

# PARTIE 14 Analyse génétique moléculaire

Carlos De Brasi & Megan Sutherland

## SUJETS ABORDÉS

- ✓ Caractéristiques moléculaires des gènes et des protéines liés à l'hémophilie
- ✓ Spectre des variantes causales dans l'hémophilie
- ✓ Autres phénotypes associés au gène F8
- ✓ Autres phénotypes associés au gène F9
- ✓ Protection contre la thrombose veineuse profonde (TVP)
- ✓ Spectre des approches pratiques appliquées aux tests génétiques
- ✓ Nomenclature normalisée et potentiel pathogène des variantes

L'analyse génétique de l'hémophilie est importante pour définir la cause sous-jacente du trouble de la coagulation chez les personnes affectées et les membres de leur famille. La compréhension de la variante génétique associée au phénotype peut aider à prédire la sévérité du trouble, y compris le risque de développement d'inhibiteurs. Elle contribue également à identifier les porteuses de l'hémophilie, qui peuvent se voir proposer un diagnostic prénatal. Il est important que les personnes soumises à une évaluation génétique bénéficient au préalable d'un conseil génétique approprié. Les récentes Lignes directrices pour la prise en charge de l'hémophilie de la FMH (3<sup>e</sup> édition) (Srivastava et al., 2019) comportent un chapitre consacré à l'évaluation génétique des personnes atteintes d'hémophilie A et B. Cette partie du présent manuel de laboratoire décrit la base génétique de l'hémophilie A et B et met en évidence l'hétérogénéité des approches pratiques actuellement disponibles dans le monde susceptibles d'être utilisées pour étudier les variantes génétiques sous-jacentes. Elle détaille aussi le recours à une nomenclature normalisée pour la description des variantes génétiques, et la classification de leur pathogénicité, et souligne l'importance d'un bilan d'interprétation clair et concis qui reprend le résultat génétique et les implications pour la personne et sa famille.

**Caractéristiques moléculaires des gènes et des protéines liés à l'hémophilie :** les caractéristiques moléculaires des gènes de l'hémophilie, F8 et F9, sont présentées au tableau 41. Le tableau 41 montre les coordonnées génomiques sur GRCh38 (hg38), la taille des gènes et la localisation cytogénétique de F8 et F9, la complexité de leur structure (nombre d'exons), les versions organisées mises à jour des fichiers RefSeq (c.-à-d. NG..., NM..., NP...), et la taille moléculaire pertinente des principales transcriptions des gènes et de leurs isoformes polypeptidiques dérivées.

**Tableau 41.** Caractéristiques moléculaires des gènes F8 et F9

Symbole officiel HGNC	Nom du gène	Localisation cytogénétique	GRCh38 (hg38) (coordonnées) NC_000023.11 (longueur [pb])	Génomique RefSeq (plage de coordonnées)	Transcription principale* RefSeq (longueur [nts]) (exons)	Protéine principale* RefSeq (longueur [aa])	N° OMIM
<b>F8</b>	Facteur de coagulation VIII	Xq28	complément (154,835,792-155,022,723) (186,931)	NG_011403.2 (5,001-191,932)	NM_000132.4 (9032) (26)	NP_000123.1 (2351)	300841
<b>F9</b>	Facteur de coagulation IX	Xq27.1	(139,530,739-139,563,459) (32,720)	NG_007994.1 (5,001-37,723)	NM_000133.4 (2800) (8)	NP_000124.1 (461)	300746

HGNC : comité de nomenclature des gènes HUGO. Longueur [unités] : [pb], paires de base ; [nts], nucléotides ; [aa], acides aminés. \* Seul le variant de transcription le plus long (le plus significatif) et son isoforme principale dérivée sont indiqués. OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man* (<https://omim.org/>) ; n°, numéro d'accès. Les données ont été collectées auprès du NCBI (*National Center from Biotechnology Information*), consulté le 18 janvier 2024 ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). RefSeq indique les fichiers de référence pour les séquences de la plateforme de navigation du NCBI.

De plus, le tableau 42 présente les caractéristiques les plus pertinentes des protéines des facteurs de coagulation VIII et IX. Il compile les données des principales isoformes des protéines, la cartographie des acides aminés (aa) des domaines des protéines reconnaissables (spécifiées par la base de données UNIPROT) et les fichiers de la base de données des protéines (PDB) associés aux modèles de structure 3D (coordonnées tridimensionnelles des atomes FVIIIa et FIXa).

**Tableau 42.** Caractéristiques moléculaires des protéines des facteurs de coagulation VIII et IX

Symbole de la protéine	Nom de la protéine isoforme principale	Isoforme RefSeq (longueur [aa])	N° UNIPROT*	Domaines des isoformes : UNIPROT (coordonnées aa)	Structure 3D ID PDB (coordonnées aa)
FVIII	Facteur de coagulation VIII isoforme 1 préprotéine	NP_000123.1 (2351)	P00451	<b>Peptide signal</b> : (1-19) <b>A1</b> : F5/8 type A 1 (20-348) <b>A2</b> : F5/8 type A 2 (399-730) <b>B</b> : région B (760-1667) <b>A3</b> : F5/8 type A 3 (1713-2040) <b>C1</b> : F5/8 type C 1 (2040-2188) <b>C2</b> : F5/8 type C 2 (2193-2345)	<b>FVIIIa mature 2R7E.pdb**</b> A : chaîne lourde A1-A2 (traditionnellement 1-725) B : chaîne légère A3-C1-C2 (traditionnellement 1689-2332)
FIX	Facteur de coagulation IX isoforme 1 préprotéine	NP_000124.1 (461)	P00740	<b>Peptide signal</b> : (1-28) – <b>Propeptide</b> : (29-46) <b>Gla</b> : riche en γ-carboxyglutamate (47-92) <b>EGF1</b> : EGF-like de liaison au Ca++ 1 (93-129) <b>EGF2</b> : EGF-like 2 (130-171) <b>Act peptide</b> : peptide d'activation (192-226) <b>Tryp_SPc</b> : protéase sérine de type trypsine (227-457)	<b>Homology model FIXa.pdb***</b> L : chaîne légère Gla-EGF1-EGF2 (47-171) H: chaîne lourde Tryp_SPc (227-461)

\* Base de données de séquences de protéines UNIPROT (URL : <https://www.uniprot.org/>). \*\* Shen et al, 2008. \*\*\* Directeurs du projet de bases de données de variantes EAHAD (Rallapalli et al., 2013 ; McVey et al., 2020). La plupart des données ont été collectées à partir des bases de données sur les variantes des facteurs de coagulation de l’EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) (URL : <https://dbs.eahad.org/>) consultées le 18 janvier 2024. Les codons et les acides aminés (aa) sont numérotés selon les règles de la *Human Genome Variation Society* (HGVS) (à savoir codon +1 codant pour le premier résidu (Met) du polypeptide primaire dans le FVIII et le FIX). Dans la numérotation traditionnelle, le codon/ acide aminé +1 fait référence à celui codant pour le premier acide aminé de la protéine FVIII mature (à l’exclusion de 19 aa du peptide signal) et de la protéine FIX (à l’exclusion de 46 aa du peptide signal et du pro-peptide). Bien que la numérotation de l’HGVS soit recommandée, la numérotation traditionnelle a été largement utilisée dans les publications antérieures.

**Spectre des variantes causales dans l'hémophilie** : la plupart des variantes pathogènes affectant le gène F8 provoquent l'hémophilie A, tandis que la plupart des variantes pathogènes de F9 provoquent l'hémophilie B. La base de données *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (<https://www.omim.org>) compile un vaste ensemble d'informations complètes sur les gènes humains, indique les variantes affectant leur fonction et décrit et classe les phénotypes qui leur sont associés. Elle indique que les variantes F8 sont associées à deux phénotypes différents : hémophilie A (n° 306700) et thrombophilie 13 (liée au chromosome X, due à une anomalie de FVIII) (n° 301071) (THPH13) ; tandis que pour F9, il y a quatre phénotypes : hémophilie B (n° 306900), thrombophilie 8 (liée au chromosome X, en raison d'une anomalie de FIX) (n° 300807) (THPH8), protection contre la thrombose veineuse profonde (TVP) (n° 300807) et sensibilité à la warfarine (n° 301052). Les tableaux 43 et 44, respectivement, présentent le spectre des mutations de F8 à l'origine de l'hémophilie A selon les taux d'activité du facteur de coagulation VIII (FVIII:C), ainsi que des mutations de F9 provoquant l'hémophilie B, associées aux taux du facteur IX (FIX:C). La majeure partie des prévalences relatives des variantes causales de l'hémophilie A et B, répertoriées dans les tableaux 43 et 44, ont été extraites des bases de données de l'EAHAD. La base de données des variantes de F8 de l'EAHAD exclut les inversions prévalentes associées à l'hémophilie A sévère impliquant près de la moitié des patients. Afin de présenter une prévalence non biaisée des mutations à l'origine de l'hémophilie A sévère, leurs fréquences relatives ont été fusionnées en tenant compte des moyennes mondiales des inversions de l'intron 22 de F8 (Inv22) rapportées par Antonarakis *et al.* (1995), et de celles estimées pour l'inversion de l'intron 1 du gène F8 (Inv1) à partir d'une série internationale de patients atteints d'hémophilie A (Rossetti *et al.*, 2004) (tableau 43).

**Tableau 43.** Variantes de F8 à l'origine de l'hémophilie A les plus typiques chez les patients hémizygotes provenant de sources internationales

Type de variante par effet	Sévère non-inversions Nb de cas (%)	Sévère total Nb de cas (%)	Modéré Nb de cas (%)	Mineur Nb de cas (%)	Références
Faux-sens	1418 (30,2)	(16,2)	1340 (79,9)	3048 (95,8)	F8_var_db EAHAD*
Sans décalage du cadre de lecture-indel	70 (1,5)	(0,8)	19 (1,1)	32 (1,0)	F8_var_db EAHAD*
Décalage du cadre de lecture-indel	1487 (31,7)	(17,0)	142 (8,5)	27 (0,9)	F8_var_db EAHAD*
Anomalie d'épissage	320 (6,8)	(3,7)	98 (5,8)	68 (2,1)	F8_var_db EAHAD*
Non-sens	968 (20,6)	(11,1)	59 (3,5)	4 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Grande délétion (SV)	426 (9,1)	(4,9)	19 (1,1)	3 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
<b>Total non-inversions</b>	<b>4689 (100)</b>	<b>(53,7)</b>	<b>1677 (100)</b>	<b>3182 (100)</b>	<b>F8_var_db EAHAD*</b>
Inv22 (SV) type 1		740 (35,4)			Antonarakis <i>et al.</i> , 1995
Inv22 (SV) type 2		140 (6,7)			
Inv22 (SV) autres types		25 (1,1)			
<b>Total Inv22</b>		<b>2093 (43,2)</b>			
Inv1 (SV)		19 (3,1)			Rossetti <i>et al.</i> , 2004
<b>Total Inv1</b>		<b>622 (3,1)</b>			

SV indique les variantes structurales, y compris les variations du nombre de copies (CNV) comme les grandes délétions de F8, les grandes inversions de F8 (non-CNV), l'inversion de l'intron 22 (Inv22) et l'inversion de l'intron 1 (Inv1). Les données des patients pour lesquels il n'y a pas d'informations sur les inversions du gène F8 proviennent des bases de données de l'EAHAD enregistrant des patients individuels. \* Base de données des variantes de F8 (<http://f8-db.eahad.org/>).

La variante la plus caractéristique et la plus récurrente provoquant une hémophilie A sévère dans le monde est l'inversion de l'intron 22 de F8, une grande inversion parfaite de 600 kb médiée par la recombinaison entre des répétitions inversées de 10 kb (int22h ou h), perturbant la structure de F8 et empêchant l'épissage normal de l'ARN entre les exons 22 et 23 (Lakich *et al.*, 1993 ; Naylor *et al.*, 1993). Il existe une copie intragénique d'int22h dans l'intron 22 (h1) et deux copies extragéniques (h2 et h3). En fonction de la copie extragénique qui se recombine avec la copie intragénique, l'Inv22 présente un schéma de type 1 (h1/h3) ou de type 2 (h1/h2). L'Inv22 provient presque exclusivement des cellules germinales mâles (Rossiter *et al.*, 1995) et, par conséquent, la majorité des mères des personnes avec Inv22 sont porteuses (Tizzano *et al.*, 1995). Le mécanisme moléculaire de la recombinaison homologue non allélique entre les grandes répétitions inversées dans la méiose masculine étaye la récurrence d'Inv22 comme cause la plus répandue de l'hémophilie A sévère dans le monde (tableau 43). De même, l'inversion de l'intron 1 du gène F8 (Inv1) est une grande inversion parfaite de l'ADN due à la recombinaison entre des répétitions inversées de 1 kb (int1h), perturbant la structure de F8 au niveau de l'intron 1 (Bagnall *et al.*, 2001) et impliquant une moyenne estimée de 3 % de patients atteints d'hémophilie A sévère dans le monde (tableau 43).

Le groupe restant de patients atteints d'hémophilie A sévère, modérée ou mineure (tableau 43), pour lesquels on ne dispose pas des informations escomptées pour les inversions de F8, ainsi que tous les patients atteints d'hémophilie B (tableau 44) présentent un spectre typique de variantes délétères, comme des substitutions de nucléotides uniques (SNV) prédisant les anomalies de faux-sens, de non-sens ou d'épissage ; de petites insertions/délétions (indel) prédisant les décalages du cadre de lecture ou les changements sans décalage ; ou, moins fréquemment, les grandes variations du nombre de copies (CNV), principalement les grandes délétions.

**Tableau 44.** Variantes de F9 à l'origine de l'hémophilie B les plus typiques chez les patients hémizygotes provenant de sources internationales

Type de variante par effet	Sévère Nb de cas (%)	Modéré Nb de cas (%)	Mineur Nb de cas (%)	Références
Faux-sens	999 (52,3)	1039 (85,1)	719 (95,0)	F9_var_db EAHAD*
Sans décalage du cadre de lecture-indel	27 (1,4)	9 (0,7)	1 (0,1)	F9_var_db EAHAD*
Décalage du cadre de lecture-indel	185 (9,7)	42 (3,4)	2 (0,3)	F9_var_db EAHAD*
Anomalie d'épissage	135 (7,1)	66 (5,8)	30 (4,0)	F9_var_db EAHAD*
Non-sens	459 (24,0)	62 (5,1)	5 (0,7)	F9_var_db EAHAD*
Grande délétion (SV)	107 (5,6)	3 (0,3)		F9_var_db EAHAD*
Total	1912 (100)	1221 (100)	757 (100)	F9_var_db EAHAD*

SV indique les variantes structurales comme les grandes délétions affectant partiellement ou totalement le gène F9. Les données des patients atteints d'hémophilie B ont été obtenues à partir des bases de données de l'EAHAD enregistrant des patients individuels. \* Base de données des variantes de F9 (<https://f9-db.eahad.org/>).

Les informations sur les variantes de F8 et F9 sont compilées dans des bases de données accessibles au public, telles que celles développées par les CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) nommées CHAMP et CHBMP pour l'hémophilie A et l'hémophilie B, respectivement (<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), et par l'EAHAD pour F8 (<http://f8-db.eahad.org/>) et F9 (<http://f9-db.eahad.org/>) (tableaux 43 et 44). Consultées le 18 janvier 2024, les bases de données de l'EAHAD contiennent des informations provenant de 3052 variantes de F8 uniques correspondant à 10 144 cas individuels, et de 1244 variantes de F9 uniques correspondant à 4713 cas individuels. Dans les tableaux 43 et 44, les variantes génétiques sont classées selon leur effet prédit à partir des données probantes de la séquence nucléotidique de l'ADN observée (c.-à-d. faux-sens, sans décalage du cadre de lecture-indel, décalage du cadre de lecture-indel, anomalie d'épissage, non-sens, grande délétion). Les variantes de F8 et F9,

respectivement, énumérées dans les tableaux 43 et 44 représentent les variantes causales de l'hémophilie avec des fréquences significatives dans le monde entier, par rapport aux variantes prévalentes constatées dans des populations particulières généralement associées à des phénotypes non sévères (p. ex. duplication de l'exon 13 de F8 prévalente dans la population italienne d'hémophilie A mineure, Acquila *et al.*, 2004).

### **Autres phénotypes associés au gène F8**

Thrombophilie 13 (liée au chromosome X, due à une anomalie de FVIII) : Shen *et al.* (2013) ont évalué les taux d'activité FVIII:C et le nombre de copies du gène F8 chez les patients atteints de thrombo-embolie veineuse (TEV) par rapport aux témoins sains. Les patients atteints de TEV ont montré un FVIII:C significativement plus élevé et un plus grand nombre de copies du gène F8. Simioni *et al.* (2021) ont fait état de deux familles italiennes atteintes de thrombophilie 13 et identifié une duplication en tandem de F8 partielle, ce qui est cohérent avec le mode de transmission dominant lié au chromosome X, car les patients hémizygotes de sexe masculin sont plus gravement touchés que les femmes porteuses.

### **Autres phénotypes associés au gène F9**

La thrombophilie 8 (due à une anomalie de FIX) est un phénotype héréditaire récessif lié au chromosome X, associé à une TEV d'apparition précoce due à un défaut de faux-sens de F9, R338L ou une variante Padoue, rapporté par Simioni *et al.* (2009). Il a été signalé que le FIX Padoue améliorait la résistance fibrinolytique des caillots plasmatiques (Ammollo *et al.*, 2014).

### **Protection contre la thrombose veineuse profonde (TVP) :**

La variante polymorphique commune FIX Malmö (fréquence des allèles mineurs de 0,32), p.(Thr148Ala) en raison d'une SNV G>A, s'associe à une protection contre le risque de TVP avec un odds ratio de 0,8 chez les hommes et de 0,89 chez les femmes (Bezemer *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires de protection contre la TVP conférés par le polymorphisme FIX Malmö sont restés inconnus.

La warfarine est un anticoagulant largement prescrit pour la prévention des événements thrombo-emboliques chez les patients « à risque ». La sensibilité à la warfarine (liée au chromosome X, due à des variantes de FIX) fait référence à une complication du phénotype hémorragique pendant une anticoagulothérapie avec des antagonistes de la vitamine K. Pezeshkpoor *et al.* (2018) ont fait état d'une association entre les variantes faux-sens de F9 affectant le pro-peptide, tels que p.(Ala37Thr) et p.(Ala37Val), et la sensibilité à la warfarine caractérisée par une réduction disproportionnée des taux de FIX:C au cours d'une anticoagulothérapie.

La relation de cause à effet entre une variante génétique donnée (par exemple Inv22 de F8) et un phénotype particulier (par exemple l'hémophilie A sévère chez un patient hémizygote) peut dans de rares cas être modifiée par l'implication d'un mosaïcisme génétique, défini comme la coexistence chez une personne d'au moins deux clones génétiquement différents (par exemple des cellules Inv22 positives et négatives). Un mosaïcisme génétique peut partiellement ou totalement impliquer certains ou tous les organes/tissus d'une personne affectée, entraînant notamment des phénotypes plus légers s'il affecte les cellules somatiques (p. ex. cellules productrices de FVIII/FIX dérivées de l'endothélium hépatique) et l'héritabilité de la variante du gène s'il affecte les cellules germinales (p. ex. un patient de sexe masculin atteint d'hémophilie avec mosaïque germinale pourrait être le père de filles non porteuses) (Abelleyro *et al.*, 2018).

En tant que paradigmes historiques des troubles récessifs liés au chromosome X, l'hémophilie A (OMIM n° 306700) et l'hémophilie B (OMIM n° 306900) s'expriment généralement chez les hommes hémizygotes (46,XY), et les femmes hétérozygotes (46,XX), généralement asymptomatiques. Selon un point de vue consensuel parmi les hématologues, une nouvelle classification de l'hémophilie féminine prend en compte les taux d'activité de coagulation des facteurs, indiquant une maladie sévère en présence de < 1 UI/dl, modérée de 1 à 5 UI/dl et mineure de 5 à 40 UI/dl ; et lorsque les taux sont > 40 UI/dl, les personnes sont classées comme porteuses symptomatiques et asymptomatiques (van Galen *et al.*, 2021). La base moléculaire de l'hémophilie féminine implique l'expression altérée ou le silence des allèles de F8 ou F9

médiés par le phénomène d'inactivation du chromosome X (ICX), qui réduit au silence l'expression des gènes en cis d'un X dans chaque cellule pour compenser les doses chez les hommes. L'ICX intervient tôt dans l'embryogenèse, normalement de manière aléatoire dans chaque cellule, et cet état est à hérédité clonale chez les femmes dans leur vie adulte. On s'attend à ce qu'une femme porteuse homozygote et une personne hétérozygote composite expriment l'hémophilie, de même que personnes porteuses hétérozygotes avec ICX biaisée réduisant préférentiellement au silence l'allèle normal (Radic et al., 2015). De plus, Garagiola et al. (2021) ont démontré une association significative entre les taux d'activité de coagulation des FVIII/FIX et le profil d'ICX mesuré dans les leucocytes du sang périphérique de personnes porteuses de l'hémophilie A hétérozygotes avec  $\leq 50$  UI/dl.

**Spectre des approches pratiques appliquées aux tests génétiques :** en fonction de la disponibilité des ressources et de l'expertise, il existe une variété de techniques qui peuvent servir à l'exploration des variantes génétiques associées à l'hémophilie A et B. Cette partie fournit des exemples de ces approches pratiques et des références, le cas échéant. Un certain nombre de techniques différentes sont disponibles pour l'étude de l'inversion de l'intron 22 de F8, notamment le southern blot, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à longue portée et la PCR à décalage inverse (Lakich et al., 1993 ; Liu et al., 1998 ; Bagnall et al., 2006 ; Rossetti et al., 2008 ; Abelleyro et al., 2016 ; Ding et al., 2016 ; Hudecova et al., 2017 ; Pan et al., 2014 ; Kumar et al., 2015 ; Edison et al., 2016). L'inversion de l'intron 1 du gène F8 peut être détectée par des techniques telles que la PCR double ou inverse (Bagnall et al., 2002 ; Rossetti et al., 2008). L'analyse des SNV dans F8 et F9 peut être réalisée par une gamme de techniques, y compris la PCR et le séquençage de Sanger, ou des technologies de séquençage à haut débit, telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) (Al-Allaf et al., 2019 ; Li et al., 2014 ; Lyu et al., 2016 ; Manderstedt et al., 2019 ; Edison et al., 2016). Lorsque les ressources sont limitées, une approche de dépistage avant le séquençage de Sanger pourrait être utilisée (Salviato et al., 2019), par exemple par analyse hétéroduplex utilisant l'électrophorèse sur gel sensible à la conformation (*conformation sensitive gel electrophoresis* ou CSGE). Pour l'analyse des CNV dans les gènes F8 et F9, il existe un certain nombre de techniques telles que la gap-PCR, l'amplification multiplex de sonde nucléique dépendant des ligatures (MLPA), la PCR en temps réel quantitative et la NGS (Rossetti et al., 2004 ; Payne et al., 2012 ; Costa et al., 2004 ; Belvini et al., 2017 ; Kinkle et al., 2017 ; You et al., 2013 ; Wu et al., 2014 ; Fernandez-Loper et al., 2007 ; Tizzano et al., 2005 ; Johnsen et al., 2017). Dans les cas d'hémophilie A et B où une variante génétique sous-jacente n'est pas trouvée dans les régions essentielles des gènes F8 ou F9 à l'aide des techniques décrites ci-dessus, l'analyse des régions introniques profondes à la recherche d'anomalies d'épissage potentielles peut être disponible par séquençage massivement parallèle (SMP) ciblé ou séquençage du génome entier (SGE) (Jourdy et al., 2018 ; Jourdy et al., 2020 ; Bach et al., 2015 ; Inaba et al., 2017 ; Castaman et al., 2011 ; Chang et al., 2019). L'analyse des liens peut aussi être envisagée dans le cadre d'études familiales où il n'y a pas de variante de gène F8 ou F9 identifiable (Sun et al., 2015). L'étude des personnes présentant des phénotypes atypiques susceptibles d'être dus à des réarrangements génomiques complexes peut se faire au moyen de l'analyse cytogénétique par biopuces (Jourdy et al., 2016 ; Jourdy et al., 2017 ; Janczar et al., 2016 ; Lannoy et al., 2018). L'analyse de l'inactivation du chromosome X peut être effectuée par un certain nombre de techniques telles que l'enzyme de restriction spécifique à l'état de méthylation, la PCR et l'analyse des fragments, ou d'autres techniques quantitatives (Nisen et al., 1989 ; Coleman et al., 1993 ; Johansson et al., 2023 ; Machado et al., 2014).

**Nomenclature normalisée et potentiel pathogène des variantes :** l'exactitude de la description univoque des variantes génétiques est essentielle pour la recherche et les soins cliniques. Pour répondre à cette exigence, le comité de la nomenclature des variantes de la *Human Genome Variation Society* (HGVS), sous l'égide de la *Human Genome Organization* (HUGO), a élaboré un ensemble de recommandations. Il s'agit notamment de décrire les variantes génétiques au niveau le plus élémentaire, le niveau de l'ADN, et d'éventuellement fournir en sus des descriptions au niveau de l'ARN et/ou des protéines, en général prédites à partir des données probantes sur l'ADN (<https://hgvs-nomenclature.org/stable/>) (den Dunnen et al., 2016). La nomenclature de l'HGVS recommande une numérotation spécifique pour les positions des gènes indiquant le codon +1 codant pour le premier résidu (Met) du polypeptide primaire et le nucléotide



+1 pour le A du codon d'initiation AUG. Dans certaines publications antérieures sur l'hémophilie, la numérotation traditionnelle du codon/acide aminé +1 fait référence à celle codant pour le premier acide aminé de la protéine mature (c'est-à-dire dans la numérotation de l'HGVS, le codon 20 du FVIII et le codon 47 du FIX). Pour ajuster et normaliser la nomenclature des variantes en fonction de l'HGVS, le site Web Mutalyzer propose des algorithmes efficaces pour rechercher et vérifier leur description correcte à partir des recommandations de l'HGVS (<https://mutalyzer.nl/>) (Lefter et al., 2021). Il convient de classer toutes les variantes détectées en fonction de leur potentiel à provoquer le phénotype observé conformément aux lignes directrices produites par l'*American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) (Richards et al., 2015). Les recommandations de l'ACMG/AMP peuvent être appliquées aux tests génétiques basés sur le séquençage de nouvelle génération ou conventionnel utilisés dans les laboratoires cliniques et comprennent un système de classification à cinq niveaux pour les variantes pertinentes pour les maladies mendéliennes : (1) pathogène, (2) probablement pathogène, (3) signification incertaine, (4) probablement bénin et (5) bénin. Pour parvenir à cette catégorisation, l'ACMG/AMP recommande une analyse approfondie (a) des données de population, (b) des données de calcul, (c) des données fonctionnelles et (d) des données de ségrégation.

Par exemple, l'analyse des variantes de F8 et F9 implique :

(a) L'étude de la variante génotypée dans la population générale et sa fréquence chez les personnes hémizygotiques, hétérozygotes, etc. en consultant gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) et les bases de données spécifiques aux gènes F8/HA et F9/HB, telles que celles de l'EAHAD et CHAMP (référéncées ci-dessus).

(b) L'application d'outils bioinformatiques *in silico* pour analyser les changements faux-sens en prédisant les éventuels changements structuraux ou fonctionnels à l'aide de PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) et Varsome (<https://varsome.com/>) entre autres ; ou pour évaluer les éventuelles anomalies d'épissage, tels que NNSplice ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), NetGene2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGene2-2.42/>) et ESEFinder pour la recherche des différences dans les séquences d'activateur d'épissage exonique (ESE) ([esefinder.ahc.umn.edu](http://esefinder.ahc.umn.edu)) ; et de nombreux autres outils de calcul pour estimer l'impact des variantes sur le promoteur, 5'- ou 3'-UTR, etc.

(c) Les données expérimentales obtenues à partir d'études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* de la version mutée par rapport à la version normale à tester, ou une partie de celle-ci, fournissent des informations importantes pour établir l'impact d'une variante génétique.

(d) Les données sur la ségrégation associées à un mode de transmission récessif lié au chromosome X et à la coségrégation avec l'hémophilie chez plusieurs membres de la famille touchés sont indicatives de la pathogénicité. En tenant compte de cette analyse, l'ACMG/AMP indique les critères de classification des variantes pathogènes considérant les données probantes comme très solides (PVS), solides (PS), modérées (PM) et favorables (PP) ; et les critères de classification de l'impact bénin ou neutre des variantes classant les preuves comme autonomes (BA), solides (BS) et favorables (BP). La classification finale dans une catégorie pour estimer la pathogénicité (1-5) résulte de la combinaison des scores de données probantes P\_ et B\_ (Richards et al., 2015).

**Comptes rendus d'interprétation** : les comptes rendus d'interprétation doivent être clairs et concis et aborder le diagnostic de la personne faisant l'objet de l'investigation. Au-delà de son principal objectif consistant à fournir une conclusion moléculaire générale en réponse à la question génétique, un compte rendu d'interprétation doit inclure suffisamment de détails pour permettre l'identification de la variante dans d'autres laboratoires (c.-à-d. indiquer les approches pratiques utilisées, les limites des techniques, la séquence de référence génomique utilisée et la classification de la pathogénicité selon les lignes directrices de l'ACMG, y compris les preuves appliquées pour la classification et les références ; Lignes directrices de l'ACGS, 2020 ; Deans et al., 2022 ; Claustres et al., 2014 ; Gomez et al., 2019). Les comptes rendus

d'interprétation doivent inclure des informations expliquant l'étendue réelle du diagnostic moléculaire en langage clair avec une indication précise des risques spécifiques de développer des phénotypes spécifiques dans la famille, par exemple.

**Assurance qualité :** dans les tests génétiques, l'assurance qualité couvre tous les aspects du processus de diagnostic, de l'extraction des acides nucléiques et des procédures analytiques à la classification et à la description des variantes détectées et à la production d'un compte rendu d'interprétation. Le contrôle interne de qualité (CIQ) des tests génétiques doit être effectué régulièrement pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Des programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) formels sont disponibles pour s'assurer que le processus de diagnostic et les procédures de communication sont en accord avec d'autres laboratoires (*Genomics Quality Assessment [GenQA]* notamment et, en particulier, l'évaluation génétique de l'hémophilie par le *National External Quality Assessment Service* Uni [UK NEQAS] britannique). Il y a lieu que les laboratoires de génétique soient périodiquement soumis à une accréditation, le cas échéant, par rapport aux normes internationalement reconnues, par un organisme agréé. Cela garantit une prestation de qualité en matière de diagnostic génétique.

## Références

- Abelleyro MM, Rossetti LC, Curto Mde L, Radic CP, Marchione VD, De Brasi CD. F8 intron 22 inversions and SNP rs73563631 in unrelated families with severe haemophilia A: Clinical features and gene testing implications. *Thromb Haemost* 2016; 115(3): 678-681.
- Abelleyro MM, Marchione VD, Elhelou L, Radic CP, Rossetti LC, Neme D, De Brasi CD. Somatic/germinal mosaicism of a F8 promoter deletion confounds clinical predictions in a family with haemophilia A: Key role of genotype quantitation. *Thromb Haemost* 2018; 118(3): 617-620.
- Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy. *Haematologica* 2004; 89(6): 758-759.
- Al-Allaf FA, Abduljaleel Z, Bogari NM, Owaidah TMA, Taher MM, Athar M et al. Identification of six novel factor VIII gene variants using next generation sequencing and molecular dynamics simulation. *Acta Biochim Pol* 2019; 66(1): 23-31.
- Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M, Simioni P. Factor IX-Padua enhances the fibrinolytic resistance of plasma clots. *Thromb Haemost* 2014; 111(2): 226-232.
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: Results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86(6): 2206-2212.
- Association for Clinical Genomic Science. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease. 2020. <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>.
- Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2015; 114(4): 757-767.
- Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: A novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(3): 591-598.
- Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99(1): 168-174.
- Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, Sanna S, Santagostino E, Mannucci PM, Goodeve A, Rodeghiero F. Deep intronic variations may cause mild hemophilia a. *J Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1541-1548.
- Chang CY, Perng CL, Cheng SN, Hu SH, Wu TY, Lin SY, Chen YC. Deep intronic variant c.5999-277G>A of F8 gene may be a hot spot mutation for mild hemophilia A patients without mutation in exonic DNA. *Eur J Haematol* 2019; 103(1): 47-55.
- Claustres M, Kožich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.
- Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO. Interaction of incontinentia pigmenti and factor VIII mutations in a female with biased X inactivation, resulting in haemophilia. *J Med Genet* 1993; 30(6): 497-500.



Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Öunap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *Eur J Hum Genet* 2022; 30(9): 1011-1016.

den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 2016; 37(6): 564-569.

Ding Q, Wu X, Lu Y, Chen C, Shen R, Zhang X, Jiang Z, Wang X. AccuCopy quantification combined with pre-amplification of long-distance PCR for fast analysis of intron 22 inversion in haemophilia A. *Clin Chim Acta* 2016; 458: 78-83.

Edison E, Konkle BA, Goodeve AC. Genetic analysis of bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22 Suppl 5(Suppl 5): 79-83.

Garagiola I, Mortarino M, Siboni SM, Boscarino M, Mancuso ME, Biganzoli M, Santagostino E, Peyvandi F. X chromosome inactivation: A modifier of factor VIII and IX plasma levels and bleeding phenotype in haemophilia carriers. *Eur J Hum Genet* 2021; 29(2): 241-249.

Gomez K, Laffan M, Keeney S, Sutherland M, Curry N, Lunt P. Recommendations for the clinical interpretation of genetic variants and presentation of results to patients with inherited bleeding disorders. A UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Good Practice Paper. *Haemophilia* 2019; 25(1): 116-126.

Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Noninvasive detection of F8 int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017; 130(3): 340-347.

Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1(2): 264-274.

Janczar S, Kosinska J, Ploski R, Pastorczak A, Wegner O, Zalewska-Szewczyk B, Paige AJ, Borowiec M, Mlynarski W. Haemophilia A and cardiovascular morbidity in a female SHAM syndrome carrier due to skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 2016; 59(1): 43-47.

Johansson J, Lidéus S, Höijer I, Ameer A, Gudmundsson S, Annerén G, Bondeson ML, Wilbe M. A novel quantitative targeted analysis of X-chromosome inactivation (XCI) using nanopore sequencing. *Sci Rep* 2023; 13(1): 12856.

Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, Fretigny M, Meunier S, Zawadzki C, Gay V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Study of six patients with complete F9 deletion characterized by cytogenetic microarray: Role of the SOX3 gene in intellectual disability. *J Thromb Haemost* 2016; 14(10): 1988-1993.

Jourdy Y, Chatron N, Fretigny M, Carage ML, Chambost H, Claeysens-Donadel S, Roussel-Robert V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Molecular cytogenetic characterization of five F8 complex rearrangements: Utility for haemophilia A genetic counselling. *Haemophilia* 2017; 23(4): e316-e323.

Jourdy Y, Fretigny M, Lassalle F, Lillicrap D, Négrier C, Vinciguerra C. The highly prevalent deletions in F8 intron 13 found in French mild hemophilia A patients result from both founder effect and recurrent de novo events. *J Thromb Haemost* 2020; 18(5): 1087-1093.

Jourdy Y, Janin A, Fretigny M, Lienhart A, Négrier C, Bozon D, Vinciguerra C. Recurrent F8 intronic deletion found in mild hemophilia A causes Alu exonization. *Am J Hum Genet* 2018; 102(2): 199-206.

Kumar P, Husain N, Soni P, Faridi NJ, Goel SK. New protocol for detection of intron 22 inversion mutation from cases with hemophilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(3): 255-259.

Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5(3): 236-241.

Lannoy N, Hermans C. Review of molecular mechanisms at distal Xq28 leading to balanced or unbalanced genomic rearrangements and their phenotypic impacts on hemophilia. *Haemophilia* 2018; 24(5): 711-719.

Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laros JFJ. Mutalyzer 2: Next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics* 2021; 37(18): 2811-2817.

Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 375-379.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92(4): 1458-1459.

- Lyu C, Xue F, Liu X, Liu W, Fu R, Sun T et al. Identification of mutations in the F8 and F9 gene in families with haemophilia using targeted high-throughput sequencing. *Haemophilia* 2016; 22(5): e427-e434.
- Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radic CP et al. 5meCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PLoS One* 2014; 9(7): e103714.
- Manderstedt E, Nilsson R, Lind-Halldén C, Ljung R, Astermark J, Halldén C. Targeted re-sequencing of F8, F9 and VWF: Characterization of Ion Torrent data and clinical implications for mutation screening. *PLoS One* 2019; 14(4): e0216179.
- McVey JH, Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ, Ludlam CA. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 2020; 26(2): 306-313.
- Nisen PD, Waber PG. Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1400-1403.
- Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separation of intron 22 inversion type 1 and 2 of hemophilia A by modified inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Talanta* 2014; 130: 328-335.
- Pezeshkpoor B, Czogalla KJ, Caspers M, Berkemeier AC, Liphardt K, Ghosh S, Kellner M, Ulrich S, Pavlova A, Oldenburg J. Variants in FIX propeptide associated with vitamin K antagonist hypersensitivity: Functional analysis and additional data confirming the common founder mutations. *Ann Hematol* 2018; 97(6): 1061-1069.
- Radic CP, Rossetti LC, Abelleiro MM, Tetzlaff T, Candela M, Neme D et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4): 530-539.
- Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1329-1340.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.
- Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15(7): 569-572.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 830-836.
- Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus* 2019; 17(1): 72-82.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; 111(3): 1240-1247.
- Shen W, Gu Y, Zhu R, Zhang L, Zhang J, Ying C. Copy number variations of the F8 gene are associated with venous thromboembolism. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 259-262.
- Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagani L, Bulato C et al. Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood* 2021; 137(17): 2383-2393.
- Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361(17): 1671-1675.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.
- Sun P, Ma L, Diao G, Li CQ, Lin FZ. Application of indirect linkage analysis and direct genotyping to hemophilia A carrier detection in Sichuan, China. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 8229-8235.
- van Galen KPM, d'Oiron R, James P, Abdul-Kadir R, Kouides PA, Kulkarni R et al. A new hemophilia carrier nomenclature to define hemophilia in women and girls: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021; 19(8): 1883-1887.