

**Aspects biologiques et moléculaires
de l'hémophilie A**

**Biological and molecular aspects
of haemophilia A**

**الأسس الجزيئية
لمرض الناعور "أ"**

A. Masrar, N. Benkirane Agoumi

ملخص :

يعتبر الناعور "أ" من الأمراض النزيفية الوراثية أو الطارئة الذي يحمل من طرف الصبغية X وينتج عن نقصان في العامل VIII للتخثر. اخترنا التطرق للأسس الجزيئية للناعور "أ" مع التركيز على الانقلاب الطفري في الجين المسؤول تقريبا عن نصف الحالات الخطيرة للمرض، ضف لذلك تيسير التشخيص الجيني للمرض حاليا.

الكلمات الأساسية : الناعور، العامل VIII، التشخيص الجيني.

Résumé :

L'hémophilie A est une maladie hémorragique constitutionnelle, héréditaire ou sporadique, de transmission récessive liée au chromosome X, définie par le déficit en facteur VIII coagulant.

Dans ce travail, nous proposons une mise au point sur les aspects moléculaires et phénotypiques de l'hémophilie A. En effet, les données sur le gène et le FVIII coagulant sont rapportées. Le cas particulier de l'inversion de l'intron 22 et plus récemment l'inversion de l'intron 1 sont à l'origine de près de la moitié des cas de l'hémophilie A sévère. Les autres anomalies sont représentées respectivement par les substitutions ponctuelles, les délétions et les insertions. La stratégie actuelle du diagnostic de la forme sévère de la maladie s'est considérablement simplifiée depuis la description de l'inversion commune.

Mots-clés : hémophilie A, gène et protéine FVIII.

Abstract :

Haemophilia A is a recessive constitutional, hereditary or sporadic, transmission hemorrhagic illness bound to the X chromosome and definite by the deficiency of coagulation factor VIII.

We propose in this work the molecular and phenotypic aspects of the haemophilia A. The data on the gene and the FVIII protein are reported. The particular case of the inversion of the intron 22 and more lately the inversion of the intron 1 are at the origin of nearly the half of the severely cases of hemophilia A. The other anomalies are represented respectively by the singles substitutions, deletions and insertions. The present diagnosis strategy of the severe form of the illness simplified itself considerably since the description of the common inversion.

Key-words : haemophilia A, gene and FVIII protein.

Tiré à part : A. Masrar : laboratoire d'hématologie, hôpital Ibn Sina CHU de Rabat - Maroc.

Introduction

L'hémophilie A est une affection hémorragique constitutionnelle, héréditaire ou sporadique, de transmission récessive liée au chromosome X, due à un déficit en facteur VIII coagulant [1]. Son incidence est de 1 à 2 pour 10000 naissances masculines, l'hémophilie féminine est exceptionnelle [2]. L'hétérogénéité moléculaire de la maladie est suggérée par sa diversité d'expression clinique et phénotypique [3]. Les formes sévères (43% des cas) sont caractérisées par un taux de facteur antihémophilique A inférieur à 2%. Les formes modérées (26%) et mineures (31%) présentent respectivement 2-5% et 5-25% de facteur antihémophilique A.

L'objectif de ce travail est de faire le point sur les données biologiques du FVIII coagulant, sur les aspects moléculaires du gène FVIII et sur la stratégie actuelle de diagnostic de la maladie.

Du gène FVIII à la protéine

Deux firmes, Genetech et Genetic Institute, entreprirent avec succès le clonage du gène humain FVIII et leurs résultats furent publiés en novembre 1984 [4].

Le gène FVIII

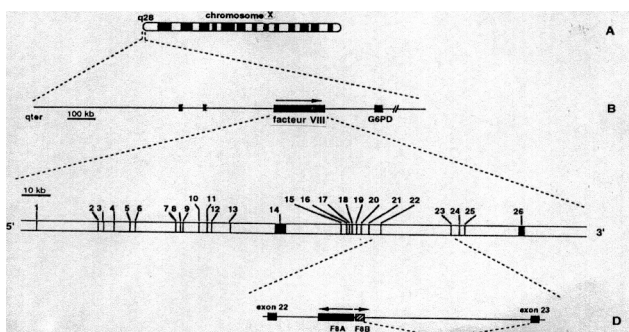


Figure 1 : Structure du gène FVIII [5]

A : Chromosome X ;

B : Localisation du gène FVIII à 1Mb du Xqter, les 2 séquences homologues à F8A sont représentées ;

C : Le gène FVIII avec les 26 exons intercalés des 25 introns ;

D : L'intron 22 avec les 2 transcrits F8A et F8B.

Le gène FVIII se localise au niveau de la bande distale du bras long du chromosome X (Xq28), il s'étend sur 186 Kb. La partie codante se répartit en 26 exons, la longueur des exons varie de 69 à 262 nucléotides sauf pour l'exon 14 et l'exon 26 qui font respectivement 3106 et 1958 nucléotides. Les introns sont au nombre de 25, leur longueur varie de 207 à 32400 pb [5].

L'intron 22 mesure 32400 pb et renferme deux transcrits dont leurs fonctions et produits protéiques potentiels sont

aujourd'hui inconnus [6]. Le premier transcrit nommé F8A fait 1,8 Kb et possède deux séquences homologues au niveau du télomère Xq à environ 400 Kb du gène FVIII, le second transcrit F8B mesure 2,5 Kb.

Après épissage, les exons du gène FVIII sont rassemblés en un messager de 9029 pb, la partie codante est constituée de 7053 pb, la région non codante en 5' fait 170 pb et celle en 3' mesure 1805pb. Dans la région 3', on trouve la séquence AATAAA correspondant à la queue polyA qui intervient dans la polyadénylation ou processing du RNAm. [7].

Le FVIII coagulant

Le FVIII présente une concentration plasmatique physiologique de 100 à 200 ng/ml et une activité spécifique de 2 à 5 UI/mg. Sa synthèse se fait principalement au niveau de l'endothélium. Le RNAm n'a pas été détecté dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale, de la moelle osseuse, du thymus et dans les lymphocytes périphériques. Au niveau la circulation sanguine, le FVIII est stabilisé par le facteur Von Willebrand (vWF), la demi-vie du complexe FVIII/vWF est d'environ 12 heures, celle du FVIII libre n'est que de 2,4 heures [8,9].

Le messager code pour une protéine de 2351 acides aminés. Après retrait des premiers 19 acides aminés correspondant au peptide signal (PS), la protéine mature ne fait que 2332 acides aminés présentant une masse moléculaire de 264763 Da, la différence entre cette valeur est celle trouvée pour la protéine native en gel de polyacrylamide en présence du SDS (330 KD) résulte de la glycosylation [10].

L'analyse de la séquence a montré que la protéine est composée de trois types de domaines (A, B, C) dont A et C sont répétés (Figure 2). Les trois domaines A sont A1 (1-329), A2 (380-711) et A3 (1649-2019), ils présentent une homologie d'environ 30% entre eux. Les domaines A2 et A3 sont séparés par un domaine B (740-1648) codé, presque

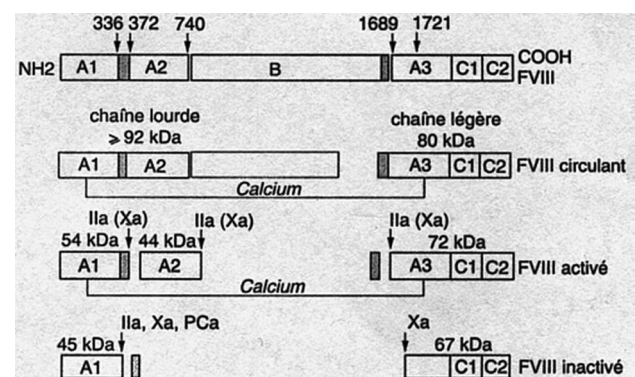


Figure 2 : Structure, activation et inactivation du FVIII. [1]

Les flèches indiquent les niveaux d'activités protéolytiques de la thrombine, du FXa, de la PCa.

totalement par l'exon 14 et contient 19 des 25 sites potentiels de glycosylation sur les Asn. Les deux domaines C répartis entre 2020-2172 (C1) et 2173-2332 (C2), présentent une homologie d'environ 40 % entre eux. Par ailleurs, d'autres séquences riches en résidus Glu et Asp, sont aussi rapportées, la première est localisée entre A1 et A2 (331-372) et la seconde entre B et A3 (1648-1689) [1,5].

Au niveau de la circulation, le FVIII initialement synthétisé sous forme d'une chaîne simple, se transforme en hétérodimère composé d'une chaîne lourde de masse moléculaire allant de 90 KD (A1-A2) à 210 KD (A1-A2-B) et d'une chaîne légère de 80 KD (A3-C1-C2), il agit comme cofacteur du FIXa permettant ainsi l'activation du FX sur une surface phospholipidique et amplifiant le stimulus de la coagulation. Cette activité est générée par l'action protéolytique surtout de la thrombine et accessoirement du Fxa. Cette protéolyse survient aux sites Arg372-Ser373, Arg740-Ser741 et Arg1689-Ser1690. Le domaine B est totalement libéré et ne joue donc aucun rôle dans la coagulation. La forme active (FVIIIa) est extrêmement labile et se dégrade par clivage soit au site 336 sous l'action de la protéine C activée (PCa), de la thrombine, du FIXa ou du FXa, soit au site 562 (PCa) ou au site 1719 (FIXa). Une dissociation spontanée de la sous-unité A2 du complexe s'accompagne in vitro d'une perte complète d'activité du FVIIIa [1].

Anomalies moléculaires de l'hémophilie A

Depuis le clonage du gène FVIII, plusieurs mutations ont été répertoriées. A partir de 1994, la base de données des mutations a été publiée et constamment actualisée. Plusieurs informations peuvent être obtenues par courrier électronique à partir de : europium.csc.mrc.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm.

Après avoir étudié tous les exons du gène FVIII en électrophorèse de gradient en gel dénaturé, Higuchi et al en 1991 ont trouvé des anomalies chez 90% des cas d'hémophilie A modérée et mineure [11]. Chez les patients sévèrement atteints, les mutations n'ont été trouvées que chez 50% des cas [12], chez l'autre moitié, l'anomalie demeurait à cette période inconnue. Plus tard, Naylor et al, en utilisant la RT-PCR du gène FVIII, ont rapporté une absence d'amplification entre les exons 22 et 23 chez environ 40% des patients sévèrement affectés [13]. En 1993, Lakich et al [14] et Naylor et al [15] ont démontré que ces patients ont une inversion partielle du gène FVIII.

Inversion commune (figure 3)

L'inversion est due à la recombinaison entre la région contenant le transcrit F8A au niveau de l'intron 22 et une

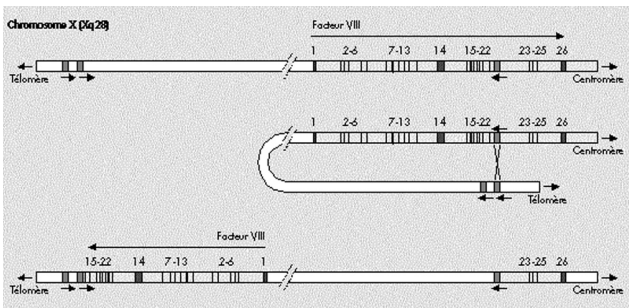


Figure 3 : Mécanisme de l'inversion type 1 de l'intron 22 [16]

des deux autres régions homologues localisées au niveau télomérique du chromosome X. Selon la copie extragénique impliquée dans la recombinaison, deux types d'inversions sont reconnus. L'inversion type 1 affecte la copie distale, l'inversion type 2 la copie proximale. Chez des cas rares, une inversion type 3 suggérerait la présence d'une copie extragénique supplémentaire [16].

Une étude sur 2093 cas d'hémophilie A sévère [5] a montré que 890 cas (soit 43%) ont une inversion répartie en type 1 (83%), type 2 (16%) et type 3 (1%).

Ces inversions ont lieu presque exclusivement dans les gamètes mâles [17] et sont d'une signification clinique considérable puisqu'elles sont associées toujours à un phénotype sévère d'hémophilie A dont elles expliquent près de 45% de cas [2]. Elles sont détectées par la technique de Southern blot (Figure 4) [18] et récemment par la technique LD-PCR (Tableau I) [19].

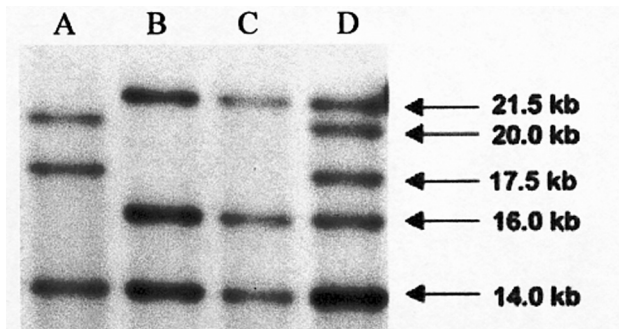


Figure 4 : Bandes observées en Southern dans une inversion distale de l'intron 22 [18].

L'enzyme de restriction utilisée est BclI.

- A : hémophile A avec inversion (bandes 20 - 17,5 et 14) ;
- B et C : sujets normaux (bandes 21,5 - 16 et 14) ;
- D : conductrice de l'inversion, (bandes 21,5 - 20 - 17,5 - 16 et 14).

Tableau I : Bandes observées en LD PCR dans une inversion distale de l'intron 22 [19].

	Sujets normaux	Hémophiles à inversion distale	Conductrices d'inversion distale
Bandes en Kb	12 10	11 11	12 10 11

Récemment, une inversion de l'intron 1 est rapportée et expliquerait 2 à 5% des cas d'hémophilie A sévère [6].

Les autres anomalies

Le tableau II rapporte les mutations répertoriées chez les hémophiles A issues de la base de données : europium. csc.mrc.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm en l'état actualisé au 12 novembre 2004 [6]. Cette base de données permet de répertorier :

- 106 mutations non-sens qui sont à l'origine presque toujours de l'hémophilie A sévère, elles correspondent le plus souvent aux substitutions CGA(Arg)/TGA(Stop).
- 471 mutations faux-sens entraînant pour certaines d'entre elles, une abolition des sites de clivage de la thrombine responsable d'une hémophilie A CRM positive (Arg372His, Arg372Cys, Ser373Pro, Ser373Leu, Arg1689Cys et Arg1689His), une création de nouveaux sites de N-glycosylation (Asn564, Asn1770) liée à une hémophilie A sévère CRM positive ou une abolition du site de liaison au vWF (Tyr1680Phe) observée dans l'hémophilie A modérée CRM négative.
- 65 erreurs potentielles d'épissage, il s'agit de 15 mutations dans le site accepteur d'épissage associées à l'hémophilie A sévère, 17 mutations dans le site donneur d'épissage liées à une forme sévère dans environ 70% des cas et 33 mutations survenant sur des sites cryptiques d'épissage associées à une forme sévère dans environ le tiers des cas.
- 124 grandes délétions différentes (> 50 pb) responsables presque toujours d'une hémophilie A sévère sauf pour les délétions de l'exon 22, des exons 23-24 et de l'exon 25 qui sont associées à une forme modérée de la maladie.
- 165 petites délétions (< 50pb) et 61 petites insertions (1 à 13 pb) sont presque toujours à l'origine de l'hémophilie A majeure et surviennent dans environ la moitié des cas dans des séquences répétitives courtes au niveau de l'exon 14.
- 2 insertions de novo de rétrotransposons LINE chez 2 cas d'hémophilie A sévère de novo, les deux portions LINE (2,1 et 3,8 Kb) sont insérées dans l'exon 14.

Tableau II : Anomalies répertoriées dans l'hémophilie A [6].

Anomalies	Nombre de mutations
Non sens	106
Faux sens	471
Erreurs d'épissage	65
Petites délétions	165
Petites insertions	61
Grandes délétions	124
LINE	2

Stratégie diagnostique de l'hémophilie A

Diagnostic phénotypique

Ce diagnostic repose d'une part, sur un interrogatoire minutieux à la recherche d'une histoire hémorragique personnelle et/ou familiale qui permettra d'identifier les accidents hémorragiques et les complications survenues dans certaines situations cliniques caractéristiques de cette maladie constitutionnelle de l'hémostase telles que les hémarthroses, les extractions dentaires, les amygdalectomies et adénoïdectomies ; et d'autre part, sur le bilan d'hémostase qui permet, devant un allongement isolé du temps de céphaline activée (TCA), la caractérisation du déficit en FVIII et la présence éventuelle d'un inhibiteur. Le temps de saignement, la numération plaquettaire, le temps de Quick et le temps de thrombine sont normaux.

Le dosage du FVIIIc se fait habituellement par une méthode chronométrique en un seul temps avec un plasma déficient en FVIII. Ce dosage permet d'établir la sévérité et le pronostic à long terme de la maladie. Il a été récemment signalé de rares cas de déficits modérés en FVIII où la technique de dosage en un temps était mise en défaut, il est utile dans ce cas d'avoir recours à une technique chromogénique [20]. Le dosage antigénique peut être réalisé lors de diagnostic afin de différencier les hémophiles CRM (cross reacting material) positive caractérisés par la présence d'antigène et CRM négative (absence d'antigène). Enfin, il est indispensable de compléter le phénotype par le dosage du vWF [1].

Recherche d'un inhibiteur

La recherche se fait par une méthode de dosage du FVIIIc résiduel, la puissance de l'inhibiteur est exprimée en unités Bethesda, l'inversion de la dilution pour laquelle l'activité résiduelle est de 50% donne le taux en unités Bethesda. Cependant, certains hémophiles peuvent avoir des inhibiteurs de titre faible entraînant une diminution de la demi vie du FVIII substitué et non mis en évidence par cette méthode d'où le recours à la technique de récupération qui représente la cinétique du taux du FVIII circulant après une perfusion d'une quantité donnée [9,21].

Diagnostic génotypique

La stratégie adoptée aujourd'hui dépend du type de la mutation. La détection directe de la mutation est possible actuellement dans plus de 50% des cas d'hémophilie A majeure, elle met en évidence soit une inversion des introns 22 ou 1, soit l'on dispose d'une sonde oligonucléotidique de la séquence mutée. La description d'un mécanisme unique

expliquant près de la moitié des hémophilies A graves par l'inversion du gène FVIII représente une avancée majeure dans le dépistage de cette maladie et de son diagnostic anténatal. Une détection directe de cette anomalie par Southern ou par LD-PCR permet en effet, non seulement de caractériser, sans analyse familiale exhaustive, chaque conductrice potentielle et d'étudier les familles en l'absence du cas index. Le screening des autres anomalies géniques se fait par RT-PCR sur RNAm des exons du gène FVIII excepté l'exon 14 dont la détection des anomalies nécessite une amplification du DNA par PCR. Dans le cas où la mutation n'aurait pas pu être identifiée au préalable,

l'alternative est d'utiliser le séquençage automatique du gène FVIII [6,17].

Conclusion

L'analyse génotypique et phénotypique chez les hémophiles A va permettre d'établir une relation entre la structure du gène FVIII et l'activité de la protéine et de comprendre la physiopathologie des inhibiteurs anti FVIII. Le diagnostic de l'hémophilie A s'est considérablement simplifié et une amélioration de la prise en charge thérapeutique est conséquente.

Références

- 1- Goudmand J. Hémophilies. E.M.C. Elsevier, Paris. Hématologie, 13-021-B10; 1997: 18p.
- 2- Hedner U, Ginsburg D, Lusher J, High KA. Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the physiopathology and treatment of hemophilia. Am Society of Hematology Education Program Book, 2000: 241-265.
- 3- Soucie JM, Evatt B, Jackson D. Occurrence of Hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. Am J Hematol, 1998; 59: 288-294.
- 4- Gitschier J, Wood W.I, Goralka T.M, Wion KL, Chen EY et al. Characterization of the human factor VIII gene. Nature, 1984; 312: 326-330.
- 5- Anonarakis SE. Molecular Genetics of coagulation factor VIII Gene and hemophilia A. Thromb Haemost, 1995; 74 : 322-328.
- 6- On line : europium.csc.mrc.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm. Databases of the molecular pathology of haemophilia A. 12 nov 2004.
- 7- White GC and Shoemaker CB. Factor VIII Gene and Hemophilia A. Blood, 1989; 73 : 1-12.
- 8- Kemball CG, Bevan SA, Barrowcliffe TW. Factor VIII heavy chain polypeptides in plasma and concentrates. Br J Haemat, 1990 ; 76 : 80-87.
- 9- Biron C, Schved JF. Hémophilies. In Sebahoun G. Hématologie clinique et biologique, Arnette (2ème édition) ; 2005 : 429-434.
- 10- Kaplan JC, Delpech M. Biologie Moléculaire et Médecine. Paris : Médecine –Sciences - Flammarion ; 1993 : 170-173.
- 11- Higuchi M, Anonarakis SE, Kasch L, Oldenberg J, Petersen EE et al. Towards a complete characterization of mild to moderate hemophilia A : detection of the molecular defect in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA. 1991 ; 88 : 8307-8311.
- 12- Higuchi M, Kazazian HH, Kasch L, Warren TC, McGinniss MJ et al. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding region and splice junctions of the factor VIII gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88 : 7405-7409.
- 13- Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. Factor VIII gene explains all cases of hemophilia A. Lancet, 1992; 340 : 1066-1067.
- 14- Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene as a common cause of severe hemophilia A. Nature Genet, 1993 ; 5 : 236-241.
- 15- Naylor JA, Brinke A, Hassock S, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe hemophilia A is due to large DNA inversions. Hum Mol Genet, 1993 ; 2 : 1773-1778.
- 16- Girodon E, Ghanem N, Goossens M. Les bases moléculaires de l'hémophilie A: possibilités actuelles du diagnostic et du conseil génétique. Hématologie, 2 : janvier-février 1996, 7 pages.
- 17- Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketter RP et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. Hum Mol Genet. 1994 ; 3 : 1035-1039.
- 18- Oldenburg J, Rost S, El-Maarri O, Leuer M, Olek K et al. De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. Blood, 15 October 2000; Vol. 96 : 2905-2906.
- 19- Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Mol Pathol, 2002 ; 55 : 127-144.
- 20- Boutière B. Exploration de l'hémostase. Spectra Biologie, 1999 ; 18 : 40-46.
- 21- Borel A. Prise en charge périopératoire de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand. Conférences d'actualisation, Éditions scientifiques et médicales. Elsevier ; 2002: 147-156.