réparties tout le long du gène. Il n'y a pas de variations récurrentes en dehors de la substitution p.Tyr1730Cys chez les italiens (4). A ce jour, une grande délétion (5) et un réarrangement complexe (6) sont décrits. Dans 90% des cas de déficit sévère, une variation candidate est retrouvée.

Il n'y a pas de corrélation claire génotype/phénotype (corrélation expression clinique, taux de facteur V et variant causal)

### Nom et références du gène *F5* :

Gène *F5*, gene Id : 2153, NM\_000130.5, NP\_000121.2, localisation 1q24.2.

## II- Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

En 2021, les laboratoires réalisant l'étude génétique du gène *F5* sont au nombre de 2 (coordonnées en annexe) :

- **Service d'hématologie biologique**, Hôpitaux civils de Lyon, Groupement hospitalier Est, Bron
- **Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire**, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt

Pour ce gène, il n'existe pas de répartition en niveau 1 ou 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine car il n'y a pas de variation pathogène prépondérante permettant un premier dépistage de niveau 1

Au niveau post-génomique, le laboratoire de Lyon réalise les études fonctionnelles (expression cellulaire de variant et minigène) mais ne réalise pas encore l'étude de l'ARNm.

Les laboratoires sont organisés en réseau depuis 2006 afin d'offrir une couverture nationale homogène selon un rationnel simple. Les laboratoires ne réalisant pas l'étude du gène demandé doivent adresser le prélèvement d'ADN pour étude au laboratoire expert.

## III-Arbre décisionnel d'étude du gène *F5*

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 16/58

Numéro de version : 2.0

Ces arbres décisionnels sont validés au sein du réseau des laboratoires GENOSTASE

Les indications d'étude sont à adapter en fonction des différentes situations telles que résumées ci-dessous.

- 1- Patients avec un déficit en FV. Le déficit sévère en facteur V est de transmission autosomique récessive. Les patients porteurs d'une seule anomalie moléculaire auront un déficit en facteur V à 30-50%.
- 2- Patients avec une discordance entre le test plasmatique de résistance à la protéine C activée et la présence du variant Facteur V Leiden : recherche d'une variation associée à un déficit en FV en *cis* ou en *trans*
- 3- Patients avec syndrome hémorragique sans déficit quantitatif en FV (recherche de variations pathogènes ponctuelles)(7)(8)(9)
- 4- Recherche des variations pathogènes familiales
- 5- DPN

Les indications d'étude se présentent sous 2 aspects selon qu'il s'agisse d'une étude utilisant le séquençage nouvelle génération NGS ou le séquençage Sanger.

### **A-Stratégie d'étude des patients déficitaires en FV intégrant le NGS selon les Indications**

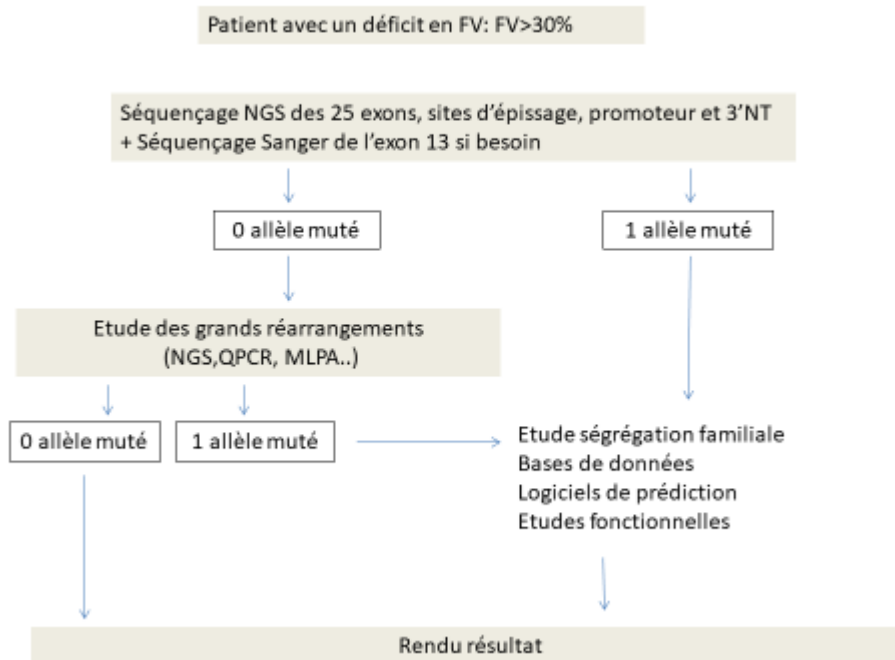
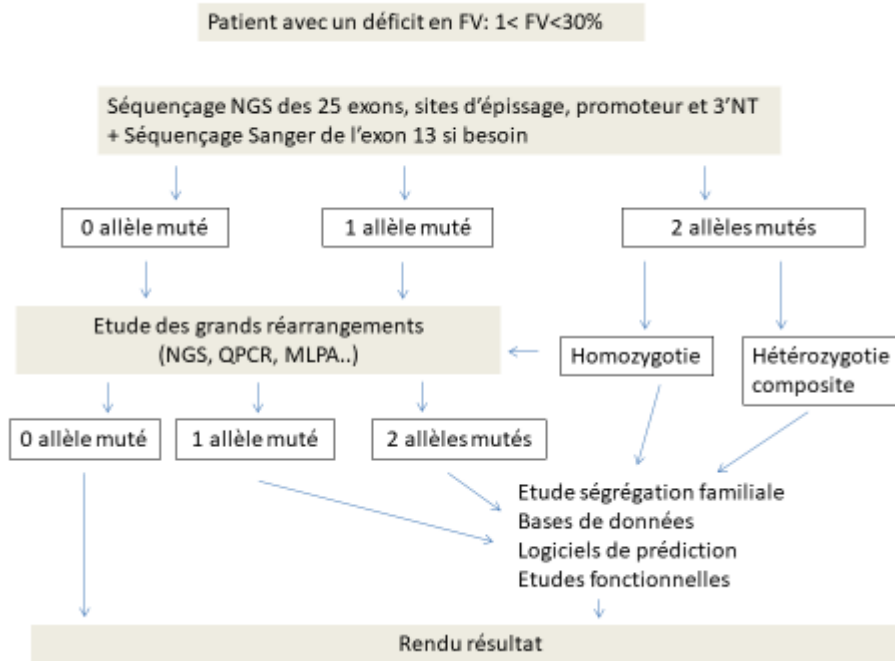
- 1- Patients atteints d'un déficit en FV
  - dont le taux de FV:C mesuré se situe entre <1% et ≤à 30%.La valeur 30% est révisable selon l'évolution des connaissances.
  - dont le taux de FV:C mesuré est>30% (à discuter au cas par cas après avis d'un centre expert)



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 17/58

Numéro de version : 2.0



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : **ANPGM\_135**  
Page 18/58

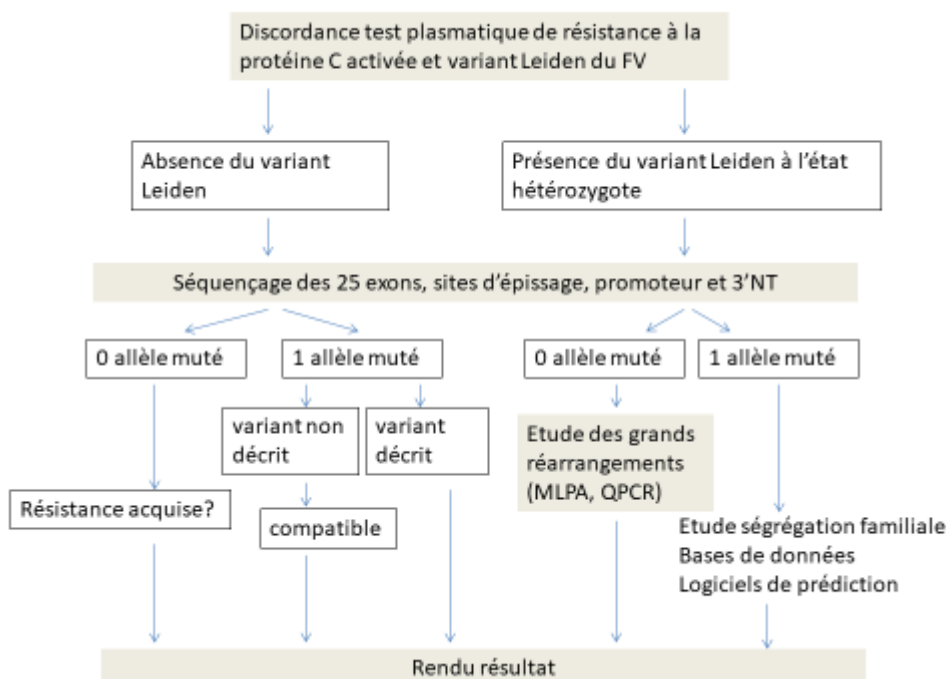
Numéro de version : **2.0**

Remarques :- si le NGS permet d'étudier les CNV, cette technique sera utilisée en première intention et la vérification sera faite par MLPA ou qPCR

- s'il y a des « trous » de couverture, les régions seront étudiées par séquençage Sanger. De même, l'exon 13 peut être difficile à étudier. Il pourra en cas de besoin être étudié par séquençage Sanger.

### 2- Patients avec une discordance entre le test plasmatique de résistance à la protéine C activée et la présence du variant Facteur V Leiden :

- Patients avec un test de résistance à la protéine C activée anormal en l'absence du variant Facteur V Leiden: recherche d'une variation pathogène responsable de la thrombophilie, se reporter aux arbres traitant des thrombophilies rares (2)
- Patients avec un variant Facteur V Leiden présent à l'état hétérozygote et un test de résistance à la protéine C activée discordant et un déficit modéré en FV : 2 cas de figure(3) :
  - Test de résistance à la protéine C activée en faveur d'un variant du Facteur V Leiden à l'état homozygote et le variant n'est présent qu'à l'état hétérozygote. Recherche d'un allèle nul en « trans » sur le gène du F5.
  - Test de résistance à la protéine C activée normal et le variant Facteur V Leiden est présent à l'état hétérozygote. Recherche d'un allèle nul en « cis » sur le gène du F5.

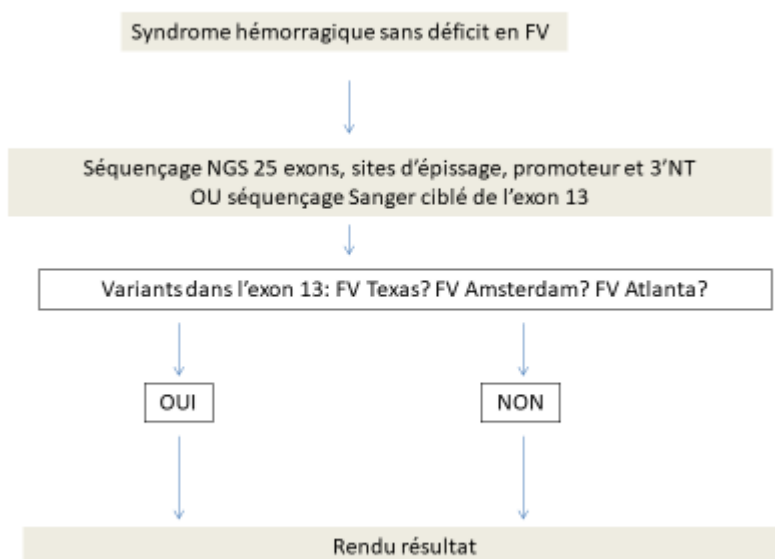


## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 19/58

Numéro de version : 2.0

### 3- Patients avec syndrome hémorragique sans déficit quantitatif en Facteur V



### 4- Etude familiale :

Le propositus est étudié par séquençage NGS et la (les) variation(s) pathogène(s) mise(s) en évidence chez les apparentés sont recherchées par séquençage Sanger, MLPA et/ou qPCR selon les cas.

### **B-Stratégie d'étude des patients déficitaires en FV sans NGS selon les Indications**

Trois situations possibles

#### 1- Patients atteints d'un déficit en FV

- dont le taux de FV:C mesuré situe entre <1% et <ou = à 30%
- dont le taux de FV:C >30% (à discuter au cas par cas après avis d'un centre expert)

La stratégie est la même que pour l'approche avec le NGS : séquençage systématique par technique Sanger des 25 exons, des sites d'épissage, de la région promotrice et de la région 3'NT. La recherche de grands réarrangements se fera par MLPA ou qPCR.

#### 2- Patients avec syndrome hémorragique sans déficit en Facteur V (7),(8)(9)

- Séquençage Sanger d'une partie de l'exon 13 à la recherche des variants FV Texas (7) (c.2350A<G ; p.Ser784Gly) et FV Amsterdam (c.2588C>G ; p.Ala863Gly) (8)  
 NM\_000130.4  
 Recherche du FV-Atlanta : c.2413\_3244del (p.Thr805Serfs\*13) (9)

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 20/58

Numéro de version : 2.0

### 3- Etude familiale :

Le propositus est étudié par séquençage systématique et la ou les variations pathogènes à mettre en évidence chez les apparentés sont recherchées par séquençage Sanger, MLPA et/ou qPCR selon les cas.

### **C-Stratégie du Diagnostic Prénatal du déficit en FV**

#### **L'étude doit comporter l'analyse des parents et du fœtus.**

Elle s'appuie sur les recommandations ANPGM du Diagnostic prénatal.

Se fait sur rendez-vous afin d'organiser au mieux l'analyse. Il ne peut être proposé qu'après identification chez chacun des membres du couple du(des) variant(s) délétère(s) et sera réalisé de préférence à partir de villosités choriales. Selon le contexte, ce diagnostic prénatal pourra également être effectué à partir des cellules amniotiques.

### **IV-Cotation pour l'étude du gène F5**

#### **CAS INDEX:**

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

#### **APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :**

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger	N906	BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870
Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intracérébrales périnatales pouvant justifier un DPN	4082	B500

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 21/58

Numéro de version : 2.0

### REFERENCES

Base de données :

HGMD : <http://www.biobase-international.com/product/hgmd>

EAHAD : <https://f5-db.eahad.org/>

- 1-Asselta R, Peyvandi F. Factor V deficiency. *Sem Thromb Hemost*. 2009; 35(4):382-9.
- 2-Castoldi E et al. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 445-453.
- 3-Dargaud Y et al. Two novel factor V null mutations associated with activated protein C resistance phenotype/genotype discrepancy. *Br J Haematol* 2003;123: 342-345.
- 4-Delev D. et al. *Factor 5* mutation profile in German patients with homozygous and heterozygous factor V deficiency. *Haemophilia* 2009 ; 15, 1143-1153
- 5-Guella I et al. Identification of the first Alu-mediated large deletion involving the F5 gene in a compound heterozygous patient with severe factor V deficiency. *Thromb Haemost* 2011; 106(2): 296-303
- 6-Caudill JS et al. Severe coagulation factor V deficiency associated with an interstitial deletion of chromosome 1q. *J Thromb Haemost* 2007; 5(3): 626-8.
- 7-Vincent LM et al. Coagulation factor VA2440G causes east Texas bleeding disorder via TFPI $\alpha$ . *J Clin Invest* 2013; 123(9):3777-87.
- 8-Cunha MLR et al. A novel mutation in the *F5* gene (factor V Amsterdam) associated with bleeding independent of factor V procoagulant function. *Blood* 2015; 125(11):1822-1825
- 9-Zimowski K L. et al. F5-Atlanta: a novel mutation in *F5* associated with enhanced East Texas splicing and FV-short production. *J Thromb Haemost*. 2021;00:1-13.

### ANNEXES

#### 1- Coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage *F5* en France

Déficit	Laboratoires spécialisés	Coordonnées mail + téléphone	
FV	Laboratoire d'hémostase Centre Hospitalier EST Lyon	Dr M. Fretigny <a href="mailto:mathilde.fretigny@chu-lyon.fr">mathilde.fretigny@chu-lyon.fr</a>	04 27 85 66 18 04 27 85 66 17
	Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré Boulogne Billancourt	Pr. P. De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a>	01 49 09 55 30

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 22/58

Numéro de version : 2.0

### 2- Feuille de renseignements cliniques

#### Fiche de renseignement déficit en Facteur V

##### Identité Patient :

Nom  
Prénom  
Date de naissance  
Lieu de naissance

##### Prescripteur

Nom  
Institution

##### Taux de facteur V

- activité coagulante : ..... %

- antigène : ..... %

- Facteur V intraplaquettaire : .....%

Anticoagulant circulant (inhibiteur) non  oui  titrage : .....

##### Taux de facteur VIII

- activité coagulante : ..... %

##### Existe t'il une notion de consanguinité dans la famille ?

oui  non  ne sais pas

##### Une étude familiale a-t-elle déjà été menée ?

oui  non  ne sais pas

Noms des autres patients déficitaires ou membres de la famille étudiés (si nom différent de ce patient) :

.....  
.....

##### Origine ethnique :

##### Circonstances de découverte :

signes cliniques «hémorragiques»

bilan hémostase perturbé

##### Principaux signes cliniques hémorragiques:

- aucun
- épistaxis
- ménorragies
- hématuries
- hémorragies cérébrales
- hémorragies digestives
- hématomes
- hémarthroses

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 23/58

Numéro de version : 2.0

- saignements après traumatisme/chirurgie/accouchement/extractions dentaires
- autres :

### 3- Coordonnées des laboratoires :

Service d'hématologie Biologique  
Centre Hospitalier Est  
Centre de Biologie EST  
Plateforme BIOGENET-3<sup>ème</sup> étage  
59, boulevard Pinel  
69677 BRON cedex

Chef de service : Pr Christine Vinciguerra

Responsables de l'activité : Pr Christine Vinciguerra ([christine.vinciguerra@chu-lyon.fr](mailto:christine.vinciguerra@chu-lyon.fr))  
Dr Mathilde Frétigny ([mathilde.fretigny@chu-lyon.fr](mailto:mathilde.fretigny@chu-lyon.fr))

Tel : 04 27 85 66 18 (secrétariat)

Fax : 04 72 35 73 35

### Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire

Hôpital Ambroise Paré  
9 avenue Charles de Gaulle  
92100 Boulogne-Billancourt

Chef de service : Dr Philippe de Mazancourt ([philippe.demazancourt@aphp.fr](mailto:philippe.demazancourt@aphp.fr))

**Téléphone** : 01 49 09 55 31

**Fax** : 01 49 09 58 63

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 24/58

Numéro de version : 2.0

### D- Stratégies d'études du gène *F7* impliqué dans le déficit constitutionnel en FVII de la coagulation

#### I-Introduction

##### Description et mode de transmission

Le déficit constitutionnel en Facteur VII est le plus fréquent des déficits rares en facteurs de la coagulation. Sa fréquence en Europe est estimée à 1/300 000 individus (1-2). Le tableau clinique est extrêmement variable allant de formes totalement asymptomatiques à des maladies sévères mettant en jeu le pronostic vital. Le taux de FVII plasmatique résiduel n'est le plus souvent pas corrélé à la sévérité du syndrome hémorragique. Il est donc très difficile de définir des groupes à risque hémorragique, compliquant la prise en charge thérapeutique.

Le mode de transmission est autosomique récessif et le spectre mutationnel est large sans variation pathogène prépondérante.

Sur le plan thérapeutique, il existe un traitement spécifique: le facteur VII activé recombinant, (rFVIIaEptacog alfa activé NovoSeven®) recommandé en première intention, les concentrés de complexe prothrombinique humain (PPSB) et un facteur VII d'origine plasmatique (Immunseven®) disponible en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans les cas de contre-indications des produits activés

##### Pathologie moléculaire

Plus de 250 variations pathogènes ou probablement pathogènes, différentes ont été répertoriées dans les banques de données et la littérature recensée sur la base de données UMD F7 accessible à l'adresse suivante : [http://www.umd.be/F7/W\\_F7/index.html](http://www.umd.be/F7/W_F7/index.html) et <https://f7-db.eahad.org/> . A l'exception de courtes délétions de 15 à 17 paires de bases, il s'agit majoritairement de variations ponctuelles avec une forte proportion de variations dites privées décrites dans une seule famille. Tous les types de variations ponctuelles sont représentés: variants non-sens, faux-sens, variations des sites d'épissage, délétion ou insertion ponctuelle décalant ou non le cadre de lecture. Les variants faux-sens sont les plus fréquents, répartis sur l'ensemble des exons. Quelques cas de larges délétions du gène *F7* ont été décrits (3-4). Certaines délétions peuvent emporter également le gène du FX très proche du gène du FVII sur le chromosome 13.

Par ailleurs, plusieurs polymorphismes intra-géniques sont reconnus pour moduler les taux de FVII:C circulant. Leur effet peut se surajouter à celui des variations pathogènes accentuant la complexité des génotypes *F7* et leur interprétation (1).

##### Noms et références des gènes

Déficit en FVII, N° OMIM : 227500, N° ORPHANET : ORPHA327, gène *F7* :NM\_000131.4 et NP\_000122.1  
Localisation sur le chromosome 13 : NC\_000013.11 (113105788 ... 113120681, assembly GRCh38).



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 25/58

Numéro de version : 2.0

### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

En 2017 les laboratoires réalisant l'étude génétique du gène *F7* sont au nombre de 4

- Département d'hématologie biologique, hôpital Saint-Éloi (Montpellier)
- Service d'hématologie biologique, hôpital Européen George Pompidou (Paris)
- Laboratoire de biochimie et de génétique moléculaire, hôpital Ambroise Paré (Boulogne-Billancourt).
- Laboratoire Cerba (Paris)

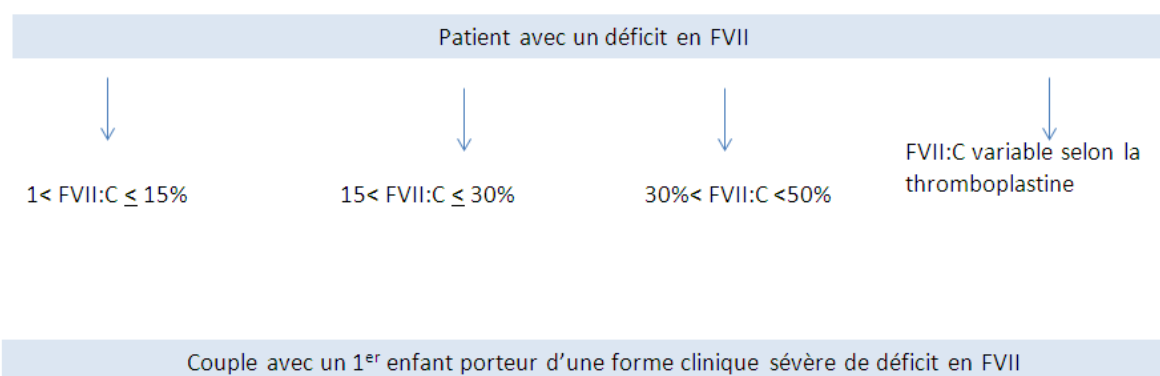
Pour ce gène, il n'existe pas de répartition en niveau 1 ou 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine car il n'y a pas de variation pathogène prépondérante permettant un premier dépistage de niveau 1. Sur ces 4 laboratoires, un seul réalise le diagnostic prénatal (Laboratoire Cerba)

Les laboratoires sont organisés en réseau depuis 2006 afin d'offrir une couverture nationale homogène selon un rationnel simple. Les laboratoires ne réalisant pas l'étude du gène demandé doivent adresser le prélèvement d'ADN pour étude à un des 4 laboratoires expert.

### III-Arbres décisionnels des études du gène *F7*

Ces arbres décisionnels sont validés au sein du réseau des laboratoires GENOSTASE

Les indications d'étude sont à adapter en fonction des différentes situations telles que résumé ci-dessous. Les valeurs seuils sont révisables selon l'évolution des connaissances.



Les indications d'étude se présentent sous 2 aspects selon qu'il s'agisse d'une étude utilisant le séquençage nouvelle génération NGS ou le séquençage Sanger.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 26/58

Numéro de version : 2.0

### A-Stratégie d'étude des patients déficitaires en FVII intégrant le NGS selon les Indications

Quatre situations possibles

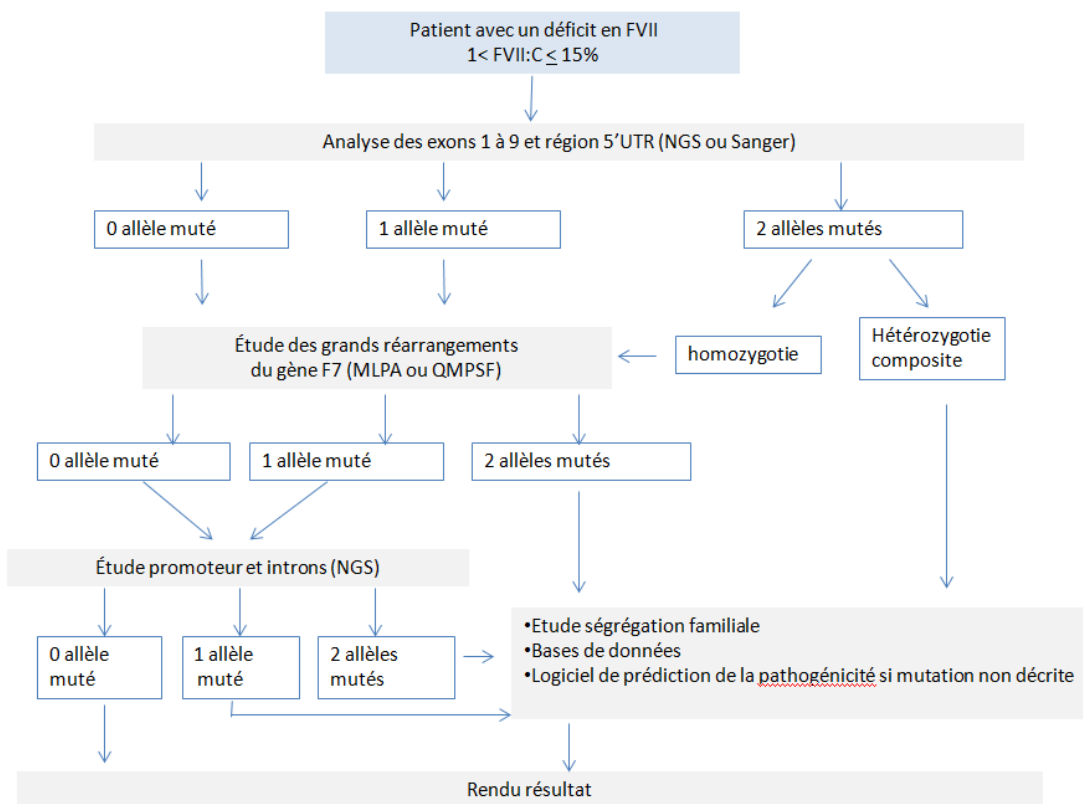
1- Patients atteints d'un déficit en FVII

- dont le taux de FVII:C mesuré avec une thromboplastine recombinante humaine se situe entre <1% et <ou = à 15%

- dont le taux de FVII:C mesuré avec une thromboplastine recombinante humaine se situe entre >15% et <ou = à 30%

- dont le taux de FVII:C mesuré avec une thromboplastine recombinante humaine est entre 30 et 50% (les valeurs sont révisables selon l'évolution des connaissances)

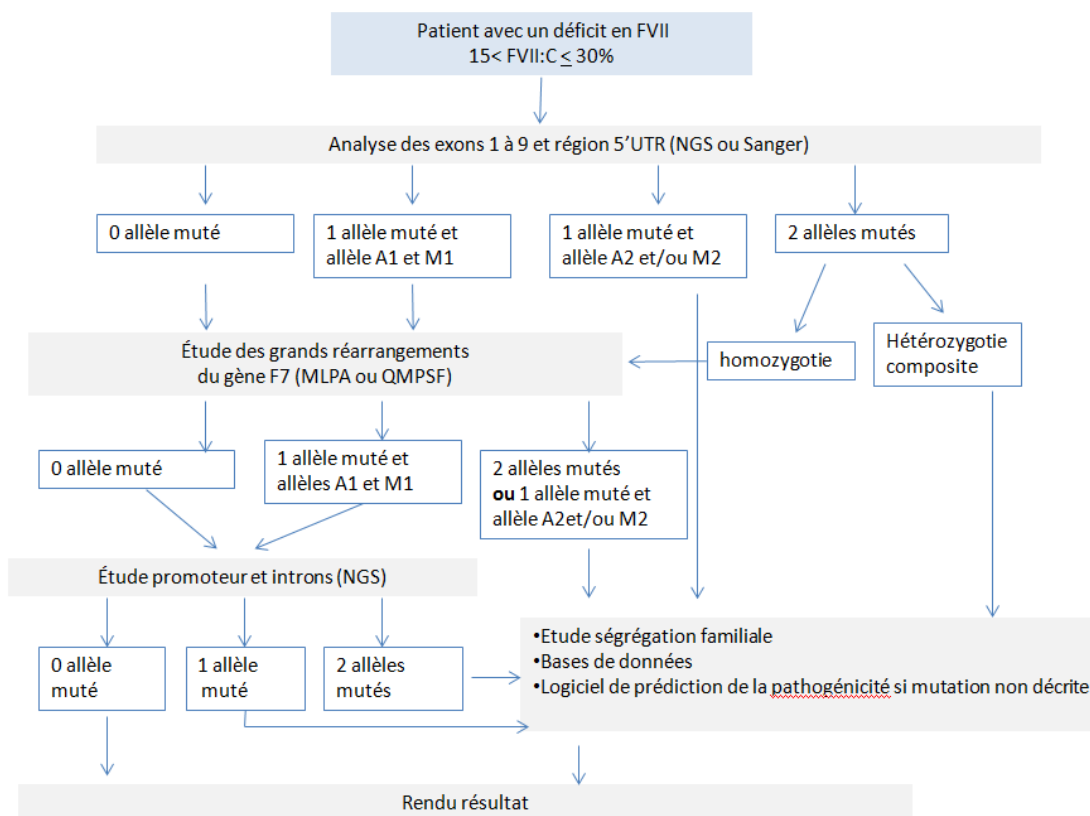
2- Couple avec un 1<sup>er</sup> enfant atteint d'une forme clinique sévère (hémarthroses à répétition, hémorragies cérébrales)



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 27/58

Numéro de version : 2.0



NB : Allèle A2 : F7 :c.-325\_-324insCCTATATCCT, Allèle M2 :F7.p.Arg413Gln

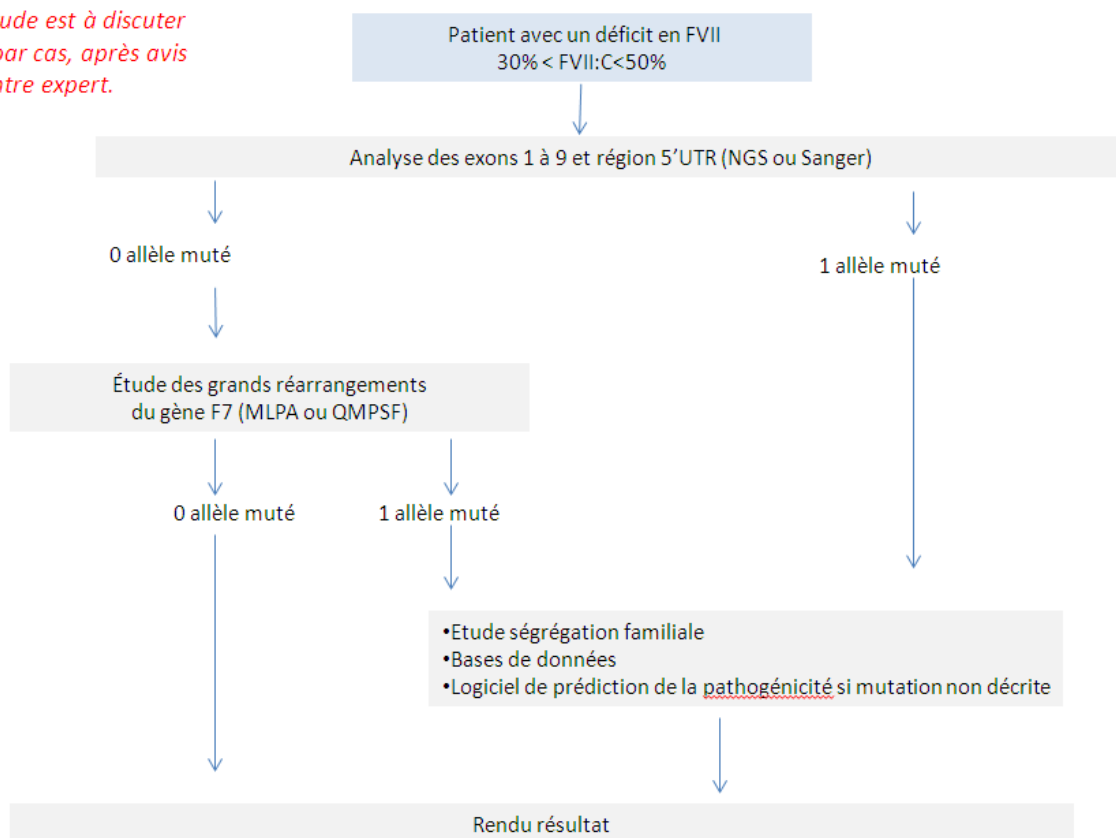
Selon la technique NGS utilisée, les grands réarrangements peuvent être directement mis en évidence. Cependant, ils devront être confirmés par une technique Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) ou QMPSF. En l'absence d'anomalie détectée, l'existence de variants dans les introns ou régions régulatrices pourra être envisagée mais relève du domaine de la recherche.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 28/58

Numéro de version : 2.0

*Cette étude est à discuter au cas par cas, après avis d'un centre expert.*



### **B-Stratégie d'étude des patients déficitaires en FVII sans NGS selon les Indications**

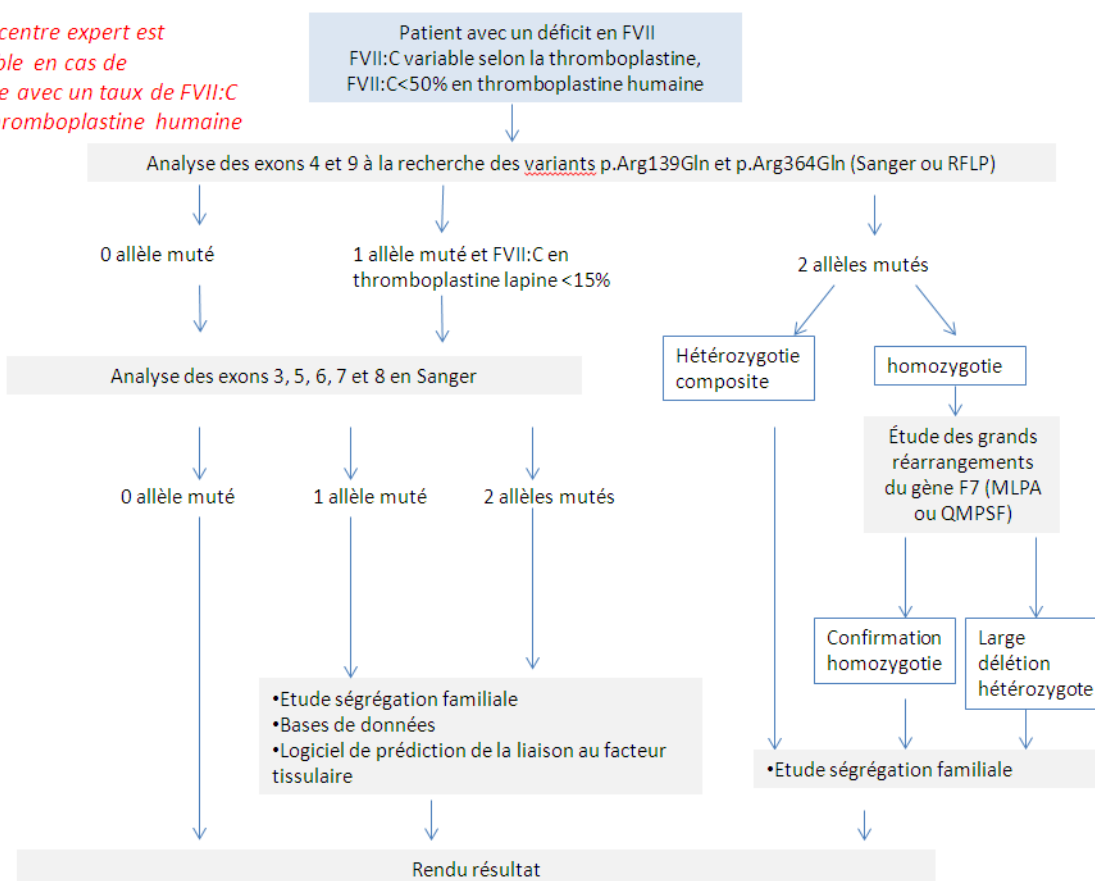
- 1- Patients atteints d'un déficit en FVII dont le taux de FVII:C varie selon le réactif thromboplastine utilisé (recombinante humaine ou animale)

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 29/58

Numéro de version : 2.0

*L'avis d'un centre expert est indispensable en cas de discordance avec un taux de FVII:C >50% en thromboplastine humaine*



### C-Stratégie d'étude d'un conjoint de patient déficitaire en FVII dans le cadre d'un projet parental

- Conjoint d'un patient déficitaire en FVII porteur d'une variation de séquence reconnue sévère : l'examen du gène *F7* se justifie dès lors que le taux de FVII :C est inférieur ou égal à 80 % selon la stratégie exposée au paragraphe A quelle que soit la symptomatologie clinique associée. La valeur de 80% est révisable, l'avis d'un centre expert est requis.

*Sont reconnues sévères les variations suivantes : larges, délétions, variant non-sens, variation décalant le cadre de lecture, variant faux-sens touchant un des résidus suivants (nomenclature protéique HGVS où la méthionine du codon d'initiation est notée 1) : la cystéine 195, la cystéine 322, l'histidine 253, l'acide aspartique 302, la sérine 404, l'arginine 212, l'isoleucine 213 ou toute autre variation de séquence déclarée sévère dans le compte rendu.*

- Conjoint d'un patient déficitaire en FVII porteur d'une anomalie moléculaire non reconnue sévère : l'examen du gène *F7* se justifie dès lors que le taux de FVII :C est inférieur à 60 % selon la stratégie exposée au paragraphe A quelle que soit la symptomatologie clinique associée.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 30/58

Numéro de version : 2.0

### **D-Stratégie du Diagnostic Prénatal du déficit en FVII**

**L'étude doit comporter l'analyse des parents et du fœtus.**

Elle s'appuie sur les recommandations ANPGM du Diagnostic prénatal.

Se fait sur rendez-vous afin d'organiser au mieux l'analyse. Il ne peut être proposé qu'après identification chez chacun des membres du couple du (des) variant(s) délétère(s) et sera réalisé de préférence à partir de villosités chorales. Selon le contexte, ce diagnostic prénatal pourra également être effectué à partir des cellules amniotiques.

### **IV-Cotation pour l'étude du gène F7**

#### **CAS INDEX:**

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger (hors cas particulier de variant FVII associé à un FVII :C variable selon la thromboplastine utilisée)	N906 x 5	BHN 570 x5
Analyse par séquençage Sanger : cas particulier de variant FVII associé à un FVII :C variable selon la thromboplastine utilisée	N906 x 2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

#### **APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :**

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié (s) par NGS	N353	BHN 720
Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906		BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870
Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intra-cérébrales périnatales pouvant justifier un DPN	4082	B500

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 31/58

Numéro de version : 2.0

### REFERENCES

- (1) Giansily-Blaizot M, Schved JF. Potential predictors of bleeding risk in inherited factor VII deficiency. Clinical, biological and molecular criteria. *Thromb Haemost* 2005 ; 94 : 901-6.  
Mariani G, Bernardi F. Factor VII Deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009 ; 35 : 400-6
- (2) Hewitt J, Craven SJ, Brown LA, Bleackley MR, Ballard JN, Smith VC, Ofosu FA, Huntsman DG, Wadsworth LD, Wu JK, Macgillivray RT. Molecular determination of the breakpoints of a 161 556 bp deletion at chromosome 13q34 that presented as severe factor VII deficiency in a neonate. *Br J Haematol* 2008 ; 140 : 589-92.
- (3) Giansily-Blaizot M, Thorel D, Khau Van Kien P, Behar C, Romey MC, Mugneret F, Schved JF, Claustres M. Characterisation of a large complex intragenic-arrangement in the FVII gene (F7) avoiding misdiagnosis in inherited factorVII deficiency. *Br J Haematol.* 2007 Aug;138(3):359-65.

#### Principales databases du gène F7

<http://www.umd.be/F7>

<https://f7-db.eahad.org/>

### ANNEXES

#### 1 Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage FVII en France

Laboratoires	Correspondants (courriel + téléphone)
Département d'hématologie biologique, hôpital Saint-Éloi (Montpellier)	Dr Muriel Giansily-Blaizot <a href="mailto:m-giansily@chu-montpellier.fr">m-giansily@chu-montpellier.fr</a> 04 67 33 70 31 ,
Service d'hématologie biologique, hôpital Européen George Pompidou (Paris)	Pr. Dominique Helley <a href="mailto:dominique.helley@aphp.fr">dominique.helley@aphp.fr</a> 01 56 09 39 05
Laboratoire de biochimie et de génétique moléculaire, hôpital Ambroise Paré (Boulogne-Billancourt)	Pr. Philippe De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a> 01 49 09 55 30 ,
Laboratoire Cerba 11 Rue de l'Équerre, 95310 Saint-Ouen-l'Aumône	Dr. Jean-Marc Costa 01 34 40 20 20

#### 2 Exemple de fiche de demande pour le génotypage F7 au CHU de Montpellier





## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 33/58

Numéro de version : 2.0

### E- Stratégies d'études du gène *F10* impliqué dans le déficit constitutionnel en FX de la coagulation

#### I-Introduction

##### Description et mode de transmission

Le déficit constitutionnel en Facteur X est un déficit rare. Sa fréquence en France est estimée à 1/1 000 000 individus [1]. Le déficit en FX est un des déficits les plus sévères, les hémorragies étant d'autant plus sévères que le taux de facteur X est bas. Ainsi, la plupart des patients ayant des taux de FX inférieurs à 10 %, ont un phénotype hémorragique, ces dernières étant plus graves et précoces chez les patients avec des taux inférieurs à 1 % (jusqu'à 20 % de ces patients ont des hémorragies intracérébrales) [2]. Jusqu'à 30 % des patients hétérozygotes peuvent présenter des saignements postopératoires importants ou souffrir de saignements cutanéomuqueux spontanés [3]. Le seuil hémostatique se situe entre 15 et 20% de FX:C.

Le mode de transmission est autosomique récessif et le spectre mutationnel est large et majoritairement constitué d'anomalies moléculaires privées.

Les épisodes hémorragiques sont généralement traités par les concentrés de complexe prothrombinique humain (PPSB) ou à défaut du plasma humain. Un concentré de facteur X humain hautement purifié, Coagadex® (Bio Products Laboratory Limited), a été approuvé en octobre 2015 par la FDA.

##### Pathologie moléculaire

Le gène du FX est situé sur le bras long du chromosome 13 (13q34-ter), 2,8 kb en aval du gène du FVII. Ce gène est constitué de 8 exons.

Plus de 180 variations pathogènes ou potentiellement pathogènes différentes ont été répertoriées dans les bases de données (<https://f10-db.eahad.org/> ou Human Gene Mutation Database (HGMD) ([www.hgmd.org](http://www.hgmd.org))). A l'exception de courtes délétions ou insertions, il s'agit majoritairement de variations de séquence ponctuelles avec une forte proportion de variations dites privées décrites dans une seule famille. Tous les types de variations ponctuelles sont représentés avec une prépondérance importante des variants faux-sens (plus de 80% des cas), quelques variations des sites d'épissage ou délétions ou insertions ponctuelles. Les variants faux-sens sont répartis sur l'ensemble des exons. Quelques cas de larges délétions du gène *F10* ont été décrits [4]. Certaines délétions peuvent emporter également le gène du FVII très proche du gène du FX sur le chromosome 13 [5].

##### Noms et références des gènes

Déficit en FX, N° OMIM : 227600, N° ORPHANET : ORPHA328, gène *F10* : NM\_000504.3 et NP\_000495.1  
Localisation sur le chromosome 13 : NC\_000013.11 (113122799 ... 1131495529, assembly GRCh38).

#### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

En 2017 les laboratoires réalisant l'étude génétique du gène *F10* sont au nombre de 4

- Service d'Hématologie Biologique, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Ouest (hôpital Européen George Pompidou)

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 34/58

Numéro de version : 2.0

- Département d'Hématologie biologique, Hôpital Saint-Eloi, CHU Montpellier
- Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Hôpital Ambroise Paré (Boulogne-Billancourt)
- Service d'Hémostase Bioclinique, CHU de Rennes

Pour ce gène, il n'existe pas de répartition en niveau 1 ou 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine car il n'y a pas d'anomalie moléculaire prépondérante permettant un premier dépistage de niveau 1. Sur ces 4 laboratoires, aucun ne réalise le diagnostic prénatal

Les laboratoires sont organisés en réseau depuis 2006 afin d'offrir une couverture nationale homogène selon un rationnel simple. Les laboratoires ne réalisant pas l'étude du gène demandé doivent adresser le prélèvement d'ADN pour étude à un des 4 laboratoires experts.

### III-Arbre décisionnel d'étude du gène *F10*

Cet arbre décisionnel est validé au sein du réseau des laboratoires GENOSTASE

Les indications d'étude sont à adapter en fonction des différentes situations telles que résumé ci-dessous. Les déficits acquis en facteur X doivent auparavant avoir été exclus (par exemple. amylose)

#### **Stratégie d'étude des patients déficitaires en FX**

Les taux inférieurs à 30% s'expliquent en général par 2 allèles atteints (patients homozygotes, hétérozygotes composites ou hémizygotés) et les taux entre 30 et 50% par un allèle atteint (patients hétérozygotes). Les valeurs seuils données ici sont révisables selon l'évolution des connaissances

**La succession de méthodes à utiliser** est différente selon qu'il s'agit de cas index (propositus) ou de sujets apparentés à un patient déficitaire.

#### 1- Les cas index

A l'échelle de la population Française dans son ensemble, il n'existe pas de point chaud pour les anomalies moléculaires. Le séquençage d'emblée (séquençage Sanger ou NGS) des 8 exons et leurs régions flanquantes est donc indiqué.

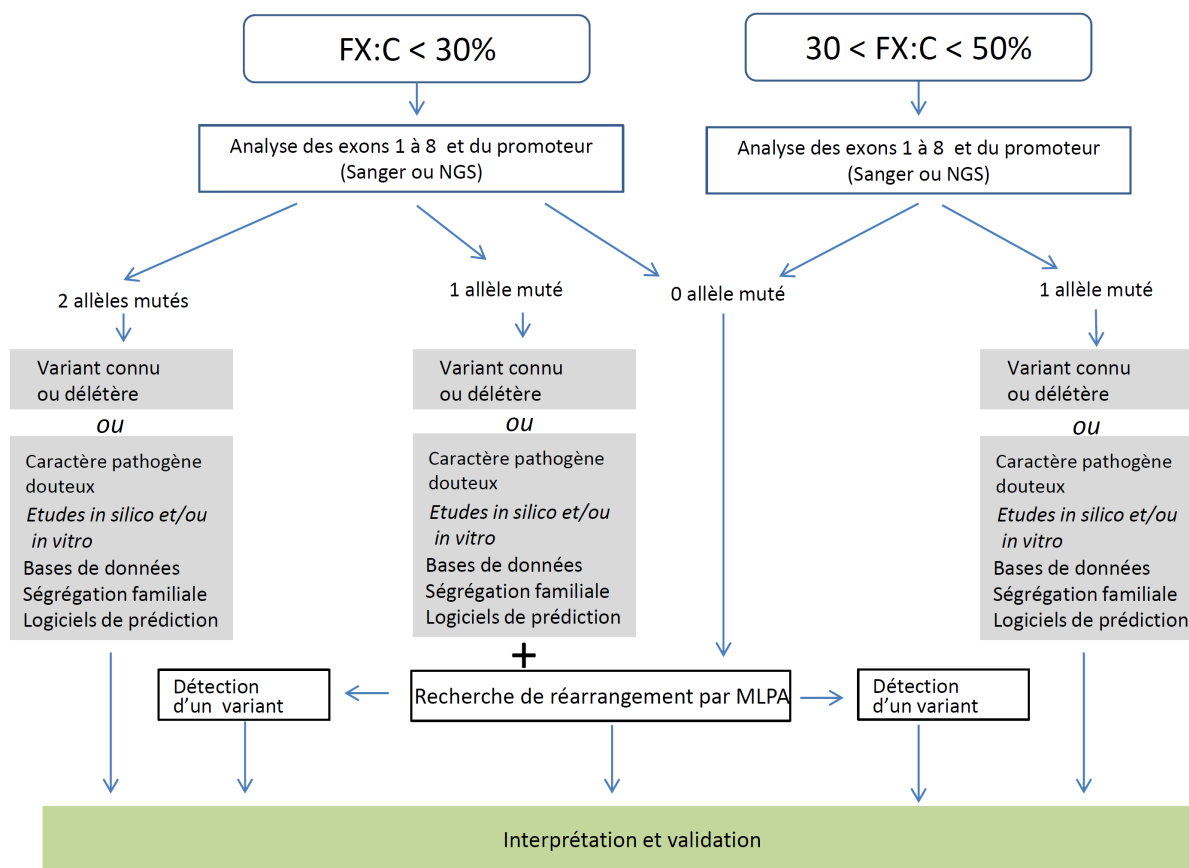
En absence d'identification de variant causal par séquençage selon Sanger ou NGS des exons et régions flanquantes, la recherche de grandes insertions/délétions doit être réalisée Selon la technique NGS utilisée, les grands réarrangements peuvent être directement mis en évidence. Cependant, ils devront être confirmés par une technique Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) ou QMPSF. En l'absence d'anomalie détectée, l'existence de variants dans les introns ou régions régulatrices pourra être envisagée mais relève du domaine de la recherche.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 35/58

Numéro de version : 2.0

### Stratégie d'étude du gène F10 (Déficit constitutionnel en FX de la coagulation)



#### 2- Les apparentés

Une fois la (les) variation(s) pathogène(s) du cas index identifiée(s), seul(s) l'exon (ou les exons) concerné(s) seront analysé(s).

### IV-Cotation pour l'étude des gènes F10

#### CAS INDEX:

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger	N906 x 5	BHN 570 x5
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 36/58

Numéro de version : 2.0

### APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger	N906	BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870
Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intra-cérébrales périnatales pouvant justifier un DPN	4082	B500

## REFERENCES

- (1) Bonhomme F, Schved JF, Giansily-Blaizot M, Samama CM, de Moerloose P. Déficiets rares de la coagulation et gestes invasifs. Annales françaises d'Anesthésie et de Réanimation, 2013 ; 32 : 198-205.
- (2) Herrmann FH, Auerswald G, Ruiz-Saez A, Navarrete M, Pollmann H, Lopaciuk S, Batorova A, Wulff K; Greifswald Factor X Deficiency Study Group. Factor X deficiency: clinical manifestation of 102 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 10 gene. Haemophilia, 2006 ;12 :479-489.
- (3) Karimi M, Menegatti M, Afrasiabi A, Sarikhani S, Peyvandi F. Phenotype and genotype report on homozygous and heterozygous patients with congenital factor X deficiency. Haematologica, 2008 ; 93 : 934-938.
- (4) Wieland K, Millar DS, Grundy CB, Mibashan RS, Kakkar VV, Cooper DN. Molecular genetic analysis of factor X deficiency: gene deletion and germline mosaicism. Hum Genet, 1991 ;86 :273-278.
- (5) Menegatti M, Karimi M, Garagiola I, Mannucci P, Peyvandi F. A rare inherited coagulation disorder: combined homozygous factor VII and factor X deficiency. Am J Hematol, 2004 ;77 :90-91.

### Principales databases du gène *F10*

<https://f10-db.eahad.org/>  
<http://www.hgmd.org>

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 37/58

Numéro de version : 2.0

### ANNEXES

#### Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage FX en France

Laboratoires	Correspondants (courriel + téléphone)	
Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Européen George Pompidou (Paris)	Pr. Dominique Helley <a href="mailto:dominique.helley@aphp.fr">dominique.helley@aphp.fr</a> Dr Sophie Gandrille <a href="mailto:sophie.gandrille@parisdescartes.fr">sophie.gandrille@parisdescartes.fr</a>	01 56 09 39 05
Département d'Hématologie Biologique, Hôpital Saint-Éloi (Montpellier)	Dr Muriel Giansily-Blaizot <a href="mailto:m-giansily@chu-montpellier.fr">m-giansily@chu-montpellier.fr</a>	04 67 33 70 31
Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire, Hôpital Ambroise Paré (Boulogne-Billancourt)	Pr. Philippe De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a>	01 49 09 55 30
Service d'hémostase bio-clinique CHU de Rennes - Hôpital Pontchaillou	Dr Benoit Guillet <a href="mailto:benoit.guillet@chu-rennes.fr">benoit.guillet@chu-rennes.fr</a>	02 09 28 24 10

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 38/58

Numéro de version : 2.0

### F- Stratégies d'études du gène *F7* et *F10* impliqués dans le déficit combiné constitutionnel en FVII+X de la coagulation

#### I-Introduction

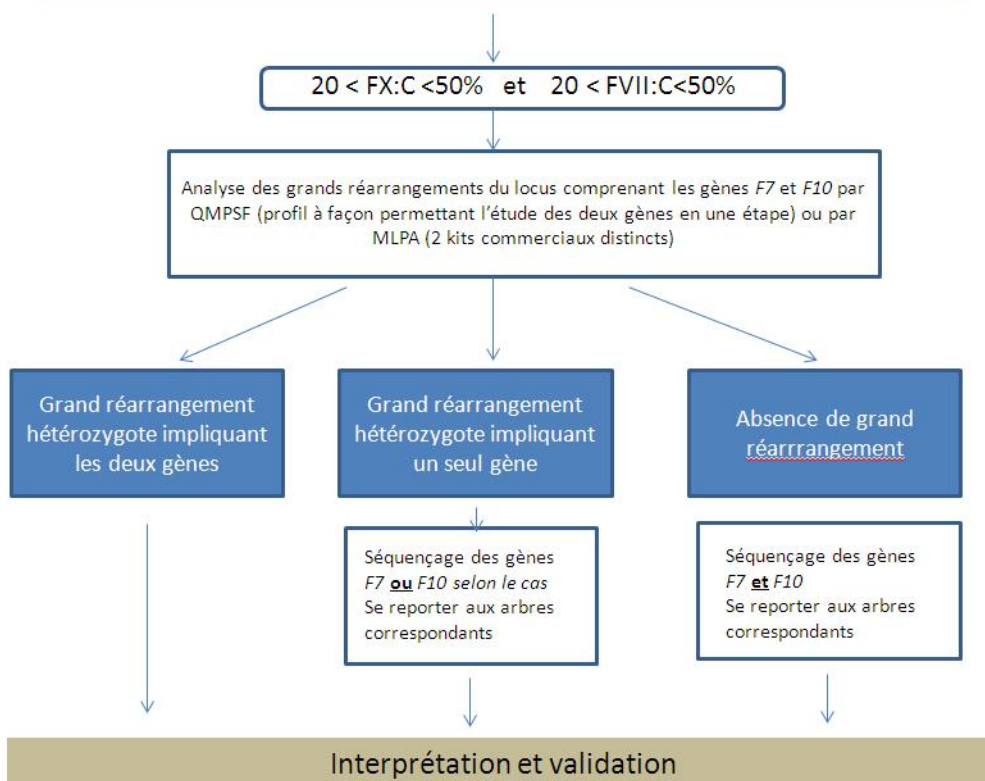
Le gène *F7* est situé sur le chromosome 13, à seulement 2,8 kilo-bases en amont du gène *F10*, et s'étend sur 12800 bases. Il est donc possible qu'une délétion même peu étendue, implique ces deux gènes. Le diagnostic sera évoqué devant une diminution conjointe des taux de FVII et de FX

Trois cas de figures sont possibles (1) :

- association fortuite de deux variations de séquence ponctuelles
- association fortuite d'une variation ponctuelle et d'un grand réarrangement
- grand réarrangement impliquant les gènes *F7* et *F10*

#### II-Arbre décisionnel d'étude des déficits combinés en FVII et FX

##### Stratégie d'étude des déficits combinés en FVII et FX de la coagulation



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 39/58

Numéro de version : 2.0

### IV-Cotation pour l'étude du déficit combiné FVII+FX, recherche de grands réarrangements

#### CAS INDEX:

Recherche de réarrangement par MLPA N318 BHN 870

#### APPARENTES: Recherche ciblée :

Recherche de réarrangement par MLPA N318 BHN 870

Se reporter aux chapitres correspondants (*F7* et *F10* respectivement) en cas d'association fortuite de déficit en FVII et en FX.

### REFERENCES

(1) Pavlova A, Preisler B, Driesen J, de Moerloose P, et al. Congenital combined deficiency of coagulation factors VII and X--different genetic mechanisms. *Haemophilia*. 2015 May;21(3):386-91.

### ANNEXES

#### Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le la recherche de déficits combinés en FVII +FX en France

Depuis 2017, le diagnostic est proposé au département d'hématologie biologique du CHU de Montpellier:

Laboratoires	Correspondants (courriel + téléphone)	
Département d'hématologie biologique, hôpital Saint-Éloi (Montpellier)	Dr Muriel Giansily-Blaizot <a href="mailto:m-giansily@chu-montpellier.fr">m-giansily@chu-montpellier.fr</a>	04 67 33 70 31

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 40/58

Numéro de version : 2.0

### G- Stratégies d'études du gène *F11* impliqué dans le déficit constitutionnel en FXI de la coagulation

#### I-Introduction

##### Description et mode de transmission

Le déficit en FXI se caractérise essentiellement par des hémorragies provoquées: chirurgie de la sphère ORL et des voies urinaires. Les hémarthroses, hématomes et hémorragies intra-cérébrales sont très rares. Il n'existe pas de corrélation fiable entre les taux de FXI :C et le risque hémorragique. L'analyse génétique ne permet pas à ce jour d'orienter le clinicien sur un risque accru ou non.

Le mode de transmission est autosomique récessif. Les taux inférieurs à 25% s'expliquent en général par 2 allèles atteints et les taux entre 25et 60% par un allèle atteint.Les valeurs seuils données ici sont révisables selon l'évolution des connaissances.

Sur le plan thérapeutique, il existe un traitement spécifique à base de FXI humain (HEMOLEVEN®). Cependant ce traitement comprend plusieurs mises en garde. Le facteur Hemoleven® ne doit pas être utilisé à une posologie supérieure à 30UI/kg en raison d'un risque d'activation de la coagulation et de thrombose. Il existe un risque non négligeable de développer des anticorps dirigés contre le FXI limitant ensuite les possibilités de traitement (Salomon *et al* 2006, Gomez *et al* 2008).

##### Pathologie moléculaire

Le spectre mutationnel est large (cf. <http://www.factorxi.org/> ou <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/> ou <https://f11-db.eahad.org/> pour les bases de données des anomalies moléculaires) sans variation prépondérante à l'échelle de la France, expliquant le recours à l'analyse d'emblée de l'ensemble des exons. Il s'agit majoritairement de variations ponctuelles avec une forte proportion de variations dites privées décrites dans une seule famille. Tous les types de variations ponctuelles sont représentés avec une prépondérance importante des variants faux-sens (plus de 80% des cas), Quelques anomalies moléculaires des sites d'épissage ou délétions ou insertions ponctuelles sont décrites. Les variants faux-sens sont répartis sur l'ensemble des exons. Cependant, les délétions emportant un ou plusieurs exons et échappant à une détection par Sanger ne sont pas exceptionnelles.

##### Noms et références des gènes

Déficit en FXI, N° OMIM : #612416, N° ORPHANET : ORPHA329, gène *F11* :NM\_000128.3 et NP\_000119.1  
Localisation sur le chromosome 4 : NC\_000004.12 (186265945..186289681assembly GRCh38).



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 41/58

Numéro de version : 2.0

### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

Pour ce gène, il n'existe pas de répartition en niveau 1 ou 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine car il n'y a pas d'anomalie moléculaire prépondérante permettant un premier dépistage de niveau 1.

#### 1°) Les cas index

Il n'est pas recommandé de réaliser une analyse lorsque le taux de FXI :C est supérieur à 55%. Les valeurs seuils données ici sont révisables selon l'évolution des connaissances.

Bien qu'il existe une classification en fonction de la présence ou non d'antigène circulant (CRM+ et CRM-), la détermination préalable de cet antigène n'est pas utile.

A l'échelle de la population Française dans son ensemble, il n'existe pas de hot spot. Le séquençage d'emblée (selon Sanger ou NGS) des 15 exons est donc indiqué.

En absence d'identification du variant causal par séquençage ( 5% des déficits quantitatifs) des exons et régions flanquantes, la quantification des copies d'allèles sera réalisée par une méthode adaptée : MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), QF-PCR (*Quantitative Fluorescence – polymerase chain reaction*), QMPFS (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments*) ou NGS (*Next Generation Sequencing*). En l'absence d'anomalie détectée, l'existence de variations de séquence pathogènes dans les introns ou régions régulatrices pourra être envisagée mais relève du domaine de la recherche.

Enfin, si besoin, une approche complémentaire par l'étude fonctionnelle *ex vivo* de l'ARN et /ou minigènes pourrait être réalisée dans des laboratoires experts. Cependant, il n'y a pas à court terme de projet d'étude fonctionnelle *ex vivo* de l'ARN et /ou de mini-gènes.

La rareté des déficits quantitatifs n'a pas permis (et ne justifie pas) la création d'un réseau offrant une couverture nationale homogène selon un rationnel simple.

#### 2°) Les apparentés

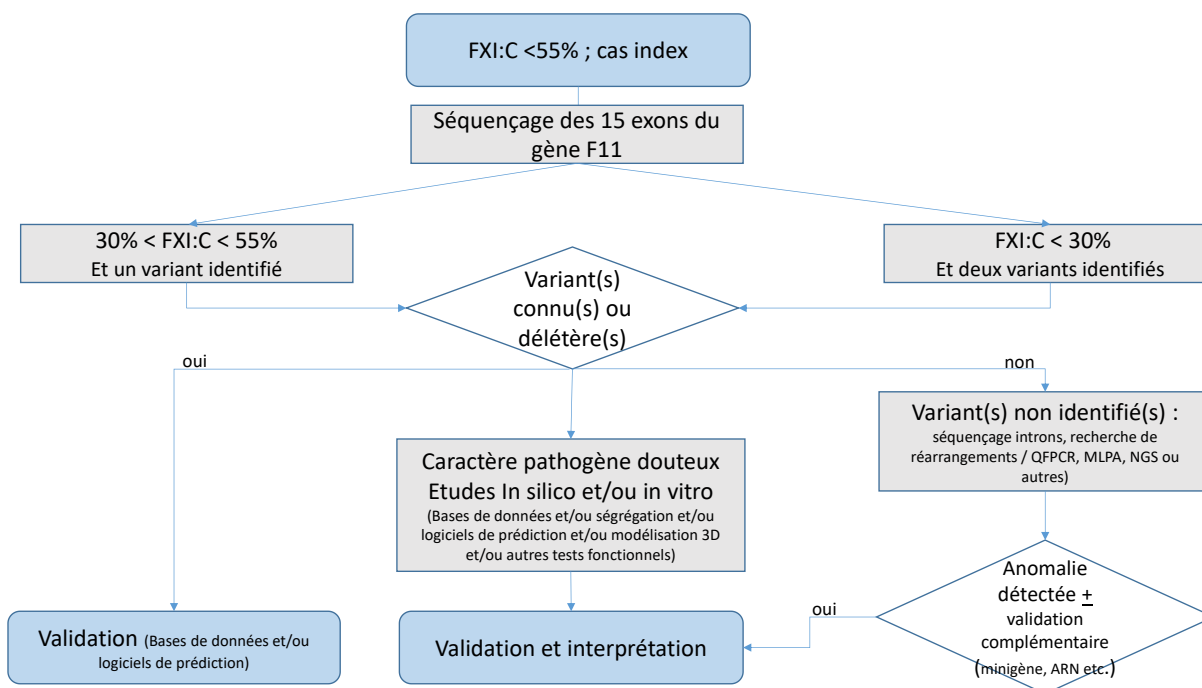
Une fois le (les) variant(s) du cas index identifiée(s), seul(s) l'exon (ou les exons) concerné(s) seront analysé(s).

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 42/58

Numéro de version : 2.0

### III-Arbres décisionnels des études du gène F11



### IV-Cotation pour l'étude des gènes F11

#### CAS INDEX:

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger	N906 x 5	BHN 570 x5
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

#### APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
--	------	---------

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : **ANPGM\_135**  
 Page 43/58

Numéro de version : **2.0**

Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906		BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

### REFERENCES

Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. Haemophilia. 2008Nov;14(6):1183-9.

Salomon O, Steinberg DM, Seligshon U. Variable bleeding manifestations, characterize different types of surgery in patients with severe factor XI, deficiency enabling parsimonious use of replacement therapy. Haemophilia. 2006 Sep;12(5):490-3.

### ANNEXES

#### Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage FXI en France

Laboratoire spécialisé	Coordonnées mail + téléphone	
Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré Boulogne Billancourt	Pr. P. De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a>	01 49 09 55 30

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 44/58

Numéro de version : 2.0

### H- Stratégies d'études des gènes *F13A* et *F13B* impliqués dans le déficit constitutionnel en FXIII de la coagulation

Le facteur XIII est un zymogène, et sa forme activée, le facteur XIIIa (FXIIIa), est une transglutaminase qui catalyse la dernière étape de la coagulation en créant des liaisons covalentes entre la fonction amide de glutamines d'une molécule de fibrine et la fonction aminée de lysines d'une molécule de fibrine adjacente. La constitution de ces covalences entre les mono- puis polymères de fibrine stabilise le caillot. La protéine circulante est constituée de deux sous unités A (catalytiques) et deux sous unité B (de transport). Le déficit en FXIII ne perturbe pas les tests globaux de la coagulation, rendant son diagnostic difficile. En cas de déficit, le caillot est instable et une symptomatologie hémorragique est présente. Parmi les signes cliniques ont été répertoriés :

- Des saignements des tissus mous et des muscles, lors d'accouchement, ou encore après une chirurgie ou un traumatisme, souvent retardés, des ecchymoses. Le saignement à la chute du cordon ombilical est quasi pathognomonique<sup>4</sup> et est présent dans 50 à 80% des cas, les hémorragies intra articulaires sont quant à elles beaucoup plus rares (20%),
- Des hémorragies intracrâniennes qui surviennent dès l'enfance, même sans choc à la tête, elles sont très fréquentes (25%) et menaçantes, elles justifient le traitement préventif au long cours.

Malgré cette relative richesse sémiologique, le déficit en facteur XIII est souvent méconnu, et il est parfois fait rétrospectivement, ou indirectement chez des membres de la famille, à l'issue d'AVC plus tardif et fatal. En pratique un nombre non négligeable de sujets arrivent à l'âge adulte sans que le diagnostic soit porté. Les femmes en âge de procréer sont alors exposées à une complication supplémentaire qui est la survenue de fausses couches à répétition, qui en absence de traitement par injection de FXIII, concernent jusqu'à 70% des patientes atteintes de déficit en sous-unité A. Enfin, la cicatrisation retardée concernerait 15% des patients.

A noter que de multiples pathologies sont susceptibles d'induire des déficits acquis en Facteur XIII.

#### Description et mode de transmission

Le déficit constitutionnel en Facteur XIII concernerait une personne sur 5 à 6 millions en France.

Le mode de transmission est autosomique récessif et le spectre mutationnel est large sans anomalie moléculaire prépondérante mais la quasi-totalité des variations concerne le gène *F13A1*. Les variations pathogènes ou potentiellement pathogènes du gène *F13B* sont très rares.

Sur le plan thérapeutique, Il n'y a pas de consensus sur une prophylaxie systématique chez les patients asymptomatiques. En cas de grossesse, il est recommandé de traiter et de viser un taux supérieur à 15%, le niveau de preuve de cette recommandation est faible.

<sup>4</sup> Ce signe se voit aussi dans les afibrinogénémies mais dans ce cas le bilan standard de coagulation est perturbé

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 45/58

Numéro de version : 2.0

### Pathologie moléculaire

Plusieurs dizaines d'anomalies moléculaires différentes ont été répertoriées dans les banques de données et la littérature recensée sur la base de données accessible à l'adresse suivante : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>. Il s'agit majoritairement de variations ponctuelles avec une forte proportion de variations dites privées décrites dans une seule famille. Tous les types de variations ponctuelles sont représentés: variants non-sens, faux-sens, anomalies moléculaires des sites d'épissage, délétion ou insertion ponctuelle décalant ou non le cadre de lecture. Les variants faux-sens sont les plus fréquents, répartis sur l'ensemble des exons. Les variants en cause portent quasi exclusivement sur le gène *F13A1* codant la sous unité catalytique. Les variants portant sur le gène *F13B* codant la sous unité de transport sont très rares, peut-être en raison des taux résiduels circulants de FXIII suffisants pour limiter la symptomatologie et donc l'exploration d'un déficit potentiel (dans un tiers des cas le déficit en FXIIIB) est accompagnée d'un taux résiduel de FXIIIA (compris entre 5 et 40%). En raison de la rareté du déficit en sous unité B, les laboratoires dont l'approche repose sur le séquençage selon Sanger étudieront d'abord le gène *F13A1*, et limiteront l'exploration de *F13B* aux cas où aucune anomalie n'aura été identifiée sur *F13A1*.

### Noms et références des gènes

Déficit en FXIII, N° OMIM : 613225 et 134570, N° ORPHANET : ORPHA121665 et ORPHA121668,

Gène *F13A1* : NM\_000 129.3 et NP\_000 120.2 Localisation sur le chromosome 6 : NC\_000006.11 (6144311 ...6320924, complement, assembly GRCh38)

Gène *F13B* OMIM 134580 ; ORPHA 121668 ; coordonnées NC\_000001.10 (197007877 ...197036568, complement, assembly GRCh38)

### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

La rareté des déficits quantitatifs n'a pas permis (et ne justifie pas) la création d'un réseau offrant une couverture nationale homogène selon un rationnel simple.

#### 1°) Les cas index

Il n'est pas recommandé de réaliser une analyse lorsque les taux de FXIII sont supérieurs à 40%. Cette valeur seuil est révisable selon l'évolution des connaissances.

A l'échelle de la population Française dans son ensemble, il n'existe pas de hot spot. Bien que les déficits sévères soient presque constamment associés à une anomalie moléculaire sur *F13A1*, le taux ne permet pas d'orienter de façon fiable vers un déficit en sous unité A (gène *F13A1*) ou en sous unité B (gène *F13B*). Cependant, la rareté des altérations du gène *F13B* justifie l'exploration du seul gène *F13A1* dans un premier temps, en cas d'approche basée sur le séquençage selon Sanger. Une approche NGS permet d'analyser les deux gènes *F13A1* et *F13B* simultanément.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 46/58

Numéro de version : 2.0

En absence d'identification de variant causal sur *F13A1* par séquençage selon Sanger des exons et régions flanquantes, une exploration du gène *F13B* sera entreprise. Si l'exploration du second gène reste non conclusive, la quantification des copies d'allèles et/ou exons par QF-PCR<sup>5</sup> (*Quantitative Fluorescence – polymerase chain reaction*), QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments*) de *F13A1*, ou l'exploration par NGS (*Next Generation Sequencing*) avec une méthode adaptée).

Il n'y a pas à court terme de projet d'étude fonctionnelle ex vivo de l'ARN et /ou de mini-gènes.

La rareté des déficits n'a pas permis (et ne justifie pas) la création d'un réseau offrant une couverture nationale homogène selon un rationnel simple.

### **2°) Les apparentés**

Une fois la (les) variation(s) pathogène(s) du cas index identifiée(s), seul(s) l'exon (ou les exons) concerné(s) seront analysé(s).

**3°) Le diagnostic prénatal** est réalisable, exclusivement en cas de risque de déficit sévère, si les variations causales des parents sont identifiées.

## III-Arbres décisionnels des études des gènes *F13A* et *F13B*

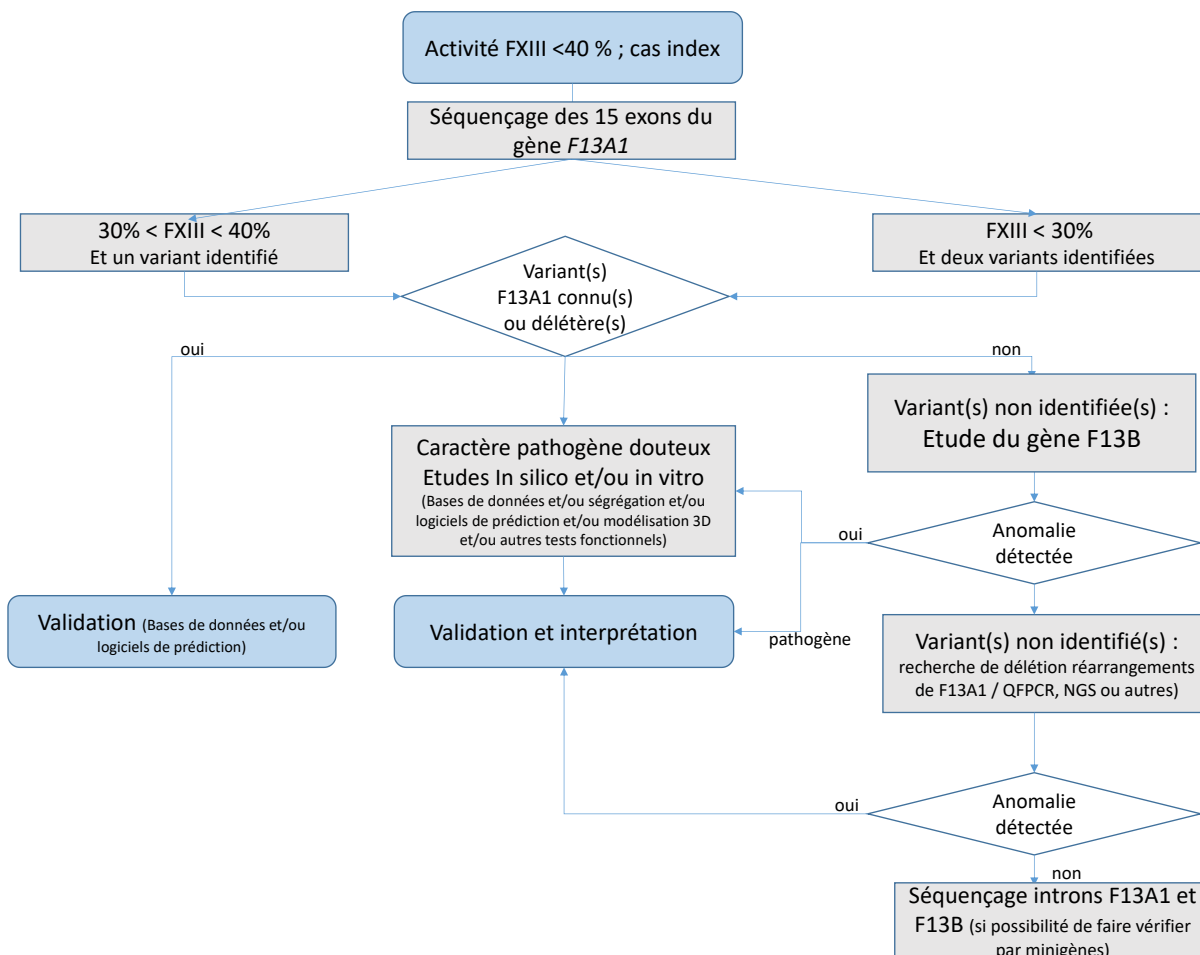
---

<sup>5</sup> La MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) n'est pas disponible pour ces gènes.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 47/58

Numéro de version : 2.0



ATTENTION : le séquençage des introns des gènes *F13A1* et *F13B* relève du domaine de la recherche scientifique.

### IV-Cotation pour l'étude des gènes *F13A1* et *F13B*

**CAS INDEX:**

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger	N906 x 5	BHN 570 x5
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : **ANPGM\_135**  
Page 48/58

Numéro de version : **2.0**

### APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906		BHN 570
Recherche de 2 variants dans des amplicons différents préalablement identifiés par Sanger	N906 x2	BHN 570 x2
Recherche de réarrangement par MLPA	N318	BHN 870
Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intra-cérébrales périnatales pouvant justifier un DPN	4082	B500

## REFERENCES

Karimi M, Berezky Z, Cohan N, Muszbek L. Factor XIII Deficiency. *SeminThrombHemost*, 2009 ; 35 :426–438

## ANNEXES

### Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage FXIII en France

Laboratoires spécialisés	Coordonnées mail + téléphone
Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré Boulogne Billancourt	Pr. P. De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a> 01 49 09 55 30



## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 49/58

Numéro de version : 2.0

### I- Stratégies d'études des gènes *GGCX* et *VKORC1* impliqués dans le déficit constitutionnel combiné en facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants.

Ce document décrit l'arbre décisionnel décrivant les différentes étapes à suivre pour l'étude moléculaire des gènes codant la gamma-glutamyl carboxylase (*GGCX*, 2p12), et la sous unité 1 du complexe vitamine K époxyde réductase (*VKORC1*, 18p11.2), impliqués dans le déficit héréditaire combiné en facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants.

#### I-Introduction

##### Description et mode de transmission

Le déficit héréditaire combiné en facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants (VKCFD) est une maladie hémorragique rare autosomique récessive. Elle est consécutive à la diminution du taux des facteurs de la coagulation II, VII, IX et X et des protéines C, S. Elle est caractérisée par une hétérogénéité génétique.

Deux phénotypes de VKCFD sont caractérisés : un phénotype de type 1 (VKCFD1) qui est associé à une hétérozygotie composite du gène *GGCX* codant la gamma-glutamyl carboxylase [1-5], ou à des variants pathogènes présents à l'état homozygote dans un contexte consanguin [6-8].

Le phénotype de type 2 (VKCFD2) est lui associé à des variants pathogènes du gène *VKORC1* codant la sous unité 1 du complexe vitamine K époxyde réductase [9-11].

Ces deux enzymes sont impliquées dans le cycle de la vitamine K et permettent la modification post-traductionnelle des protéines Gla, pré-requis nécessaire à leurs fonctions hémostatiques [12]. L'altération des gènes *GGCX* et *VKORC1* entraîne une sous-carboxylation et une réduction des activités des protéines Gla.

La présentation clinique commune de VKCFD est une hémorragie sévère avec épisodes hémorragiques intracrâniens dans les premières semaines de vie ou dans l'enfance, mais le degré du déficit pouvant être très variable, elle peut être d'apparition plus tardive, voire révélée par un déficit acquis concomitant en vitamine K exacerbant le déficit inné, comme par exemple l'altération de la flore intestinale consécutive à une prise d'antibiotique.

Les symptômes cliniques du VKCFD varient principalement avec les concentrations en protéines pro-coagulantes. Le spectre de manifestations hémorragiques attachées au VKCFD est donc large.

Dans la période après la naissance, un VKCFD peut apparaître cliniquement identique aux maladies hémorragiques acquises du nouveau-né.

Un phénotype de *pseudoxanthoma elasticum-like disorder* (PXE-like disorder) caractérisé par des anomalies du développement, cardiaques, squelettiques et/ou dermatologiques est aussi souvent associé au VKCFD de type 1 [13-16]. Sur la trentaine de variants pathogènes décrits, treize sont associées au PXE-like disorder.

Si cela reste une étiologie rare, un VKCFD doit être envisagé dans le diagnostic différentiel des chondrodysplasies ponctuées avec brachytéléphalangie, en particulier lors de l'association de signes hémorragiques à une minéralisation anormale généralisée de la colonne vertébrale [17].

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 50/58

Numéro de version : 2.0

Le premier cas phénotypique d'hémorragie issu d'un déficit congénital en gamma-carboxylation a été décrit par McMillan and Roberts en 1966 [18]. Et le premier cas caractérisé génétiquement l'a été en 1998 par Brenner et al [6]. Depuis, seulement quelques cas additionnels ont été rapportés, répertoriés dans une revue les regroupant [19].

Le mode de transmission est autosomique récessif et le spectre mutationnel large et majoritairement constitué de variations de séquence privées.

La prévalence en France est estimée à moins de 1/1 000 000 d'individus mais l'hétérogénéité attachée à ce désordre fait qu'il est certainement sous-estimé.

Sur le plan thérapeutique, les épisodes hémorragiques issus de VKCFD sont généralement traités par administration de vitamine K *per os* ou *IV*. En cas de chirurgie ou d'hémorragie sévère, les concentrés de complexe prothrombinique humain (PPSB) ou de plasma frais congelé humain sont recommandés. D'autres options alternatives, comme le facteur VII activé recombinant (NOVOSEVEN®), peuvent être associées à la supplémentation en vitamine K.

Le pronostic d'ensemble est bon et, grâce aux options thérapeutiques disponibles, le déficit n'a qu'un faible retentissement sur la qualité de vie des patients[20].

### Pathologie moléculaire

Le spectre mutationnel est large sans anomalie moléculaire prépondérante à l'échelle de la France.

Pour *GGCX* (VKCFD1), une trentaine de variants en cause ont été décrits et

Pour *VKORC1*, (VKCFD2), seulement deux cas décrits[9, 11].

### Noms et références des gènes

Déficit combiné en facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants : ORPHA98434

- OMIM 277450 pour le phénotype VKCFD1, gène *GGCX* locus MIM 137167, 2p12, NC\_000002.12 (85544855..85561534, complement, assembly GRCh38)
- OMIM 607473 pour le phénotype VKCFD2, gène *VKORC1* locus MIM 608547, 16p11.2, NC\_000016.10 (31090854..31094955, complement, assembly GRCh38)

### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

En 2021, le Département d'Hématologie biologique du CHU de Montpellier a été rejoint par le Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire du CHU Boulogne-Billancourt pour réaliser en France le génotypage *GGCX* et *VKORC1*.

Pour ces gènes, il n'existe pas de répartition en niveaux 1 et 2 selon la classification proposée par l'Agence de la biomédecine car il n'existe aucun variant pathogène prépondérant définissant des *hot spot* permettant un dépistage en escalier.

Pour garantir une offre de soin homogène selon un rationnel simple, les laboratoires ne réalisant pas les génotypages *GGCX* et *VKORC1* doivent adresser pour étude un prélèvement de sang total ou d'ADN à l'un des laboratoires experts.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 51/58

Numéro de version : 2.0

Parmi ces 2 laboratoires, aucun ne réalise le diagnostic prénatal.

### III-Arbre décisionnel d'étude des gènes *GGCX* et *VKORC1*

Cet arbre décisionnel est validé au sein du réseau des laboratoires GENOSTASE.

#### **A- Stratégie d'étude des patients déficitaires en facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants**

1 - Devant un tableau hémorragique, les indications de l'étude doivent exclure les causes acquises et idiopathiques de déficit en vitamine K, ou tout autre déficit congénital isolé, à savoir :

- maladie hémorragique du nouveau-né
- régime carencé en vitamine K
- malabsorption intestinale en vitamine K, primaire (maladie inflammatoire intestinale, ou maladie cœliaque), ou secondaire à des diarrhées, fibrose kystique, a-betalipoprotéïnémie
- production déficitaire en vitamine K par la flore intestinale
- traitement médicamenteux et intoxication : ingestion par le patient ou par une femme enceinte au troisième trimestre (dans le cas d'hémorragies néonatales intracrâniennes) : warfarine, superwarfarines (raticide), rifampicine, isoniazide, céphalosporines, phénytoïne, barbituriques
- Une fonction de synthèse du foie altérée.
- Liste non exhaustive

2 - Les indicateurs sont :

- majoritairement les tests d'hémostase qui révèlent un temps de Quick (TQ) et un temps de céphaline activé (TCA) allongés, le temps de thrombine étant normal.

- La diminution des niveaux d'activité en FII, FVII, FIX, et FX et en protéines C, S pour au moins deux d'entre eux (< 30 %, cette valeur seuil étant révisable selon l'évolution des connaissances). Contrairement aux déficiences en facteurs de la coagulation où les protéines/Ag peuvent être diminuées ou absentes, dans les VKCFD, les facteurs II, VII, IX et X et PC, PS sont présentes mais fonctionnellement défectueuses.

- la correction partielle de l'activité de ces protéines après administration de vitamine K, bien que la réponse à une supplémentation en vitamine K est très variable.

- L'identification de protéines mal carboxylées par le test immunologique PIVKA-II (*protein induced in vitamin K absence-II*) qui évalue l'activité déficitaire en vitamine K, la mesure de la vitamine K dans le plasma, ou de la vitamine K epoxide après supplémentation dans les VKCFD2. Mais aucun des tests n'est spécifique des déficits congénitaux et ne permet de les distinguer des déficits acquis en vitamine K.

3 – Seul, le génotypage de *GGCX* (13 kb) et *VKORC1* (5 kb) par séquençage Sanger ou NGS permet d'établir un diagnostic en qualifiant son origine héréditaire.

#### **1°) Les cas index**

L'examen est recommandé devant un phénotype hémorragique, quand la diminution du taux d'au moins deux facteurs de la coagulation vitamine K dépendants est effective (<30%)

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : **ANPGM\_135**  
 Page 52/58

Numéro de version : **2.0**

Il s'agit de patients hétérozygotes composites ou homozygotes. On s'attend donc à identifier deux allèles mutés.

A l'échelle de la population française, il n'existe pas de *hot spot* des anomalies moléculaires, le séquençage d'emblée selon NGS (ou Sanger) des exons *GGCX* et *VKORC1* et leurs régions flanquantes est donc indiqué.

### **2°) Les apparentés**

Une fois la (les) variant(s) pathogène(s) du cas index identifié (s), seul(s) l'amplicon (ou les amplicons) concerné(s) seront analysé(s).

### **B-Stratégie du Diagnostic Prénatal du déficit combiné VKCFD**

L'examen génétique prénatal n'est en général pas recommandé sauf en cas de décès d'un 1<sup>er</sup> enfant par hémorragies cérébrales. Un conseil génétique peut être proposé aux familles. Cependant, le pronostic d'ensemble est souvent bon et, grâce aux options thérapeutiques disponibles, le déficit n'a qu'un faible retentissement sur la qualité de vie des patients.

## IV-Cotation pour l'étude des gènes *VKORC1* et *GGCX*

### **CAS INDEX :**

- Analyse par séquençage NGS N350 RIHN3270
- Analyse alternative possible (hors workflow) par séquençage Sanger :
  - o Gène *GGCX* N906x5 RIHN2850
  - o Gène *VKORC1* N906x4 RIHN2280

### **APPARENTES au diagnostic** (hors étude de ségrégation familiale, recherche ciblée) :

- Forfait recherche chez apparenté d'une mutation identifiée par NGS N353 RIHN720
- Analyse d'un apparenté après identification de mutations par NGS, digénisme ou récessif sur 2 amplicons différents : N353 + N906 RIHN 1290
- Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906 RIHN570
- Cas particulier : Etude familiale en cas de risque d'hémorragies intra-cérébrales périnatales pouvant justifier un DPN 4082 B500

## REFERENCES

1. Darghouth, D., et al., *Compound heterozygosity of novel missense mutations in the gamma-glutamyl-carboxylase gene causes hereditary combined vitamin K-dependent coagulation factor deficiency*. Blood, 2006. **108**(6): p. 1925-31.
2. Lunghi, B., et al., *Novel phenotype and gamma-glutamyl carboxylase mutations in combined deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors*. Haemophilia, 2011. **17**(5): p. 822-4.
3. Rost, S., et al., *Compound heterozygous mutations in the gamma-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors*. Br J Haematol, 2004. **126**(4): p. 546-9.
4. Rost, S., et al., *Founder mutation Arg485Pro led to recurrent compound heterozygous *GGCX* genotypes in two German patients with VKCFD type 1*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2006. **17**(6): p. 503-7.

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : **ANPGM\_135**  
 Page 53/58

Numéro de version : **2.0**

5. Titapiwatanakun, R., et al., *Novel splice site mutations in the gamma glutamyl carboxylase gene in a child with congenital combined deficiency of the vitamin K-dependent coagulation factors (VKCFD)*. *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **53**(1): p. 92-5.
6. Brenner, B., et al., *A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors*. *Blood*, 1998. **92**(12): p. 4554-9.
7. Soff, G.A. and J. Levin, *Familial multiple coagulation factor deficiencies. I. Review of the literature: Differentiation of single hereditary disorders associated with multiple factor deficiencies from coincidental concurrence of single factor deficiency states*. *Semin Thromb Hemost*, 1981. **7**(2): p. 112-48.
8. Suttie, J.W., *Vitamin K-dependent carboxylase*. *Annu Rev Biochem*, 1985. **54**: p. 459-77.
9. Fregin, A., et al., *Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16*. *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3229-32.
10. Oldenburg, J., et al., *Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex*. *Thromb Haemost*, 2000. **84**(6): p. 937-41.
11. Rost, S., et al., *Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2*. *Nature*, 2004. **427**(6974): p. 537-41.
12. Wu, S.M., et al., *Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1634-6.
13. Le Corvaisier-Pieto, C., et al., *[Generalized pseudoxanthoma elasticum combined with vitamin K dependent clotting factors deficiency]*. *Ann Dermatol Venereol*, 1996. **123**(9): p. 555-8.
14. Li, Q., et al., *Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms*. *Exp Dermatol*, 2009. **18**(1): p. 1-11.
15. Li, Q., et al., *Co-existent pseudoxanthoma elasticum and vitamin K-dependent coagulation factor deficiency: compound heterozygosity for mutations in the GGCX gene*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(2): p. 534-40.
16. Vanakker, O.M., et al., *Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(3): p. 581-7.
17. Mathonnet A, Cunat S, et al *GGCX-related congenital combined vitamin K-dependent clotting factors deficiency-1: Description of a fetus with chondrodysplasia punctata*. *Am J Med Genet A* 2021; sept 24. doi: 10.1002/ajmg.a.62503
18. McMillan, C.W. and H.R. Roberts, *Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. Report of a case*. *N Engl J Med*, 1966. **274**(23): p. 1313-5.
19. Watzka, M., et al., *Bleeding and non-bleeding phenotypes in patients with GGCX gene mutations*. *Thromb Res*, 2014. **134**(4): p. 856-65.
20. Napolitano, M., G. Mariani, and M. Lapecorella, *Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors*. *Orphanet J Rare Dis*, 2010. **5**: p. 21.

### Principales bases de données des gènes **GGCX** et **VKORC1**

Aucune base de données génétiques dites locus spécifique pour les anomalies moléculaires associées au VKCFD n'est disponible.

## ANNEXES

### 1 Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage **FVII** en France

Laboratoires	Correspondants (courriel + téléphone)
Département d'Hématologie biologique, Hôpital Saint Éloi (CHU Montpellier)	Dr Séverine Cunat <a href="mailto:s-cunat@chu-montpellier.fr">s-cunat@chu-montpellier.fr</a> 04 67 33 70 31
Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire, Hôpital Ambroise Paré (Boulogne-Billancourt)	Pr Philippe de Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a> 01 49 09 55 30

### 2 – Chercheur et autre laboratoire européen portant un intérêt particulier au VKCFD :

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 54/58

Numéro de version : 2.0

Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg - Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine  
University Clinic Bonn - Sigmund-Freud-Str. 25 - 53127 Bonn, Germany  
Email: [johannes.oldenburg@ukb.uni-bonn.de](mailto:johannes.oldenburg@ukb.uni-bonn.de)  
[www.ukb.uni-bonn.de/ihf](http://www.ukb.uni-bonn.de/ihf)  
Source : [www.orphanet.org](http://www.orphanet.org)

### 3 - Modèle de Feuille de renseignement clinico-biologique utilisée au CHU de Montpellier



<b>DEPARTEMENT D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE</b> Pr Patricia AGUILAR-MARTINEZ	
<b>ACTIVITE DE GENETIQUE CONSTITUTIONNELLE</b>	
Pr Patricia AGUILAR-MARTINEZ	Secrétariat : 04 67 33 70 31/33
Dr Muriel GIANZILY-BLAIZOT	Fax : 04 67 33 70 36
Dr Séverine CUNAT	

Identité du patient (étiquette) Nom : ..... Nom de naissance : ..... Prénom : ..... Né(e) le : ..... / ..... / ..... Sexe: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Nom du médecin prescripteur : ..... Signature	Hôpital : ..... Service : ..... Ville : ..... Tél. : ..... Date d'envoi : ..... / ..... / .....	Préleveur: ..... Tél.: ..... Date: ..... / ..... / ..... Heure : .....
---	---	---	--

*Feuille de demande à compléter et à joindre impérativement au prélèvement (1 formulaire par patient)*

<b>Déficits combinés en facteurs vitamine K-dépendants</b> <b>génotypage VKCFD1 (gène GGX) et/ou VKCFD2 (gène VKORC1)</b>	
<b>Indication</b> <input type="checkbox"/> Déficit combiné en facteurs vitamine K-dépendants <input type="checkbox"/> Enquête familiale <input type="checkbox"/> Autre, préciser : .....	
<b>Données cliniques et biologiques</b> Date du diagnostic et/ou âge auquel le diagnostic a été fait : ..... Circonstances du diagnostic : <input type="checkbox"/> fortuit <input type="checkbox"/> syndrome hémorragique <input type="checkbox"/> enquête familiale	
<b>Paramètres biologiques</b> Temps de QUICK : ____ sec (témoin : ____ sec) Dosages des facteurs : FII ____ %    FVII ____ %    (FIX ____ %)    FX ____ %    FV ____ % Age auquel les facteurs ont été dosés : ____	
<b>Traitement substitutif ou autre</b> <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non si oui, préciser : .....	
<b>Données familiales</b> Autre cas sévère dans la famille <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Consanguinité <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Origine ethnique : ..... ATCD familiaux : .....	

Cadre réservé au laboratoire N° ADN : ..... Date de réception : ..... ID technicien réception : ..... Nature du prélèvement : ..... Nombre de tubes : .....	<b>INFORMATIONS POUR LE PRESCRIPTEUR</b> <b>Modalités de prélèvement et d'envoi :</b> - Sang veineux sur EDTA : adulte 2x5 mL ; enfant 5 mL - Etiqueter chacun des tubes, les conserver à température ambiante ou à +4°C - Ne pas congeler <b>Documents obligatoires à joindre :</b> <input type="checkbox"/> cette feuille de demande complétée <input type="checkbox"/> l'attestation de consultation et de recueil de consentement (ou la copie du consentement écrit) des examens des caractéristiques génétiques formulaires types disponibles sur demande <input type="checkbox"/> le bon de commande si demande extérieure
--	--

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 55/58

Numéro de version : 2.0

### J- Stratégies d'études des gènes *LMAN1* et *MCFD2* impliqués dans le déficit constitutionnel combiné en FV et VIII de la coagulation.

#### I-Introduction

##### Description et mode de transmission

Le déficit combiné en facteurs V et VIII de la coagulation (F5F8D) est une maladie hémorragique rare (1 cas pour 10<sup>6</sup>) caractérisée par des taux bas de facteur V et de facteur VIII plasmatiques (entre 5 et 20% habituellement) associés à une tendance hémorragique modérée.

Elle est due à des mutations dans les gènes *LMAN1* (lectin mannose binding protein) et/ou *MCFD2* (multiple coagulation factor deficiency 2)<sup>6</sup>, codant respectivement pour ERGIC-53 et pour MCFD2, deux protéines constituant le complexe de transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi impliqué dans le transport intracellulaire des facteurs V et VIII.

Le mode de transmission est autosomique récessif.

Sur le plan thérapeutique, le traitement des épisodes hémorragiques est basé sur :

- l'apport de facteur V par du plasma frais congelé (PFC)
- l'apport de facteur VIII, soit par le PFC, soit par des desmopressine ou encore des concentrés de facteur VIII.

Les anomalies moléculaires de *MCFD2* induisent habituellement des taux plus faibles de facteurs V et VIII que les anomalies moléculaires de *LMAN-1*. *LMAN-1* est une lectine spécifique du mannose, tandis que *MCFD2* est une protéine à domaine EF qui forme un complexe hétéromérique calcium-dépendant avec *LMAN-1*. Ce complexe sert de récepteur cargo pour le transport, entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi pour les facteurs V et VIII et sans doute d'autres glycoprotéines. La formation de ce complexe est inhibée par des variants faux-sens dans le domaine EF de *MCFD2*. Le domaine B du facteur VIII intervient dans les interactions avec ce complexe (1).

##### Noms et références des gènes

*LMAN-1*, N° OMIM : #227300, N° ORPHANET : ORPHA 35909, gène *LMAN1* : NM\_005570.3?et NP\_005561.1 Localisation sur le chromosome 18 issue 108 : NC\_000018.9 (56995055 ...57026508, complement, assembly GRCh38)

*MCFD2*, N° OMIM : #613625, N° ORPHANET : ORPHA 35909, gène *MCFD2* : NG\_016428.2, Plusieurs transcrits sont décrits, NM\_139279 = variant 1. Les variants 1, 2, 3 et 4 codent la même isoforme A NP\_NP\_644808.1

<sup>6</sup>Neerman-Arbez M, Johnson KM, Morris MA, McVey JH, Peyvandi F, Nichols WC, Ginsburg D, Rossier C, Antonarakis SE and Tuddenham EG. Molecular analysis of the ERGIC-53 gene in 35 families with combined factor V-factor VIII deficiency. Blood 93 (7), 2253-2260 (1999)

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 56/58

Numéro de version : 2.0

Localisation sur le chromosome 2 : NC\_000002.11 (47129009 ...47168994, complement, assembly GRCh38)

### II-Organisation de la prise en charge des études génétiques au sein des réseaux de laboratoires

#### 1°) Les cas index

Il n'est pas recommandé de réaliser une analyse lorsque les taux de FV :C ou FVIII :C sont supérieurs à 55%. Cette valeur seuil est révisable selon l'évolution des connaissances.

A l'échelle de la population Française dans son ensemble, il n'existe pas de hot spot. Bien qu'il existe une orientation, en fonction des taux de FV :C et FVIII :C, sur le gène impliqué (LMAN1 et MCFD2) bon nombre d'anomalies moléculaires mettent ce raisonnement en défaut. Le séquençage d'emblée (selon Sanger ou NGS) de tous les exons codants des deux gènes est donc indiqué.

En absence d'identification de variant causal par séquençage (moins de 5% des déficits quantitatifs) des exons et régions flanquantes, la quantification des copies d'allèles sera réalisée par une méthode adaptée: QF-PCR<sup>7</sup> (*Quantitative Fluorescence – polymerase chain reaction*), QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments*) ou NGS (*Next Generation Sequencing*) dans des laboratoires dits de niveaux 2 selon la classification proposée par l'agence de la Biomédecine.

En l'absence d'identification de grand réarrangement et après avis d'un centre expert, le séquençage des introns peut être envisagé dans le cadre d'une recherche scientifique.

En fonction du contexte familial on privilégiera l'approche par PCR quantitative (plusieurs cas atteints dans la famille) ou au contraire le NGS (un seul cas, auquel cas on utilisera une méthode basée sur l'approche NGS d'un panel de gènes incluant *F5* et *F8* et autorisant un dosage génique).

Il n'y a pas à court terme de projet d'étude fonctionnelle ex vivo de l'ARN et /ou de mini-gènes.

La rareté des déficits quantitatifs n'a pas permis (et ne justifie pas) la création d'un réseau offrant une couverture nationale homogène selon un rationnel simple.

#### 2°) Les apparentés

Une fois la (les) anomalie(s) moléculaire(s) du cas index identifiée(s), seul(s) l'exon (ou les exons) concerné(s) seront analysé(s).

<sup>7</sup> La MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) n'est pas disponible pour ces gènes.

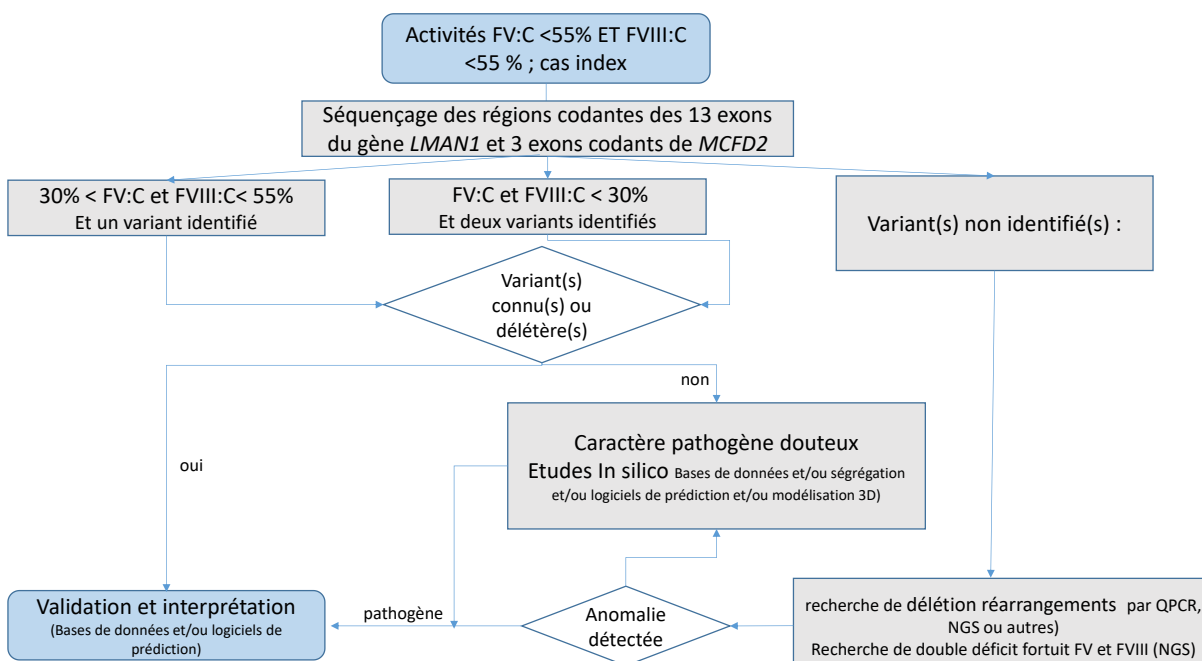


## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 57/58

Numéro de version : 2.0

### III-Arbres décisionnels des études des gènes *LMAN1* et *MCFD2*



### IV-Cotation pour l'étude des gènes *LMAN1* et *MCFD2*

**CAS INDEX:**

Analyse par séquençage NGS	N350	BHN 3270
Analyse par séquençage Sanger ( <i>LMAN1</i> )	N906 x 5	BHN 570 x5
Analyse par séquençage Sanger ( <i>MCFD2</i> )	N906 x 5	BHN 570 x5

**APPARENTES hors étude de la ségrégation familiale au diagnostic: Recherche ciblée :**

Recherche d'un variant ou plusieurs variants initialement identifié(s) par NGS	N353	BHN 720
--	------	---------

## Stratégies d'études des gènes impliqués dans les déficits constitutionnels rares en facteurs de la coagulation (hors hémophilies A et B et Maladie de Willebrand)

Référence : ANPGM\_135  
Page 58/58

Numéro de version : 2.0

Recherche d'un variant préalablement identifié par Sanger N906 BHN 570

Recherche de 2 variants dans des amplicons différents  
préalablement identifiés par Sanger N906 x2 BHN 570 x2

### ANNEXES

#### 1- Liste et coordonnées des laboratoires réalisant le génotypage FV+VIII en France

Laboratoire spécialisé	Coordonnées mail + téléphone	
Laboratoire de Biochimie et de Génétique moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré Boulogne Billancourt	Pr. P. De Mazancourt <a href="mailto:philippe.de-mazancourt@uvsq.fr">philippe.de-mazancourt@uvsq.fr</a>	01 49 09 55 30