

DEPISTAGE GENOTYPIQUE DES CONDUCTRICES DE L'HEMOPHILIE A

(A propos de 27 cas)

CARRIERS DETECTION IN HEMOPHILIA A

(About 27 cases)

التشخيص الجاني لناقلات مرض «الهيموفيليا أ» (بصدد 27 حالة)

L. BELMAHI^{1,2}, T. BENOUACHANE³, M. VIEMONT⁴, K. MAANI⁵, H. HADJ KHALIFA⁵,
F. M'SEFFER, ALAOU³, M. DELPECH⁴, A. SEFIANI¹.

ملخص : يمثل التشخيص الجاني عند النساء الناقلات لهذا المرض بطريقة وراثية من المراحل الهامة بالنسبة لمراقبة العائلات التي يتواجد بها. ومن تم نستعرض نتائج الدراسة الوراثية لعشر عائلات مصابة «بالهيموفيليا أ» التي اكتشفت 12 حالة لناقلات المرض ضمن 47 امرأة. فاكشاف الخيانات المرضية يشكل خطر انتقاله إلى الأطفال الذكور بنسبة 50%. كما نشير أن تشخيص هذا المرض يمكن أن يتم عند الجنين قبل الولادة.

Résumé : Le diagnostic génotypique des femmes conductrices constitue une étape importante dans la prise en charge par le généticien des familles d'hémophiles.

Nous rapportons dans ce travail les résultats d'une étude génétique qui a porté sur 10 familles d'hémophiles A. Sur un total de 47 femmes ayant à priori un risque d'être porteuses de la maladie du fait de leur apparenté avec un patient hémophile, 27 ont souhaité savoir si elles sont ou non conductrices. L'étude moléculaire nous a permis de rassurer 15 femmes non conductrices de la maladie. Par contre 12 autres sont porteuses du gène morbide et ont par conséquent un risque de 50% de transmettre la maladie à leurs enfants de sexe masculin. Ces femmes à risque, peuvent si elles le souhaitent, demander à bénéficier d'un diagnostic prénatal.

Mots-clés : Hémophilie A - diagnostic génotypique - dépistage des conductrices

Abstract : The genotypic diagnosis of carriers is a main stage to pick up the haemophiliacs families by the genetician. We report the results of 10 haemophiliacs A families. Among 47 women who have a risk to be carriers of hemophilia A, 27 wish to know if they are really carriers or not. The molecular study permitted us to reassure 15 women of them to be no carriers. On the other hand, 12 women are carriers of the morbid gene and have therefore a 50% risk to transmit the disease to their son. These women can undergo prenatal diagnosis if they wish it.

Key-words : Hemophilia A, genotypic diagnosis, carriers detection.

Tiré à part : L. Belmahi : département de génétique et de biologie moléculaire, Institut National d'Hygiène

1: Département de génétique et de biologie moléculaire, INH - Rabat, Maroc

2: Faculté des sciences - Kénitra, Maroc

3: Hôpital des enfants - Rabat, Maroc

4: Laboratoire de biochimie génétique, Hôpital Cochin - Paris - France

5: Hôpital des enfants - Casablanca - Maroc

INTRODUCTION

L'hémophilie A est la plus fréquente des coagulopathies héréditaires et touche environ 1/5000 garçons. Cette maladie génétique qui est due à une diminution, voire l'absence de l'activité coagulante du facteur VIII se transmet selon le mode récessif lié au chromosome X. Les cas de filles atteintes d'hémophilie sont exceptionnels (1, 2)

Le gène F8C qui code pour la protéine FVIII a été cloné en 1984. Il est situé sur la partie terminale du bras long du chromosome X en Xq28. Ce gène s'étend sur 186 Kb et comprend 25 introns et 26 exons (3,4). Le diagnostic génotypique de l'hémophilie A (par étude de l'ADN) présentait de nombreuses difficultés liées à l'extrême hétérogénéité mutationnelle du gène F8C. Si bien que la stratégie du dépistage des femmes conductrices de la maladie et celle du diagnostic prénatal étaient essentiellement basées sur l'étude des RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) qui sont des marqueurs génétiques peu informatifs. Cette situation défavorable a été radicalement transformée grâce d'une part à la caractérisation de 2 microsatellites (marqueurs génétiques de grande informativité) dans les introns 13 et 22 du gène F8C (5,6) et d'autre part, grâce à la découverte en 1993, du mécanisme d'inversion du gène F8C qui explique environ 45% des hémophilies A sévères (7,8). A la lumière de ces découvertes, le diagnostic génotypique de l'hémophilie A repose aujourd'hui sur 2 types de stratégies:

-Une stratégie directe: basée sur l'identification de la mutation à l'origine de l'hémophilie A dans la famille à étudier. A l'exception de la recherche systématique de l'inversion du gène F8C à l'origine de 45% des hémophilies A sévères. Cette approche est très délicate du fait de la grande taille du gène F8C, de sa structure morcelée et de la diversité de ses mutations.

-Une Stratégie indirecte: qui consiste à repérer le chromosome X porteur de l'anomalie, sans que celle-ci ne soit identifiée. Ce repérage se fait en étudiant des marqueurs polymorphes liés au gène F8C et qui ségrègent avec l'allèle muté au sein de la famille concernée. Ce type d'approche est couramment utilisé, sauf dans le cas d'hémophilie A sévère où on procède d'abord à la recherche de l'inversion du gène F8C avant d'avoir recours au diagnostic indirect.

MATERIEL ET METHODES

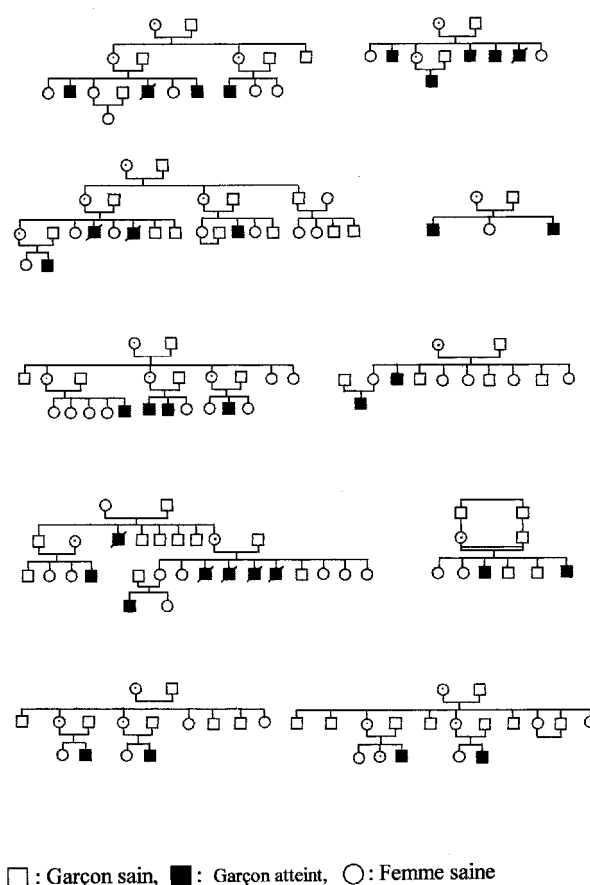
CLINIQUE

- Présentation des familles :

Notre étude a concerné 10 familles d'hémophiles A avec

47 filles potentiellement conductrices de la maladie (figure 1). Ces familles ont d'abord bénéficié d'un conseil génétique au cours duquel elles ont été informées du mode de transmission de l'hémophilie A. Il s'agit d'une transmission récessive liée au chromosome X. Seuls les garçons sont atteints. Les femmes conductrices sont asymptomatiques et transmettent la maladie à leurs garçons (figure 1). Ces familles ont été ensuite informées sur la possibilité de dépister les conductrices de l'hémophilie A. Ainsi, 27 femmes ont souhaité savoir si elles étaient porteuses ou non de la maladie. Les prélèvements sanguins ont été réalisés après consentement oral des personnes concernées.

Fig. 1



□ : Garçon sain, ■ : Garçon atteint, ○ : Femme saine

GENETIQUE

- Analyse des 4 polymorphismes liés au gène F8C:

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir de 5 cc de sang prélevé sur EDTA (Ethylène Diamine Tetra Acétique) selon la technique standard au phénol-chloroforme (9).

- PCR Bcl I / intron 18:

Il s'agit d'un RFLP C'est à dire un polymorphisme de restriction d'ADN. C'est un polymorphisme biallélique (présence ou absence du site de restriction reconnu par l'enzyme Bcl I). Un fragment de 142 pb (paire de bases) de l'intron 18 du gène F8C est amplifié. Les primers utilisés dans cette PCR sont

8-1: 5'TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC3'
8-2: 5'TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTTC 3'.

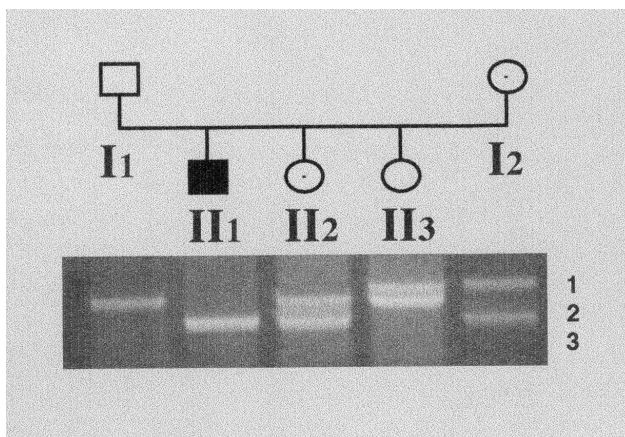
Le produit d'amplification est ensuite digéré par l'enzyme Bcl I à 52°C pendant une durée de 3 heures environ. Le produit de digestion est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4%, et les fragments de restriction sont visualisés sous UV après coloration du gel au BET (Bromure d'Ethidium) puis photographiés.

- PCR St14 / DXS52:

Ce polymorphisme est un VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), une région du génome caractérisée par la répétition en tandem d'une même séquence d'ADN. Le VNTR St14 / DXS 52 présente l'avantage d'être très informatif (plusieurs allèles dans la population). Au Maroc ce polymorphisme est estimé à 87% (10). La PCR utilise des amorces s'hybridant au niveau des séquences adjacentes à la répétition. Les primers sont

St1: 5'GGCATGTCACCTTCTCTCATGTT3'
St2: 5'CACCACTGCCCTCACGTCACCT3'.

Fig. 2



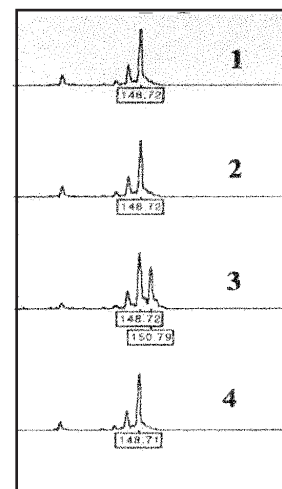
Analyse par PCR du marqueur St14/DXS 52
I1 = p re (all le 2), I2=m re h t rozygote (all les 1 et 3)
II1 = enfant h mophile (all le 3), II2=s'ur conductrice (all les 2 et 3)
II3 = s'ur non conductrice (all le 1 et 2)

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose à 0,8%. Les différents allèles sont visualisés directement sous UV (figure 2).

- Les microsatellites (CA)_n des introns 13 et 22:

Les microsatellites sont des segments d'ADN contenant des répétitions en tandem de courts motifs di, tri ou tétra-nucléotidiques. Les microsatellites de l'intron 13 et de l'intron 22 du gène F8C sont amplifiés simultanément au cours d'une même PCR. Le produit de PCR est ensuite analysé au Genescan (Genotyper 377 PE/ABI). On obtient alors un électrophorégramme qui montre des allèles de différentes tailles (figure 3). La taille des fragments s'étend de 142 pb à 160 pb pour l'intron 13. et de 77 à 87 pb pour l'intron 22.

Fig. 3



Electrophor gramme des microsatellites de l'intron 13 du gène F8C après lecture par Genescan 377 PE/ABI

1: p re (all le 148), 2: h mophile (all le 148)
3: m re h t rozygote (all les 148/150)
4: s'ur homozygote conductrice (all les 148)

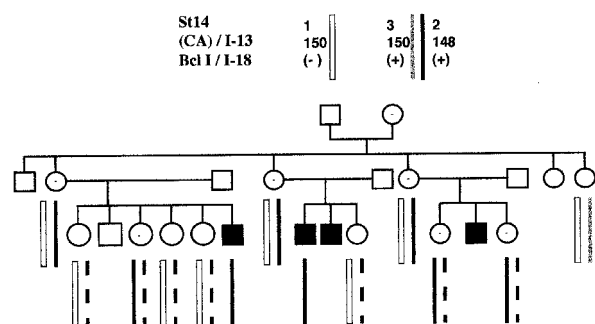
Les primers pour l'intron 13 sont :

A1: 5'TGCATCACTGTACATATGTATCTT3'
A2: 5'CCAAATTACATATGAATAAGCC3'

Pour l'intron 22 :

1B: 5'-TTCTTAGAATGTAGTGTGTG3'.
2B: 5'TAATGCCACATTATAGA3'.

Fig. 4



Résultats du génotypage chez une famille d'hémophilie A. En noir le chromosome X avec l'haplotype (2, 148, +) porteur du gène muté

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude génotypique de l'hémophilie A, a concerné 10 familles marocaines avec 47 filles potentiellement conductrices de l'hémophilie A. Seulement 27 d'entre elles ont manifesté leur souhait de savoir si elles étaient ou non porteuses du gène morbide. Nous avons procédé à l'étude de chacune de ces familles en analysant les mères et un patient hémophile systématiquement en plus des femmes concernées. Sur les 10 familles étudiées, 2 se sont avérées informatives pour les 4 polymorphismes, 4 sont informatives pour 3 marqueurs et 4 familles sont informatives pour uniquement 2 polymorphismes (la figure 4 montre le résultat du génotypage chez une de ces familles). Ces 4 marqueurs nous ont permis de rassurer 15 femmes parmi les 27 étudiées car elles n'étaient pas conductrices de l'hémophilie A. En revanche, les 12 autres étaient porteuses d'un gène muté de l'hémophilie A. Ces dernières ont donc un risque réel de 50% de transmettre la maladie aux garçons.

Le diagnostic des conductrices de l'hémophilie A est basé essentiellement sur une stratégie indirecte qui repose sur l'utilisation de marqueurs polymorphes liés au gène F8C. Ces marqueurs sont des variations individuelles de l'ADN sans expression phénotypique. Il s'agit d'une variabilité neutre transmise selon la loi de Mendel. Ils conditionnent parfois la présence ou l'absence d'un site de

reconnaissance par un enzyme de restriction. Ces marqueurs permettent de repérer dans une famille le chromosome X qui segrège avec l'hémophilie A. Quatre polymorphismes sont couramment explorés dans les laboratoires spécialisés en génétique de l'hémophilie A. Il s'agit de deux RFLPs dont un est biallélique et intragénique: Bcl I / intron 18 et l'autre est un VNTR extragénique: St14 / DXS 52. L'avantage de ce dernier polymorphisme est sa grande informativité. Son inconvénient réside dans sa position extragénique, distale par rapport au gène de l'hémophilie A, avec un risque de recombinaison allant de 4 à 5%.

Les deux autres polymorphismes sont des microsatellites (CA)_n situés sur l'intron 13 et l'intron 22 du gène F8C. Le nombre de répétition en CA variant d'un individu à un autre engendre un multiallélisme très informatif.

La prise en charge d'un hémophile et de sa famille est multidisciplinaire. Le généticien intervient pour informer les parents ou les apparentés d'un hémophile sur le risque qu'ils ont de voir apparaître dans leur descendance un nouveau cas d'hémophilie A. L'estimation de ce risque repose sur : un diagnostic exact de la maladie, une enquête familiale minutieuse et une estimation du risque par un calcul préalable de la probabilité qu'une femme d'être conductrice de l'hémophilie. Ce calcul tiendra compte des données fournies par l'arbre généalogique (nombre de garçons sains, liens de parenté avec le sujet atteint, les résultats des tests d'hémostase) et du mode de transmission lié à l'X de la maladie. Le généticien propose également aux femmes à risque les méthodes, essentiellement moléculaires, du dépistage des conductrices et du diagnostic anténatal. Ainsi informés, les parents, pourront en connaissance de cause, prendre la décision qui leur convient le mieux.

CONCLUSION

La prise en charge des hémophiles dans notre pays nécessite un grand effort d'information, la disponibilité sur le marché marocain, à des prix accessibles pour tous, des facteurs antihémophiliques de haute pureté et une collaboration pluridisciplinaire.

Nous soulignons par ce travail la place du généticien dans cette prise en charge et surtout l'intérêt des techniques de biologie moléculaire pour le dépistage des femmes conductrices de l'hémophilie A.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- **P. Nisen, PG. Waber.** Non random X Chromosome DNA methylation patterns in hemophilic females. *J Clin Invest* 1989; 83: 1400-1403.
- 2- **S. Windsor, A. Lyng, S. Taylor, B. Ewenstein, E. Neufeld, D. Lillicrap.** Severe haemophilia A in a female resulting from two the novo factor VIII mutations. *Br J Haematol* 1995; 90: 906-909.
- 3- **J. Gitschier, W.I. Wood, T. M. Goralk and al.** Characterisation of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-330.
- 4- **E.G.D. Tuddenham, D. N. Cooper, J. Gitschier and al.** Haemophilia A: database of nucleotides substitutions, deletions, insertions and rearrangements of factor VIII gene. *Nucleic acid res* 1991 19: 4821-4833.
- 5- **M.R. Lalloz, J.H. McVey, J.K. Pattinson, E.G.D. Tuddenham.** Haemophilia A diagnosis by analysis of hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338: 207-211.
- 6- **M.R.A. Lalloz, R. Schewaaab, J.H. McVey, K. Michaelides, E.G.D. Tuddenham.** Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1994; 86: 804-809.
- 7- **J.A. Naylor, P.M. Green, C.R. Rizza, F. Ginnelli.** Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 11-17.
- 8- **J. Naylor, A. Brinke, S. Hassok, P.M. Green, F. Gianneli.** Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A issue to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2 ; 1773-1778
- 9- **J. Sambrook, E.E. Fritsch, T. Maniatis.** Molecular cloning. A laboratory manual 1989 Cold Spring harbor. Laboratory press.
- 10- Thèse de doctorat de troisième cycle. N° 1300. Génétique moléculaire de l'hémophilie A. Faculté des Sciences- Rabat. Octobre 1995.