



Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 1/8
Numéro de version : 1

Date de Création : **21/01/2013**

Date de la remise à jour : **05/07/2013**

	Nom	Hôpital	Date
Rédacteur(s)	Claude Houdayer pour les groupes épissage Unicancer et ANPGM	Institut Curie, Paris	14/12/2012
Approbateur(s)	Conseil D'Administration		26/06/2013

Groupe Unicancer : Mario Tosi, Florence Coulet, Sylvie Mazoyer, Olga Sinilnikova, Violaine Bourdon, Myriam Bronner , Etienne Rouleau, Françoise Bonnet, Marine Guillaud Bataille, Sophie Krieger, Mélanie Leone, Danielle Muller, Audrey Remenieras, Françoise Révillon, Monique Buisson, Joanna Sokolowska, Pascaline Gaildrat , Cédric Lefol, Alexandra Martins, Christophe Blondel, Alexandra Martins, Virginie Moncoutier

Groupe ANPGM : Corinne Collet, Lydie Burglen, Christine Bellanne-Chantelot, Dominique Bozon, Cécile Rouzier, Sylvie Tuffery-Giraud, Caroline Raynal, Pascaline Gaildrat, Catherine Costa, Fabienne Dufernez, Béatrice Parfait, Patricia Fergelot, Marie-Pierre Buisine, Nelly Burnichon, Frédéric Bilan, Anne-Sophie Lebre, Christel Vaché, Alix de Becdelievre, Laurence Jonard, Malek Louha, Dominique Vidaud, Martine Raynaud



**Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de
signification inconnue sur l'épissage**

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 2/8
Numéro de version : 1

SOMMAIRE

1- Eligibilité des variants aux études ARN

2- Locaux

3- Recueil du sang pour analyse ARN

4- Stockage des prélèvements

5- Extraction des ARNs

6- Stockage des ARNs et ADNc

7- Transcription inverse

8- Analyse

9- Validation technique

10- Interprétation

9- Compte-Rendus

Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 3/8
 Numéro de version : 1

Préambule:

Il est recommandé d'avoir au préalable une bonne connaissance de l'épissage et des transcrits alternatifs du gène testé, par l'expérience et les données de la littérature.

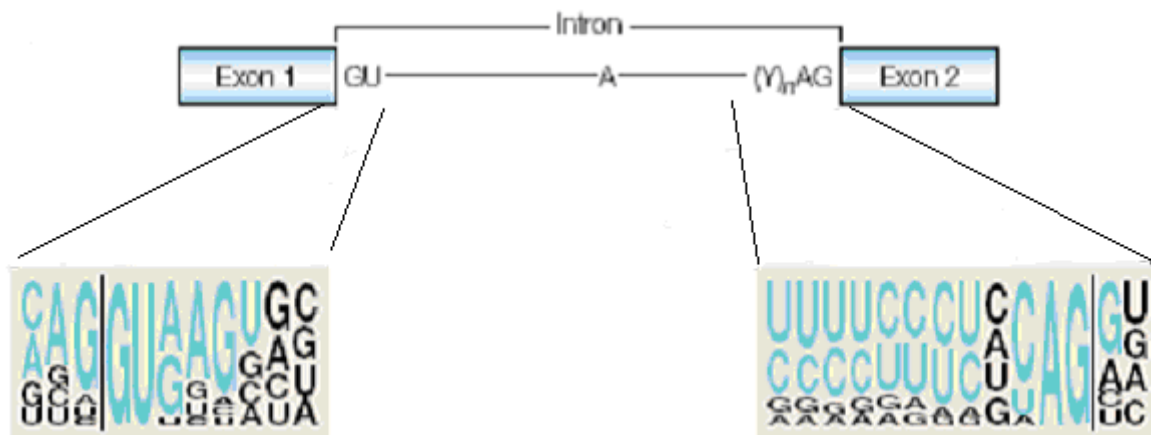
Le terme de « transcrits » sera utilisé dans le document pour désigner les ARN messagers du gène testé

1- Eligibilité des variants aux études ARN.

La prise de décision se fait par analyse in silico à l'aide de l'outil MaxEntScan (MES) couplé ou non à d'autres algorithmes [voir par exemple l'outil Human Splicing Finder-HSF (<http://www.umd.be/HSF/>) qui les intègre]. MES est basé sur l'utilisation d'une matrice poids-position et d'un modèle de Markov. Il prend ainsi en compte les dépendances entre positions adjacentes et non adjacentes et assigne un score à des motifs de 9 pb (site donneur 5') ou de 23 pb (site accepteur 3'). Plus le score est haut, meilleure est la probabilité qu'il s'agisse d'un site physiologique d'épissage. Afin de fiabiliser les analyses in silico, il est recommandé de s'intéresser aux variations de score plutôt qu'aux scores par eux-mêmes. Les sites donneurs et accepteurs non canoniques, par exemple « GC » représentant 1% des sites donneurs annotés, [Sahashi et al. Nucleic Acids Res. 2007;35(18):5995-6003] ne sont pas reconnus par ces algorithmes et demandent une évaluation spécifique..

1a. variants situés dans les zones consensus d'épissage 5' et 3'

Ces zones consensus sont représentées ci-dessous [d'après Cartegni et al, Nat Rev Genet 3 :285-298, 2002]



Pour ces sites, un algorithme décisionnel est proposé ci-dessous (Figure 2).

Le score du mutant doit être au moins inférieur de 15% au site sauvage pour considérer la modélisation comme positive soit une sensibilité de 96% et une spécificité de 83% [Houdayer et al, Hum Mutat 33(8) :1228-1238, 2012]. Un deuxième niveau de filtration (optionnel) peut être utilisé avec SSF.

Attention : pour les sites sauvages de faible score, le pouvoir discriminant baisse et le pourcentage de seuil ne s'applique plus. A titre indicatif, un seuil de robustesse peut être approché (moyenne des scores pour les différents exons du gène -2SD). Il convient de noter que les valeurs expérimentales manquent pour valider ce seuil sur tous les gènes.

Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : BP-ANPGM_004

Page : 4/8
Numéro de version : 1

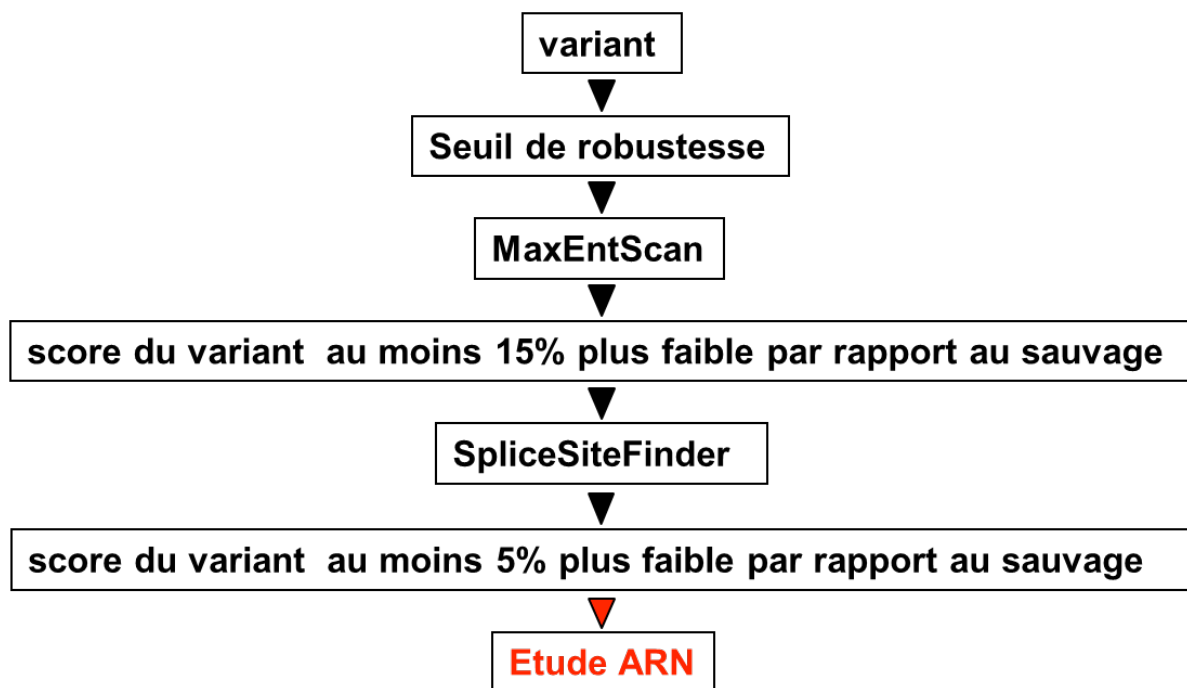


Figure 2. Proposition d'algorithme décisionnel

1b. variants situés hors des zones consensus d'épissage 5' et 3'

La création d'un site de novo peut être prise en compte si son score atteint au minimum 80% du site sauvage correspondant. Ceci doit être interprété en cohérence avec la position des sites donneurs et accepteurs sauvages.

N.B. : L'outil MaxEntScan (MES) ne permet pas d'appréhender l'impact sur les sites de régulation de l'épissage dits auxiliaires (activateurs et répresseurs exoniques et introniques, ESE, ISE etc...) contrairement à HSF qui intègre les résultats de différentes matrices (ESEfinder, RESCUE ESE, ...). Néanmoins l'apport de ces prédictions pour l'interprétation des variants dans un contexte diagnostique reste limité à ce jour.

Notes:

-le groupe ne recommande pas l'utilisation de ces outils in silico pour classer les variants comme délétères ou neutres. Ils ne peuvent être utilisés que pour l'aide à la décision pour demander une étude de transcrits et/ou pour être interprétés avec d'autres arguments clinico-biologiques.

-cas des variations aux dinucléotides « canoniques » AG/GT : on convient que les données de la littérature sont suffisantes pour les classer comme altérant l'épissage mais leur retentissement phénotypique peut dépendre du type de transcrit(s) aberrant(s) généré(s): saut d'exon en phase ou non, présence de sites cryptiques à proximité dont l'utilisation permet de maintenir ou non une phase ouverte de lecture dans le transcrit mature, présence de plusieurs types de transcrits, ... La recherche des sites cryptiques potentiels peut être faite à l'aide par exemple de MES, HSF ou d'outils plus spécifiques (ex : CRYP-SKIP (<http://www.dbass.org.uk/cryp-skip/>)).



Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 5/8
Numéro de version : 1

2-locaux

Pas de recommandation de zones dédiées ARN. En revanche, un jeu de pipettes dédié est nécessaire, et le respect des recommandations classiques vis à vis de la manipulation de l'ARN (protection contre les Rnases) est préconisé.

3-Recueil du sang pour analyse ARN

Le prélèvement sanguin peut être réalisé sur stabilisateur (type PAXgene, mais non limité à), sur héparine ou ACD ou autre tube citraté pour établissement d'une lignée lymphoblastoïde (LL) voire sur EDTA mais dans ce cas les délais de conservation doivent être définis par chaque laboratoire. Le Paxgene propose une « photographie » de l'état des transcrits au moment du prélèvement. Il permet de rechercher, via un variant codant, la présence des deux allèles ou un éventuel déséquilibre. Si le NMD n'est pas total, Paxgene permet de caractériser l'anomalie. La LL, qui peut être cultivée avec et sans inhibiteur du NMD (puromycine, ou autre agent ayant des propriétés identiques), offre les conditions optimales pour caractériser le défaut d'épissage cependant son utilisation pose des problèmes d'infrastructure et de coût.

Note :

Pour les autres types de prélèvements (biopsies par exemple), se référer aux procédures spécifiques.

4-Stockage des prélèvements

Paxgene : suivant les recommandations du fournisseur. Un point important est un bon mélange au moment du prélèvement.

LL : traitement dans les 48h avec possibilité de sauvegarde par congélation des lymphocytes en DMSO.

EDTA : traitement dans la journée, à valider par chaque laboratoire.

Note :

Pour les autres types de prélèvements, se référer aux procédures spécifiques.

5-Extraction des ARNs

Pas de recommandations sur l'extraction car nous n'avons pas d'arguments pour rejeter une méthode (techniques multiples). Dans tous les cas, les recommandations du fabricant doivent être respectées. Le point clef est le contrôle qualité de l'ARN. Pour ce qui est de la contamination génomique, le traitement à la DNase est optionnel si plusieurs introns sont inclus dans le fragment amplifié. Le contrôle de la qualité doit se faire par une DO 260nm/280nm et un gel agarose (ou puce ARN dédiée) pour évaluer une éventuelle dégradation non objectivée par la DO. Les deux sous unités 28S/18S doivent être visibles.

Si l'ARN est dégradé, un nouveau prélèvement est nécessaire. En effet, la dégradation de l'ARN peut amener à l'observation de transcrits aberrants générés *in vitro*.

6-Stockage des ARNs et ADNc

ARN à -80°C, ADNc au moins à -20°C. On recommande de conserver les ARNs en aliquots sans limitation dans le temps, mais un contrôle de qualité est indispensable avant utilisation (voir ci-dessus). L'aliquotage des ADNc est recommandé pour éviter les cycles de congélation/décongélation.

7- Transcription inverse



Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 6/8
Numéro de version : 1

Pas de recommandations sur la transcription inverse car nous n'avons pas d'arguments pour rejeter une méthode (techniques multiples). Le contrôle de l'ADNc se fait à l'étape d'amplification PCR. Les amorces doivent être dessinées selon les règles habituelles avec une contrainte supplémentaire pour au moins l'une d'entre elles: dessin à cheval sur deux exons ou au moins éloignées de deux exons (par exemple exons 1 et 3 pour explorer exon 2). Il faut souligner que l'étape de dessin d'amorces est cruciale pour mettre en évidence l'ensemble des transcrits et un double jeu d'amorces peut être nécessaire.

8-Analyse

Migration électrophorétique puis séquençage impératif du produit. S'il y a plus de deux bandes, purification et isolement sont recommandés (transcrits alternatifs, plusieurs isoformes anormales). Les recommandations applicables au séquençage sont à suivre [voir le guide Unicancer _ANPGM sur le dossier de validation ISO 15189 de la méthode de Sanger].

9-Validation technique :

Un témoin normal au minimum doit être inclus. Un résultat positif doit être confirmé à partir d'une seconde RT ou au mieux à partir d'une seconde extraction d'ARN si le matériel est disponible.

10-Interprétation

Les recommandations générales pour l'interprétation des **variants introniques** sont représentées ci-dessous (Figure 3)(NMD : *nonsense mediated decay*). La lignée lymphoblastoïde est à utiliser si elle est pertinente en termes d'expression.

Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 7/8
Numéro de version : 1

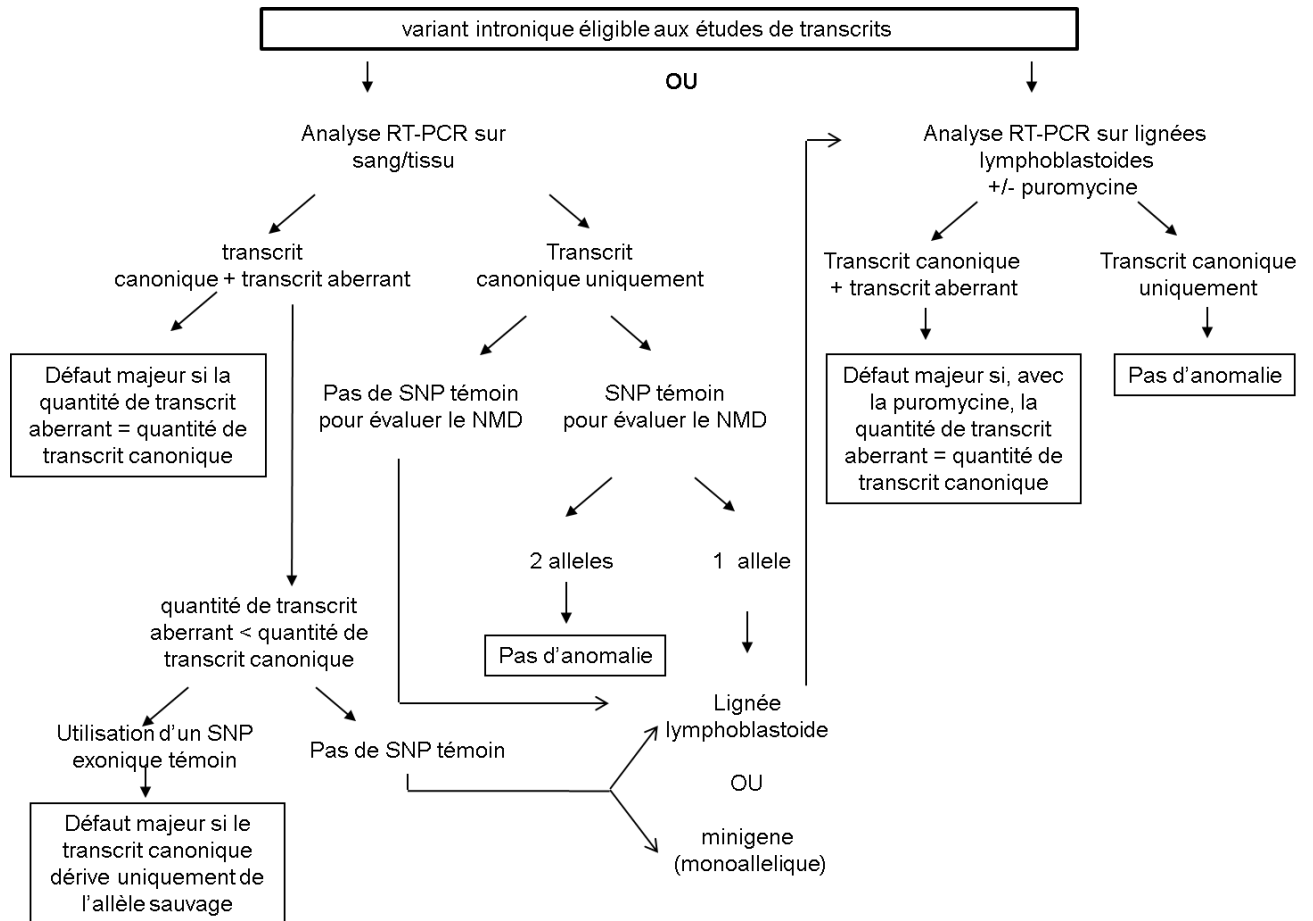


Figure 3. Recommandations générales pour l'interprétation d'un variant intronique

L'effet d'un **variant exonique** s'estime en regardant son niveau dans le transcrit muté et en vérifiant s'il est détecté ou non dans la séquence du (des) produit(s) de RT-PCR de taille normale (transcrit canonique).

3 classes d'impact : on se cantonne à l'impact sur l'épissage sans tenir compte des autres données. Ces classes sont ensuite à intégrer dans une interprétation plus globale c'est-à-dire le caractère hors phase ou en phase, les domaines fonctionnels voire un algorithme plus complexe.

Classe 1S : pas d'effet sur l'épissage avec normes qualité respectées c'est à dire 2 allèles sans déséquilibre en séquence dans les deux sens, avec comparaison au génomique ou se référer aux figures 2 et 3 pour les variants introniques.

Classe 2S : i) effet sur l'épissage mais touche un exon alternatif et/ou en phase sans altération de domaine fonctionnel évident ii) effet sur l'épissage mais l'allèle muté code aussi pour du transcrit de taille normale (effet partiel). Dans ces cas, des investigations complémentaires sont nécessaires (en *cis* ou en *trans* d'une mutation sévère, ségrégation familiale, données tumorales etc.)



Conduite de l'étude des ARN messagers pour évaluer l'impact qualitatif d'un variant de signification inconnue sur l'épissage

Référence : **BP-ANPGM_004**

Page : 8/8
Numéro de version : 1

Classe 3S : impact délétère : l'allèle muté ne code que pour du transcrit aberrant (hors phase ou/et en phase avec altération d'un domaine fonctionnel) ou effet partiel mais en accord avec le phénotype (ex Duchenne/Becker).

9- Compte-Rendus :

Quand un nouveau prélèvement est nécessaire pour mener l'étude ARN, on recommande un premier CR décrivant le variant génomique et mentionnant l'indication d'une étude ARN sur la base des prédictions *in silico* nécessitant un nouveau prélèvement.

Il faut décrire l'anomalie en nucléotides « c. » avec éventuellement le codon touché, le « p. » avec l'anomalie putative.

Pour le résultat de l'analyse des transcrits : utiliser la nomenclature HGVS spécifique de l'ARN : le « r. », lettres minuscules, et les recommandations pour décrire la présence de différents transcrits.

Une phrase explicative claire et le type cellulaire testé (au niveau type échantillon) doit être ajoutée pour expliquer la nature et l'origine des transcrits détectés.

Il doit être mentionné si le résultat de l'analyse des transcrits est utilisable ou non pour le conseil génétique.

On recommande un CR final reprenant l'intégralité des explorations menées pour le patient, c'est-à-dire avec le résultat génomique et le résultat ARN. Il est important de dissocier la description théorique de l'anomalie génomique de la description obtenue après analyse de transcrits.