

Altération de la séquence Kozak du gène *F8* : un nouveau mécanisme moléculaire responsable d'hémophilie A mineure



Avec le soutien de l'Association
des Internes et des Anciens Internes
en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon

B. Gallet¹, M. Frétny¹, C. Vinciguerra^{1,2}, Y. Jourdy^{1,2}

¹Laboratoire d'hématologie, Hospices Civils de Lyon - Lyon (France),
²UR4609 Hémostase et thrombose, Université Claude Bernard Lyon 1 - Lyon (France)



Introduction

- Malgré les dernières avancées en matière de diagnostic moléculaire de l'hémophilie A, ce dernier est non conclusif dans environ 5% des formes non sévères.
- La séquence Kozak est la séquence consensus qui permet le début de la traduction des ARNm par le ribosome. A l'exception des positions c.1 à c.3 qui sont invariables (codon d'initiation ATG), les autres positions de la séquence Kozak sont très peu conservées.
- En dehors des variants localisés au niveau du codon d'initiation qui sont responsables d'hémophilie A sévère, aucun variant affectant les autres positions de la séquence Kozak du gène *F8* n'a été décrit comme responsable d'hémophilie A (Figure 1).



Figure 1 : Représentation de la séquence Kozak du gène *F8* (c.-9_c.4). La zone bleue correspond au début de la traduction. Les seuls variants localisés dans cette région décrits dans la littérature à ce jour affectent le codon d'initiation et sont responsables de forme sévère d'hémophilie A.

Objectif : démontrer le caractère délétère de deux variants de signification inconnue localisés dans la séquence Kozak du gène *F8*

Matériels et méthodes



Figure 2 : Représentation schématique du vecteur *pGL4.26[luc2/PromF8/Hygro]* utilisé dans ce travail. Les bases soulignées correspondent aux localisations des variants étudiés (c.-1C>T et c.-3G>C).

- Les patients ont bénéficié d'un séquençage entier du gène *F8* et d'une recherche d'anomalie du nombre de copie par MLPA.
- Les variants d'intérêts ont été insérés par mutagenèse dirigée sur le vecteur *pGL4.26[luc2/PromF8/Hygro]*. Ce vecteur code le gène de la luciférase. Ce dernier est sous la dépendance du promoteur du gène *F8* (c.-279_-64). Ce vecteur a été préalablement modifié afin de restaurer la séquence Kozak du *F8* (c.-9_4) (figure 2). Ces vecteurs ont été transfectés dans des cellules Huh7 et l'activité de la Luciférase a été mesurée 48h après (n=8).

Résultats

Patient	FVIII:C, %	FVIII:CR, %	FVIII:Ag, %	Phénotype	Variant candidat
P1	30	28	22	Mineur	c.-1C>T
P2	29	NR	NR	Mineur	c.-1C>T
P3	36	NR	NR	Mineur	c.-1C>T
P4	8	NR	NR	Mineur	c.-3G>C

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques des patients inclus dans ce travail

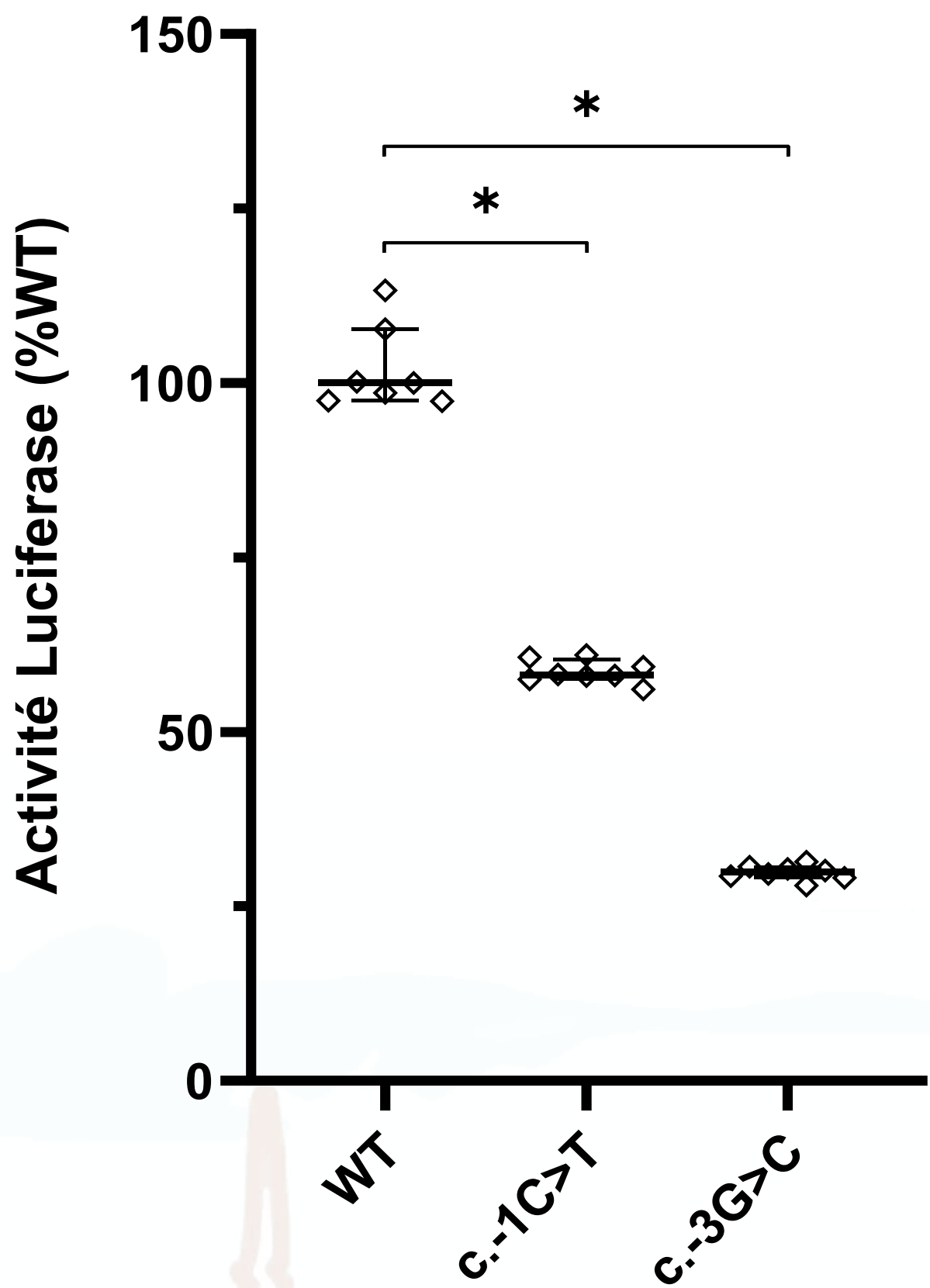


Figure 4 : Activité luciférase obtenue dans les lysats de cellules Huh7 48 h après transfection. Les résultats sont exprimés en % de la séquence Kozak Wild-type. *p<0,05.

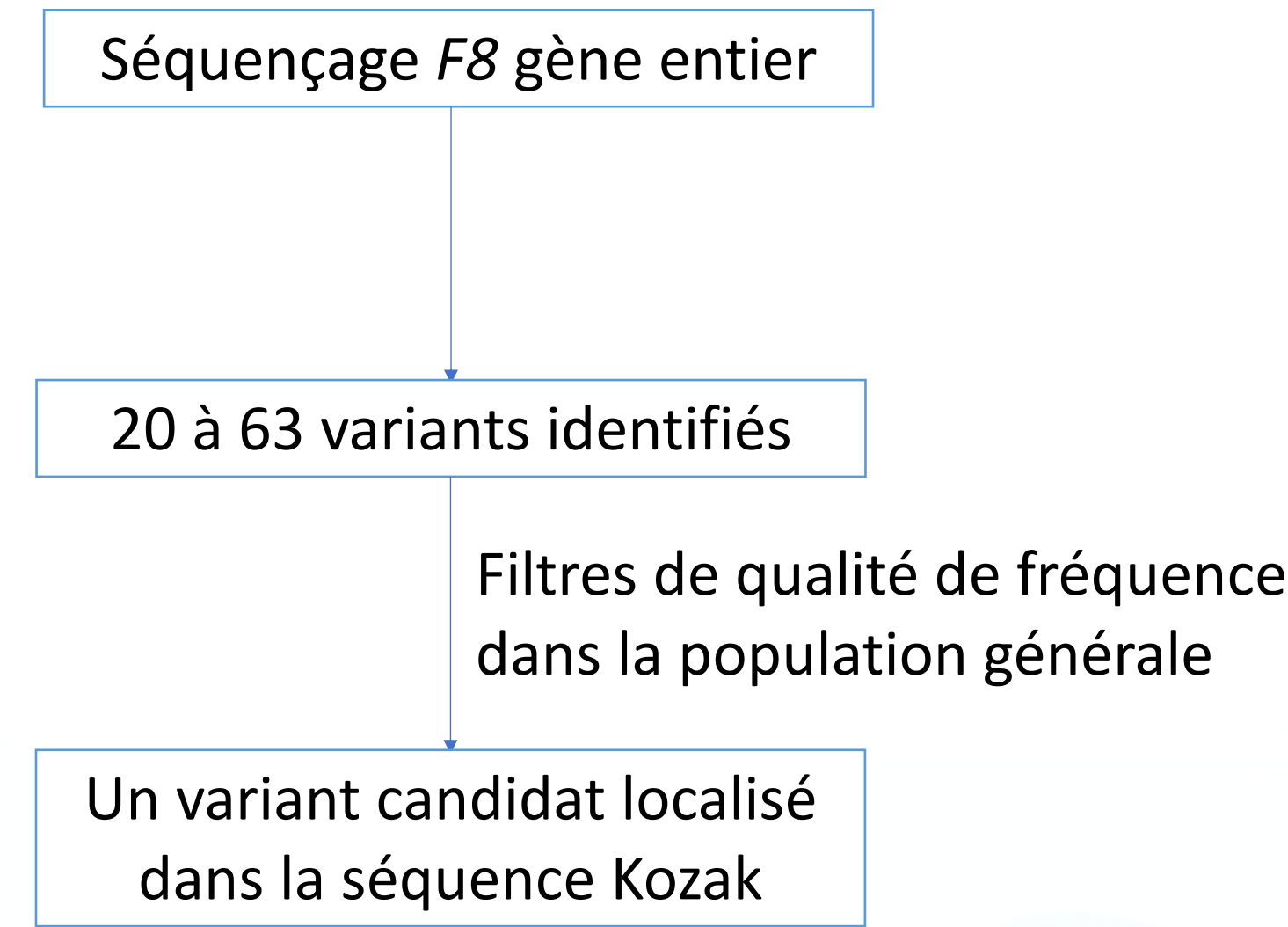


Figure 3 : résumé de l'analyse NGS du gène *F8* en entier réalisée chez les 4 patients inclus dans ce travail.

- 4 patients hémophiles A mineurs non apparentés (FVIII:C = 8-36%) ont été inclus dans ce travail (tableau 1).
- Le séquençage entier du gène *F8* a identifié chez chacun d'entre eux un variant de signification inconnue dans la séquence Kozak du gène *F8* (Figure 3).
- Le variant c.-1C>T est retrouvé chez trois patients non apparentés et le variant c.-3G>C est identifié chez un patient. Ces variants n'ont jamais été décrits dans la littérature chez des individus hémophiles. Seul le variant c.-1C>T est répertorié dans la base de données de population GnomAD V4 avec une fréquence de 8.25e-7 dans la population générale.
- Les activités luciférases rationalisées pour les variants c.-1C>T et c.-3G>C étaient respectivement de 58% du WT (p=0,0002) et de 30% du WT (p=0,0002). Ces résultats sont compatibles avec un phénotype mineur d'hémophilie A et permettent de considérer ces variants comme probablement pathogènes (classe 4). (Figure 4)

Conclusions

Nous avons démontré pour la première fois que des variants de la séquence Kozak du gène *F8* pouvaient être responsables de forme non-sévère d'hémophilie A. Ce travail a permis d'augmenter encore le taux de résolution du diagnostic moléculaire de l'hémophilie A. A ce jour, très peu de variants pathogènes ont été identifiés dans les séquences Kozak des gènes mais ce mécanisme moléculaire original est probablement sous-estimé car cette région est rarement étudiée en biologie moléculaire conventionnelle.