

## Des inversions par recombinaison homologue sont cause de la moitié des cas sévères d'hémophilie A

L'hémophilie A, due au déficit en facteur antihémophilique A ou F VIII, avec sa fréquence de 1 pour 5 000 garçons, est, parmi les maladies liées au sexe, une des plus fréquentes et des mieux étudiées. Un ADNc a été préparé dès 1985, comme l'a rapporté *médecine/sciences* dans son premier numéro (n° 1, vol. 1, p. 50), et son utilisation pratique est l'objet de travaux multiples.

Un très grand nombre de mutations de ce gène, dont le siège est en Xq28 non loin du télomère, ont été observées, dont aucune ne paraît dominer. Une compilation faite en 1991 [1] recensait plus de 80 mutations ponctuelles, 6 insertions, 7 délétions courtes et 60 de grande taille. Comme on peut s'y attendre, les mutations faux-sens sont le plus souvent à l'origine de déficits modérés, alors que non-sens et délétions conduisent à des formes sévères. Cependant, une observation laissait les spécialistes perplexes. Lors d'une tentative faite pour analyser systématiquement les anomalies [2, 3], aucune mutation des parties codantes ni des jonctions exon-intron n'était découverte dans environ la moitié des formes sévères (moins de 1 % d'activité). Où fallait-il chercher les régions régulatrices qui paraissaient désormais en cause ? Un début de réponse fut apporté par Naylor *et al.* (Londres et Oxford, GB) [4]. Ils ont recherché les mutations sur l'ADNc obtenu par amplification de l'ARNm retranscrit (RT-PCR). Le messenger du FVIII est codé par 26 exons. Une amplification entre les exons 1 et 22, ainsi qu'entre 23 et 26, est toujours possible. Mais, dans dix cas sur les vingt-

quatre essayés, on ne pouvait passer de 22 à 23. Il devait donc y avoir, et cela fréquemment, une anomalie de l'intron 22. Or cet intron est inhabituel à plusieurs égards : il est d'abord, avec ses 32 kb, le plus grand intron du gène. Surtout il contient un îlot CpG, à 10 kb en aval de l'exon 22. Le groupe américain de J Gitschier [5] a montré un phénomène unique : à l'intérieur de l'intron se trouve un promoteur bidirectionnel pour deux gènes appelés gènes A et B associés au FVIII. Le gène A, transcrit en direction opposée à celle du VIII, n'a pas d'intron et est entièrement contenu à l'intérieur de l'intron 22. Deux autres copies de ce même gène A se trouvent sur le chromosome X, 500 kb en amont de celui du FVIII (il est à remarquer que, la transcription du FVIII se faisant du télomère vers le centromère, « amont » signifie ici le côté télomérique). Le gène B est transcrit dans le même sens que le FVIII. Son premier exon, qui code pour 8 acides aminés, est dans l'intron 22 et est épissé aux exons 23-26. L'expression des gènes A et B est ubiquitaire, et l'on en ignore la fonction.

A partir de ces données, le groupe dirigé par J Gitschier [6] a imaginé un modèle qu'il a ensuite testé. Ce modèle est schématisé sur la *figure 1*. Son postulat essentiel est une recombinaison homologue entre le gène intronique A et l'un des deux autres gènes A situés en amont. Si l'orientation de ce gène est opposée à celle du gène intronique, l'appariement homologue et un événement unique de *crossing over* provoqueraient une inversion de séquences

de l'ADN. Par suite, le gène du FVIII se trouverait divisé en deux parties, l'une contenant le promoteur et les exons 1 à 22, l'autre, à distance et d'orientation opposée, contenant les exons 23 à 26. Si, au contraire, l'orientation était la même, on obtiendrait une rupture et la séparation de deux produits, ce qui n'a pas été observé. Les procédés mis en œuvre pour démontrer la validité du modèle sont assez complexes. Il faut d'abord identifier les malades : cela s'est fait par l'analyse RT-PCR, qui montre que l'amplification ne peut se faire pour le passage entre les exons 22 et 23, alors que des transcrits séparés sont présents pour les deux portions. L'étape suivante vise à démontrer que les fragments qui incluent les points de cassure dans l'intron 22 ont changé de taille, ce que l'on peut voir très simplement en *Southern blot* après action de l'enzyme de restriction BclI. On peut enfin démontrer que l'exon 22, séparé de son partenaire habituel d'épissage, s'épisse à une autre séquence, voisine des gènes A situés en amont. Cette étude a été étendue en tout à dix-neuf sujets, chez neuf desquels le modèle de recombinaison-inversion est applicable. D'après la longueur des fragments, on conclut que la recombinaison se produit le plus souvent avec le gène A le plus distal. Le fait que celui-ci soit orienté à l'opposé du gène A intronique a été vérifié grâce à deux YACs qui le contiennent.

La découverte de Lakich *et al.* [6] est confirmée, d'après un éditorialiste de *Nature Genetics* [7], par des résultats encore sous presse de Naylor

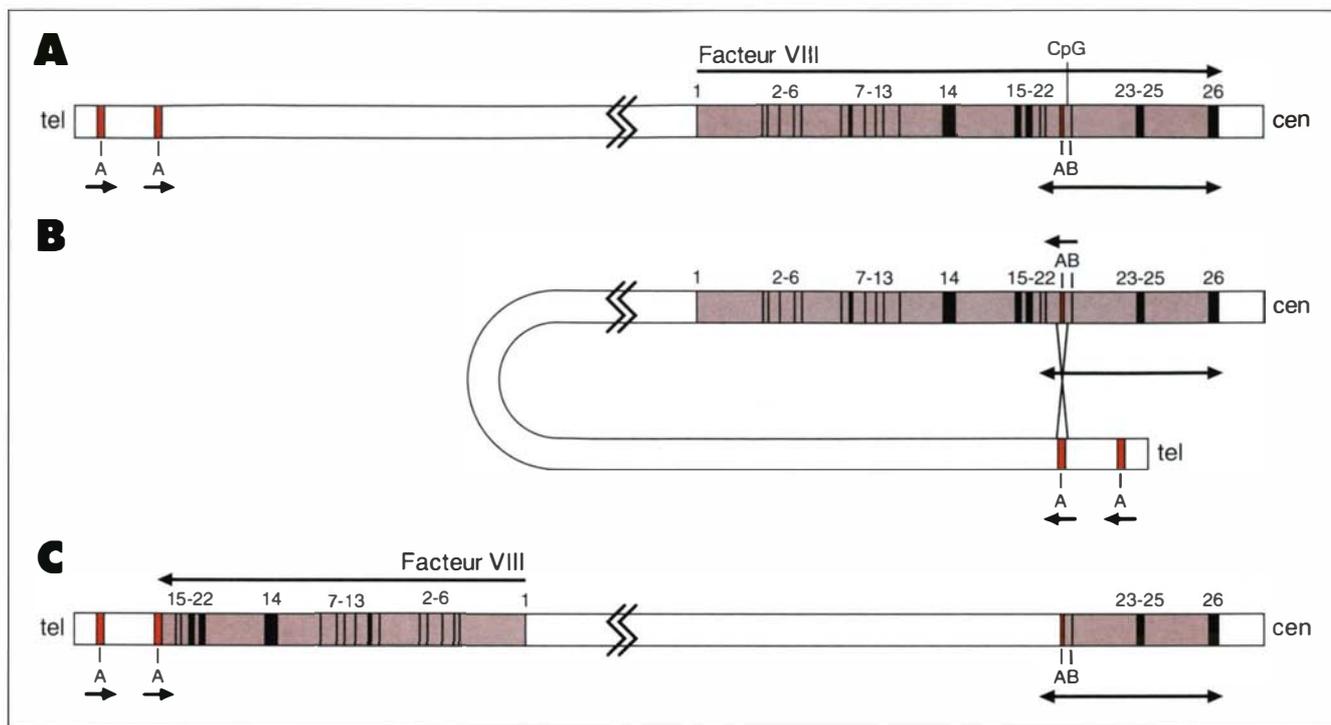


Figure 1. **Modèle de recombinaison-inversion** (d'après [6]). (a) Schéma du gène du FVIII, du télomère au centromère, montrant les exons, les gènes A et B de l'intron 22, les 2 gènes A en amont ; (b) Appariement du gène A intronique avec un des gènes A en amont (ici le moins distal), suivi d'un crossing-over, qui peut avoir lieu en un point quelconque de la région d'homologie ; (c) Résultat chez le malade : les exons 1 à 22 sont en situation inversée par rapport à la normale, et à distance des exons 23 à 26, mais sans rupture du gène ni perte d'ADN.

lor, *et al.* Elle présente un double intérêt, pratique et théorique. Au plan pratique, elle fournit une solution pour le diagnostic moléculaire de près de la moitié des formes graves d'hémophilie A : il apparaît en effet raisonnable de commencer l'étude d'un nouveau cas par le test proposé ; cela d'autant plus que ce test est simple : il suffit d'effectuer un *Southern blot* sur un ADN digéré par *BclI* pour mettre en évidence des bandes anormales. Sur le plan théorique, ce genre d'inversion paraît unique jusqu'à présent. Les inversions décrites dans d'autres maladies s'accompagnent en règle de délétions d'ADN flanquant, alors que dans l'hémophilie A on retrouve présente la totalité de l'ADN. Elles sont en outre réservées

à une ou à quelques familles. La raison de cette particularité est certainement la présence de gènes A homologues en diverses positions du chromosome. Il est possible en outre que la proximité du télomère introduise une flexibilité de cette région chromosomique, favorable à une recombinaison.

J.C.D.

1. Tuddenham EGD, Cooper DN, Gitschier J, *et al.* Haemophilia A : database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 1991 ; 19 : 4821-33.

2. Higuchi M, Kazazian HH Jr, Kasch L, *et al.* Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7405-9.
3. Higuchi M, Antonorakis SE, Kasch L, *et al.* Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A. Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 8307-11.
4. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 11-7.
5. Levinson B, Kenwick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 1990 ; 7 : 1-11.
6. Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonorakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993 ; 5 : 236-41.
7. Tuddenham EGD. Flipping the tip of the X. *Nature Genet* 1993 ; 5 : 209.