



11-13  
SEPT.  
2024

LILLE  
GRAND PALAIS

# CONGRÈS FRANÇAIS d'HÉMOSTASE



## Mise en évidence des variants introniques profonds: exemple de l'hémophilie

Yohann JOURDY

**HCL**

HOSPICES CIVILS  
DE LYON

UR-4609

Hémostase & Thrombose



# Le diagnostic moléculaire conventionnel des hémophiles



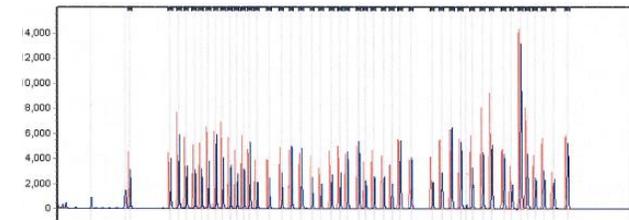
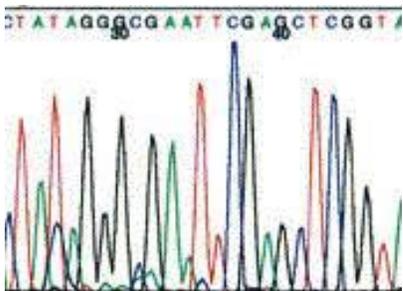
## ➤ Recherche des inversions récurrentes

- Inversion de l'intron 22  $\approx$  45% des formes sévères d'hémophilie A
- Inversion de l'intron 1  $\approx$  2% des formes sévères d'hémophilie A

## ➤ Séquençage direct des régions codantes, des jonctions intron/exon et de la région 3'UTR et de la région promotrice.

- 5% du gène *F8* (9kb/189Kb)
- 9% du gène *F9* (2.8kb/33kb)

## ➤ Recherche d'anomalie du nombre de copie (MLPA)



# Le diagnostic moléculaire conventionnel des hémophiles

## ➤ Taux de résolution des cas d'hémophilie A :

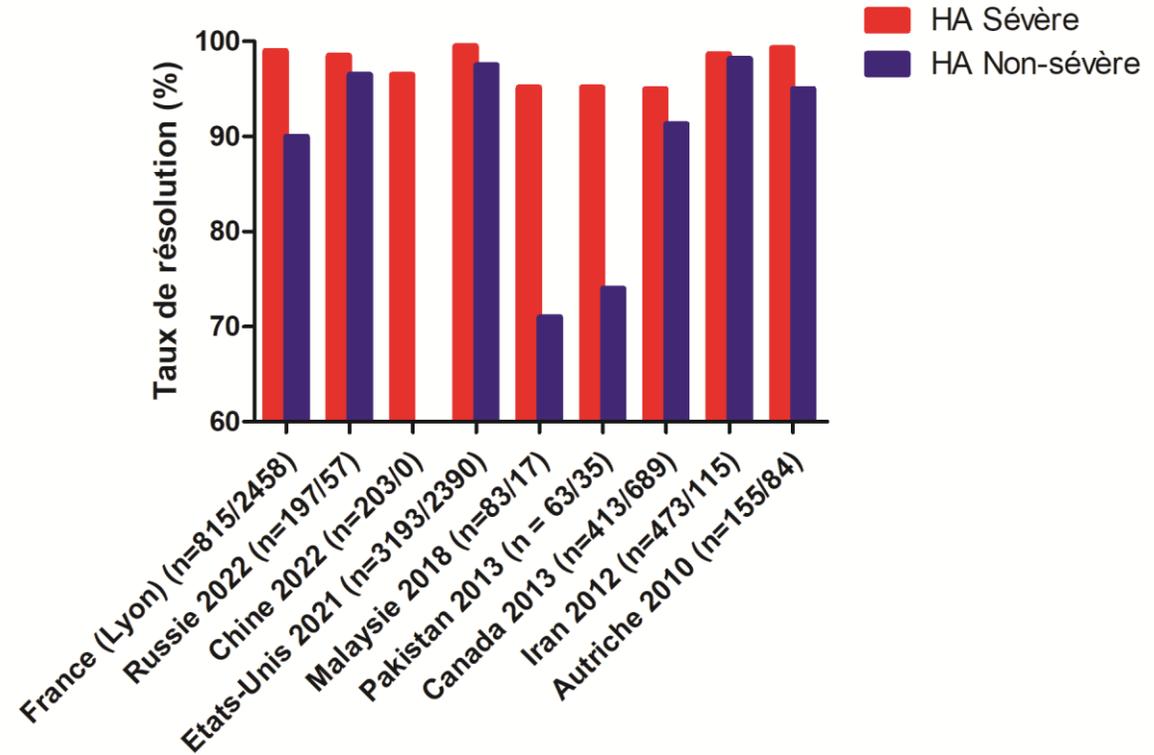
- Formes sévères > 98%
- Formes non-sévères : 75-95%

## ➤ Taux de résolution des cas d'hémophilie B : >98% (toutes sévérités confondues)\*

Exemple de cohorte HB (Johnsen JM *et al* 2021)

- 100 % des 508 formes sévères résolues
- 98.5 % des 895 formes non sévères résolues

Taux de résolution des cas d'hémophilie A  
(cohortes >100 individus)



# Patients en échec de diagnostic moléculaire

Hypothèse 1 : Erreur de diagnostic ?

Mais le **diagnostic de certitude des hémophilies est biologique**

## Hémophilie B

→ FIX:C <40% isolé

## Hémophilie A

- FVIII:C <1%
- FVIII:C ≤40% et transmission liée à l'X claire dans la famille
- FVIII:C ≤ 40% et exclusion maladie de Willebrand et du déficit combiné FV+FVIII

Hypothèse 2 : variants pathogènes localisés dans une région des gènes *F8/F9* inexplorée en génétique conventionnelle (SNPs / structure) :

→ **variants introniques profonds**

# Variants introniques profonds dans l'hémophilie

- L'existence de **variants introniques pathogènes** dans le **F8** est connue depuis longtemps
  - Variants responsables **d'anomalie d'épissage** (rétention de portion d'intron dans les ARNm matures → Pseudo-exon)
  - Détectés par **étude des ARNm** de patients hémophiles A
- Jamais décrit dans l'hémophilie B avant 2022

## Première description en 1999

Creation of a novel donor splice site in intron 1 of the factor VIII gene leads to activation of a 191 bp cryptic exon in two haemophilia A patients

RICHARD D. BAGNALL,<sup>1</sup> NAUSHIN H. WASEEM,<sup>1</sup> PETER M. GREEN,<sup>1</sup> BRIAN COLVIN,<sup>2</sup> CHRISTINE LEE<sup>3</sup> AND FRANCESCO GIANNELLI<sup>1</sup> <sup>1</sup>Division of Medical and Molecular Genetics, Guy's, King's and St Thomas's School of Medicine, London, <sup>2</sup>Department of Haematology, Haemophilia Centre, The Royal London Hospital, Whitechapel, London, and <sup>3</sup>Haemophilia Centre, The Royal Free Hospital, London

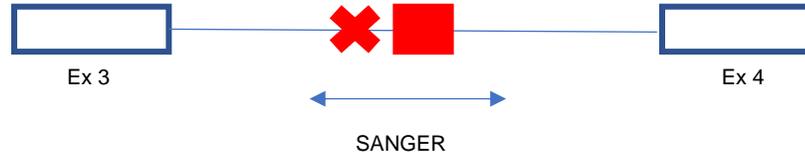
# Stratégie ARNm first

ARNm



1) **Identification d'un transcrit aberrant**  
(rétention intronique = Pseudo-exon (PE))

ADN

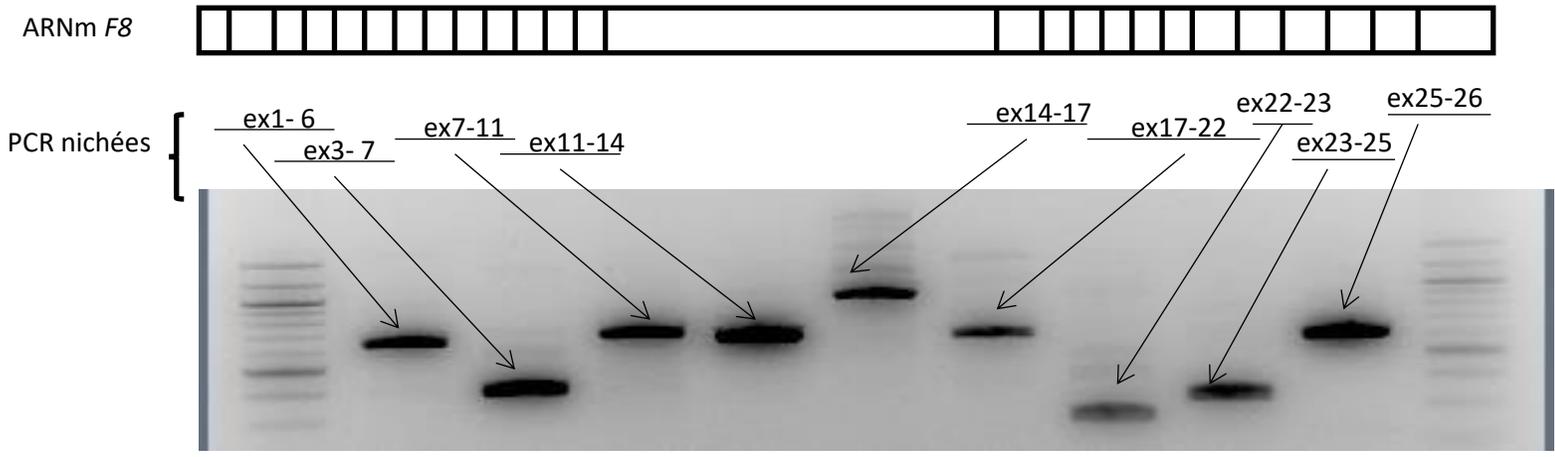
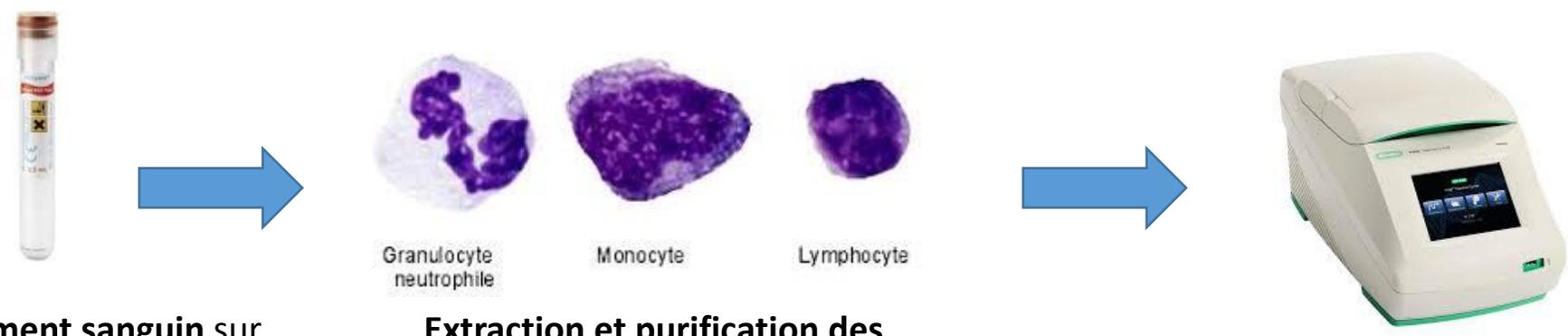


2) **Séquençage de la région intronique** d'où est  
originnaire le PE

Variant génétique candidat

3) **Identification d'un variant génétique** dans cette  
région qui est probablement responsable de  
l'anomalie d'épissage

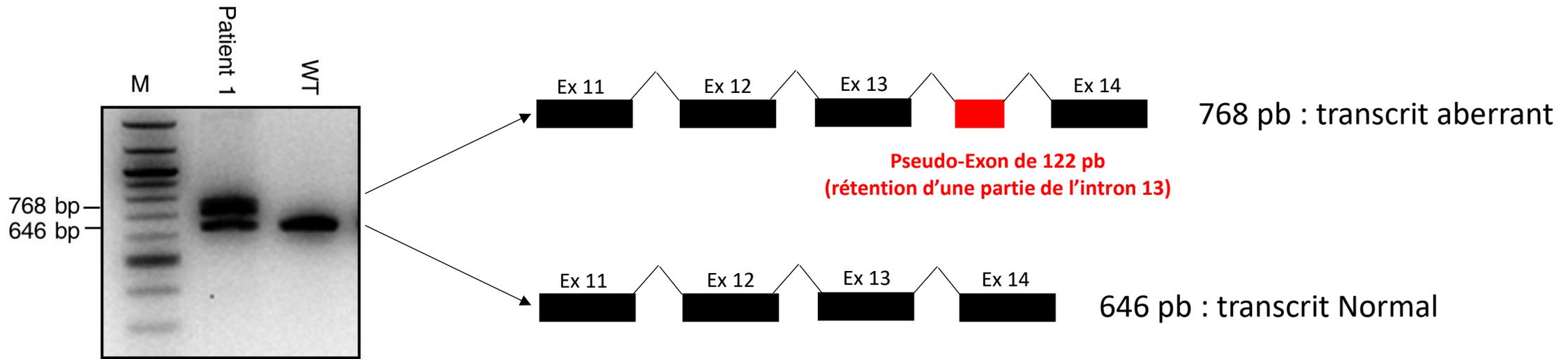
# Etude des transcrits du gène *F8*



**Objectif : analyse des 25 jonctions exon/exon**

# Etude des transcrits du gène *F8* : illustration

- HA mineur (FVIII:C = 31%), diagnostic moléculaire conventionnel négatif
- ➔ analyse des transcrits du gène *F8* : présence de 2 transcrits



Etude du fragment correspondant aux exons 11 à 14

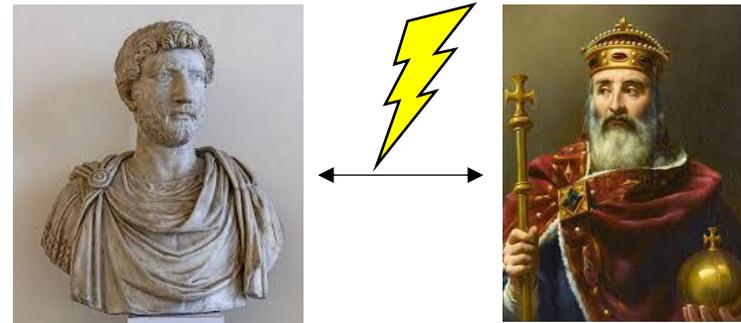


# Délétions récurrentes dans l'intron 13 du gène *F8*

- Délétions de 9 à 14 pb dans la même région de l'intron 13 du gène *F8*
- Responsables ≈ **5-10 % des formes mineures d'hémophilie A** en France.  
**Anomalie systématiquement recherchée** pour les formes mineures
- Prévalence élevée expliquée par :
  - **Effet fondateur** dans la population française pour la délétion de 13 pb (daté entre II<sup>e</sup> et VIII<sup>e</sup> siècles)
  - **Phénomène récurrent** : fragilité intrinsèque de la région génomique

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

Yohann Jourdy<sup>1,2</sup>  | Mathilde Frétigny<sup>1</sup> | Fanny Lassalle<sup>3,4</sup>  | David Lillicrap<sup>5</sup> |  
Claude Négrier<sup>1,2</sup> | Christine Vinciguerra<sup>1,2</sup>

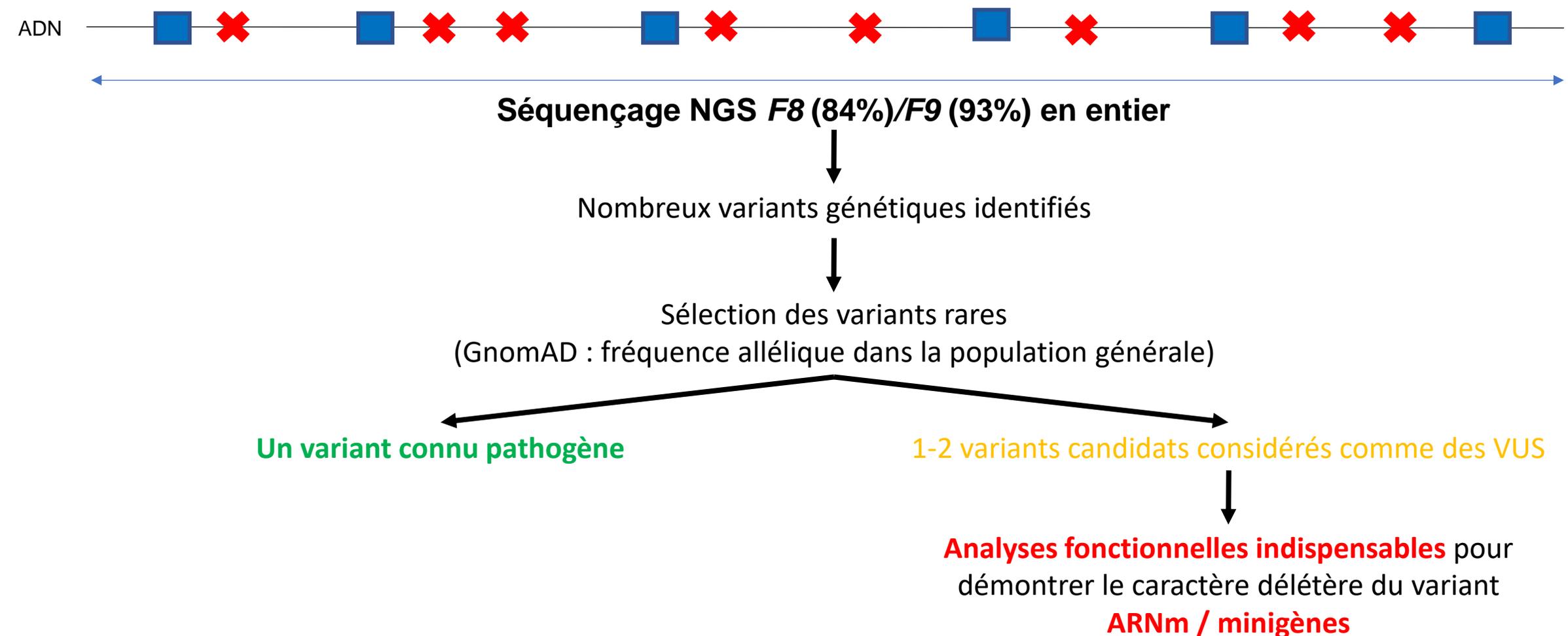


# Etude des transcrits du gène *F8* : bilan

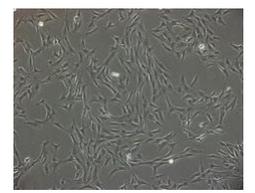
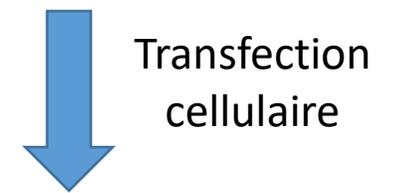
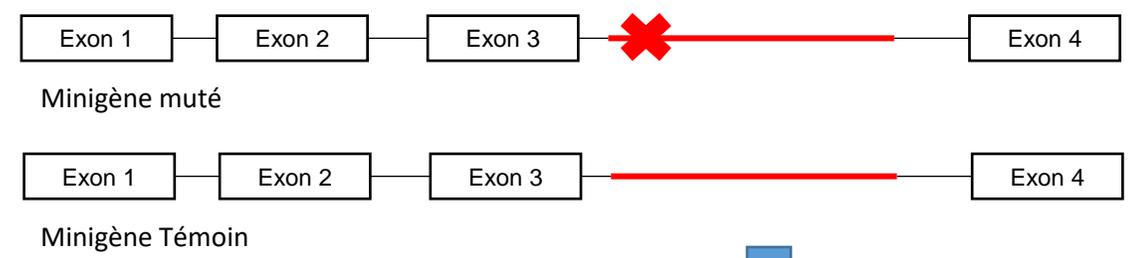
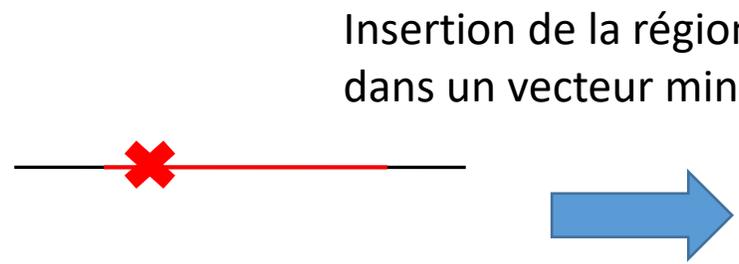
- **ARNm first** : quelques études dans la littérature portant sur de petits nombres de patients HA → description ≈ 10 variants introniques profonds pathogènes pour le *F8*
- Méthode rapide et peu coûteuse
- **MAIS**
  - Conditions pré-analytiques drastiques (tube PAXGENE)
  - **Non applicable aux femmes et à l'hémophilie B**
  - Manque de sensibilité (transcrits aberrants parfois instables)
  - **Ne détecte que les variants introniques profonds responsables anomalies d'épissage**
- **Changement de stratégie** : mise en place du séquençage complet des gènes *F8* et *F9*  
→ Thèse d'université d'Amy Dericquebourg (début 2019-soutenance 2023)



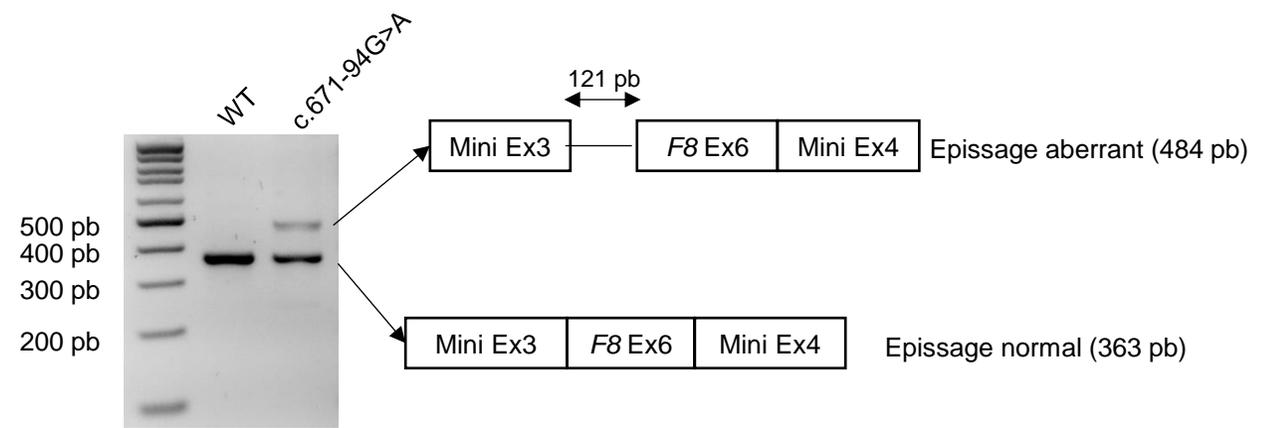
# Séquençage entier des gènes *F8* et *F9*



# Etude par Minigène



- Extraction ARNm
- RT-PCR
- Migration sur gel
- Séquençage



# Séquençage entier des gènes *F8* et *F9* : Cas des formes non sévères d'hémophilie

**17 patients HB inclus dans ce travail**

n = 1 modéré  
n = 16 mineurs

En moyenne **7** (2 - 22) variants dans le gène *F9*

**9** variants d'intérêt retenus chez **15** patients

**5** variants pathogènes chez **13** patients

**Résolution de 75% des cas**

**49 patients HA inclus dans ce travail**

n = 2 modérés  
n = 47 mineurs

En moyenne **30** (10 - 63) variants dans le gène *F8*

**33** variants d'intérêt retenus chez **42** patients

**15** variants pathogènes chez **33** patients

**Résolution de 66% des cas**

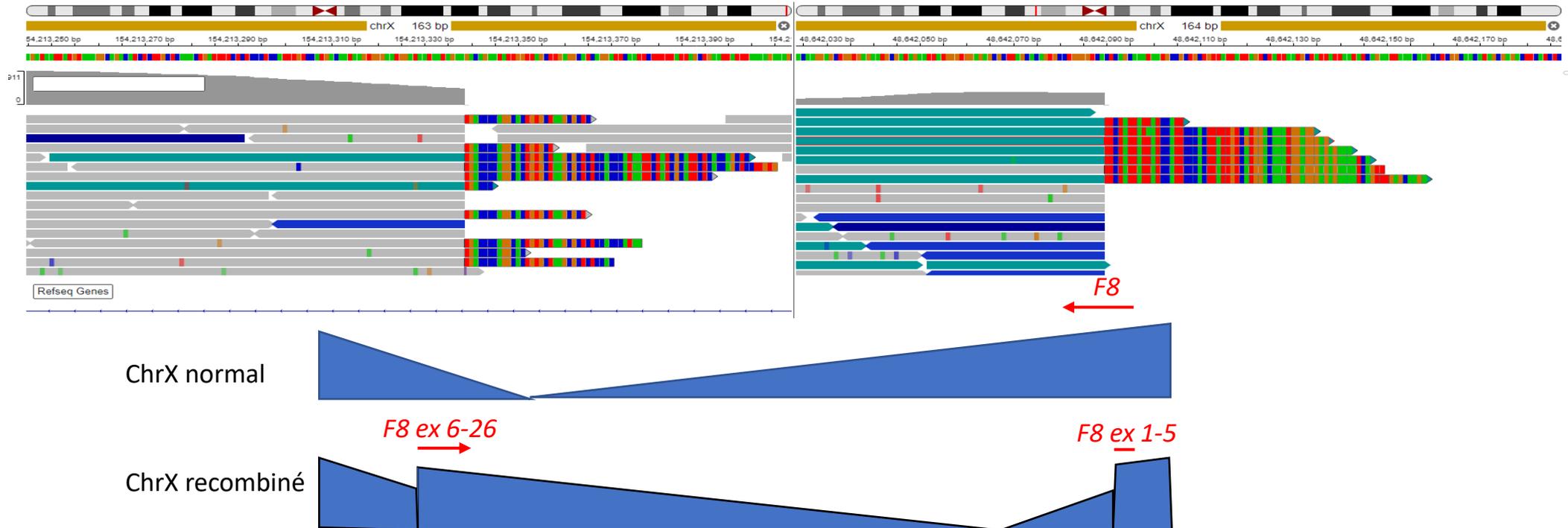
NGS gène entier

Filtres bio-informatiques

Analyses fonctionnelles : ARNm/Minigène

# Séquençage entier du gène *F8* : Cas des formes sévères d'hémophilie A

- 8 hémophiles A sévères en échec de diagnostic moléculaire (sur 813 familles)  $\approx$  1% des cas d'hémophilie A sévère
- NGS gène entier : **identification de point de cassure dans le gène *F8* dans 100% des cas**



# Séquençage entier des gènes *F8* et *F9*: bilan

- Les **hémophilies A sévères** en échec de diagnostic moléculaire sont causées par des **variants de structure** interrompant le gène *F8*.
- Les variants introniques profonds **impactant l'épissage** des gènes *F8* ou *F9* sont plutôt associés aux formes **non sévères d'hémophilie**
- Taux de résolution dans notre cohorte :
  - HA sévères : 100 % (815/815)
  - HA non sévères : 98,6% (1621/ 1643)
  - HB : 99,4% (711/715)
- En France, **≈10% des formes non sévères d'hémophilie A** sont causées par des variants introniques profonds → justification du **NGS gène entier en routine**

# Séquençage entier des gènes *F8* et *F9*: en prospectif

- **Analyse prospective** des résultats sur la période **Avril 2021 – Juillet 2024**
  - 336 nouvelles familles d'hémophilie A
  - 102 nouvelles familles d'hémophilie B

Phénotype	% positif génétique conventionnelle	% positif Whole gène
	<b>Hémophilie A</b>	
Sévère	95,2% (20/21)*	<b>100 (21/21)*</b>
Non-sévère	84,1 % (222/264)	<b>98% (258/264)</b>
Femmes Taux bas	75% (19/25)*	<b>84% (21/25)*</b>
Conductrice obligatoire	86% (6/7)*	<b>100% (7/7)*</b>
	<b>Hémophilie B</b>	
Sévère	100% (5/5)	100% (5/5)
Non-sévère	86% (64/74)	<b>97% (72/74)</b>
Femmes Taux bas	67% (8/12)	67% (8/12)
Conductrice obligatoire	100% (1/1)	100% (1/1)

\*hors patients avec inversions de l'intron 22 ou de l'intron 1

# Et les patients non résolus ?

Hémophiles non résolus après séquençage entier des gène *F8/F9*

Individus avec **un variant candidat** mais **pas d'impact identifié sur l'épissage** en analyse fonctionnelle

Individus **sans variant candidat**



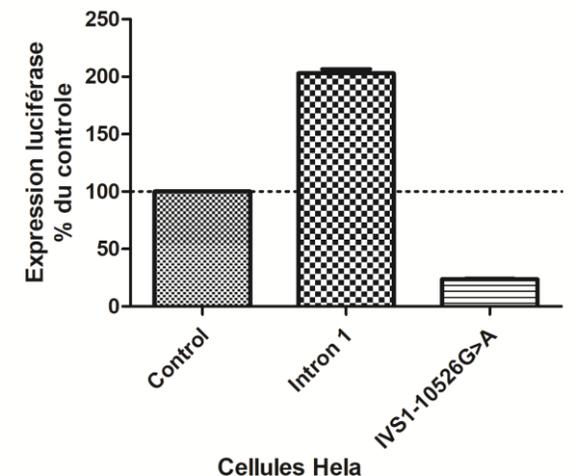
Autre mécanisme physiopathologie ?

# Variants introniques profonds sans impact identifié sur l'épissage

- Variants introniques profonds dont les résultats en minigène et/ou ARNm sont normaux
  - Variants bénins ?
  - Autres mécanismes physiopathologiques ?
- ➔ Plusieurs études en cours au sein de l'UR4609 Hémostase et thrombose

**Exemple** : *F8* c.144-10526G>A (intron 1) identifié chez un hémophile A mineur (FVIII:C = 16%)

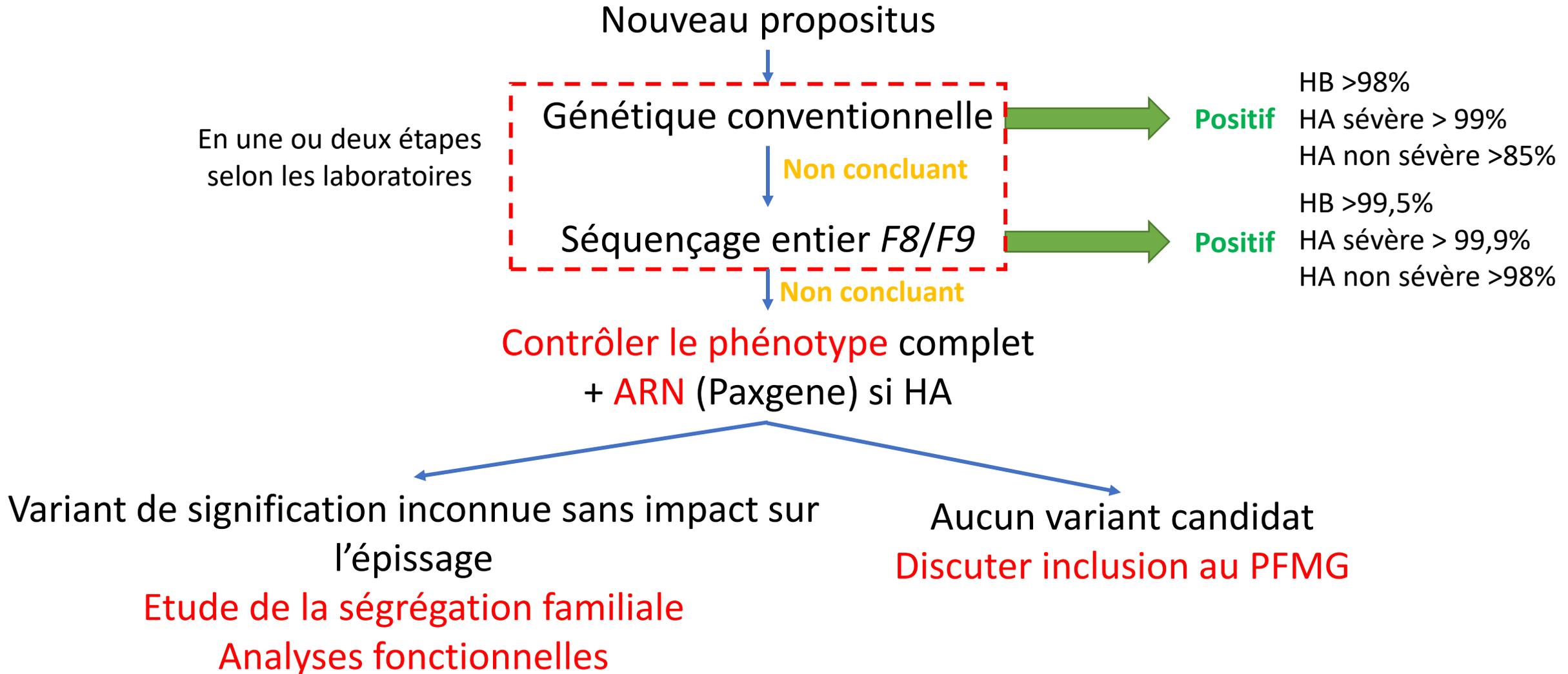
- ARNm et minigène négatif
- Hypothèse : anomalie de la transcription
- Mise au point d'un modèle Luciférase : probable altération d'une séquence stimulatrice de la transcription du *F8*



# Profils des patients négatifs en NGS gène entier

- **Hémophile A sans variant candidat (n = 8) :**
  - **Phénotype mineur** avec FVIII > 30% (un cas FVIII:C = 10%)
  - **Cas sporadiques**
- **Hémophilie B sans variant candidat (n = 3) :**
  - **Phénotype mineur** (FIX:C = 10%, 38% et 45%)
  - **Cas sporadiques**
- **Hypothèses chez ces patients :**
  - Variants pathogènes localisés dans les régions non couvertes par le NGS
  - Erreur de diagnostic mais *VWF*, *LMAN1* et *MCFD2* dans la puce NGS
  - Causes multifactorielles (association de plusieurs polymorphismes ?)

# Conclusion : diagnostic moléculaire des hémophilies



# Remerciements

- A l'ensemble des organisateurs du CFH de Lille
- A l'équipe de biologie moléculaire du CHU de Lyon
- A l'ensemble de nos prescripteurs
- Au réseau Génostase



# CONGRÈS de LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE de THROMBOSE ET d' HÉMOSTASE



**SFTTH**

SOCIÉTÉ FRANÇAISE  
DE THROMBOSE  
ET D'HÉMOSTASE

1<sup>ER</sup>-3  
OCTOBRE  
2025

