

Étude fonctionnelle de variants du gène *SH2B3* identifiés chez des patients atteints d'érythrocytose héréditaire

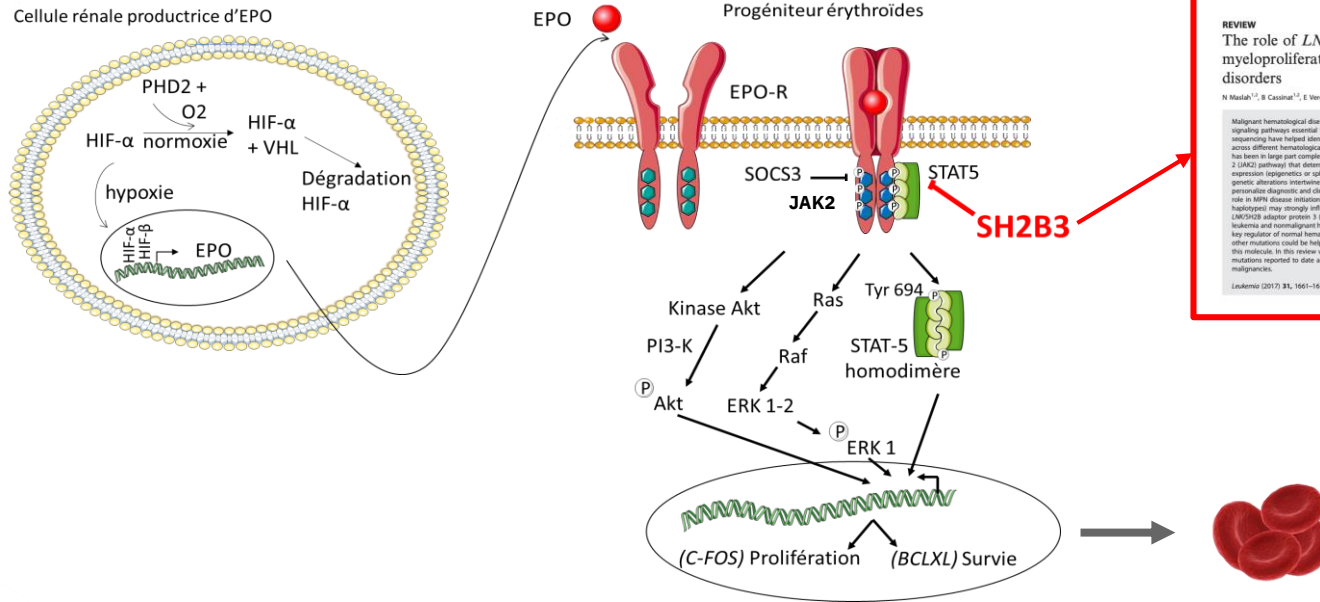
Nada Maaziz – Betty Gardie - François Girodon

2 février 2024

Campus Picpus, Paris

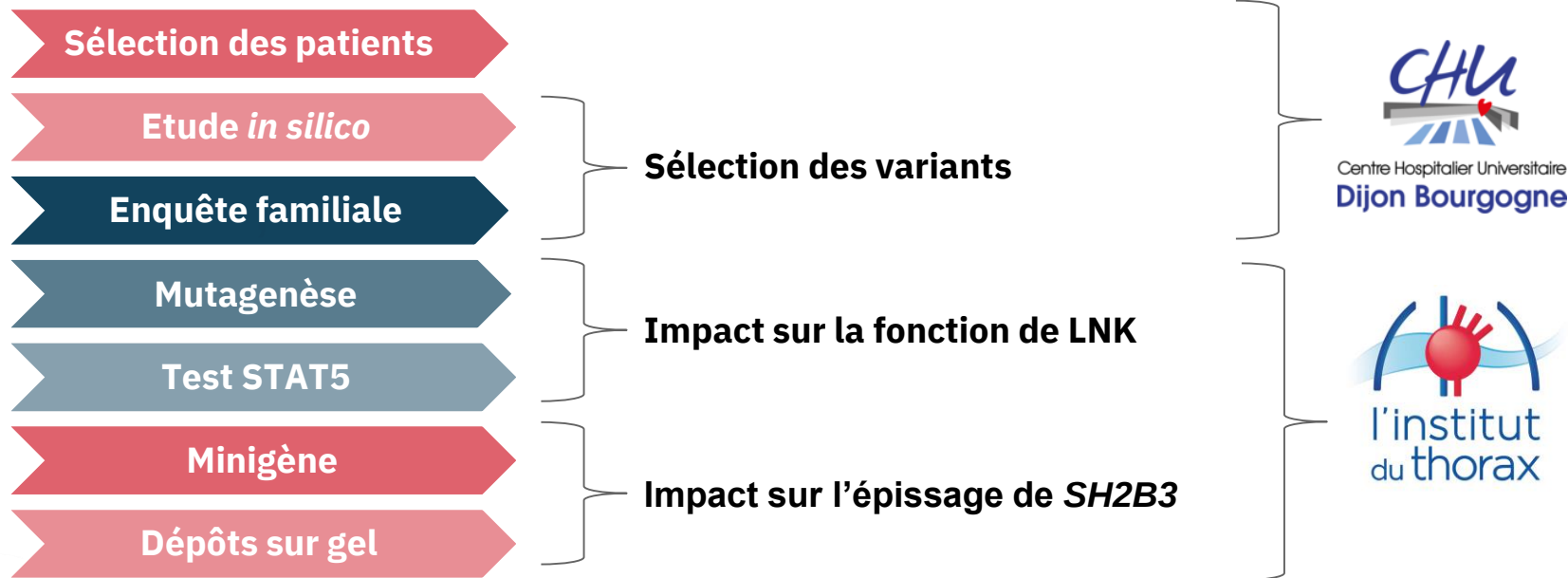
Contexte

La voie de signalisation de l'érythropoïèse



Trame du projet de recherche

Design de l'étude



Matériels et méthode

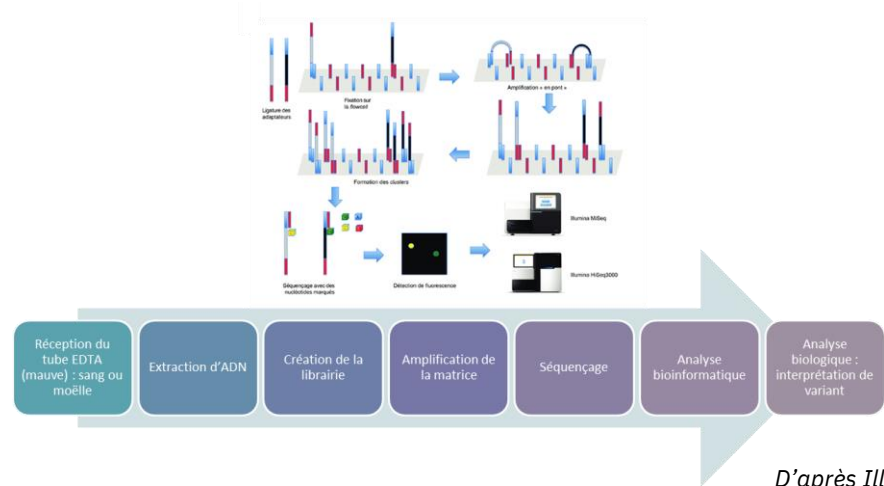
Sélection des patients



Recrutement national :
Base de données de 800 patients
atteints de PG au CHU de Dijon

centre de référence

maladies rares



Matériels et méthode

Sélection de variants

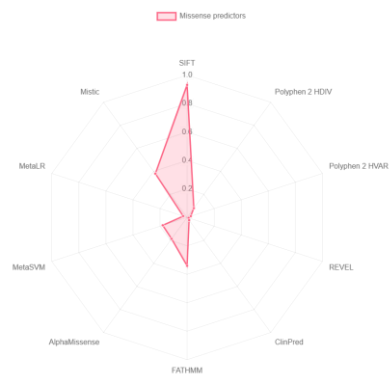
PATIENTS AVEC POLYGLUTULINE															
ID patient	Date de naissance	age	sexe	GR	Hb	Hte	EPG (mL/L)	VGT	Risk #	Pos cDNA	Pos protéique	GnomAD v3	Risk splicing	Score Mobidetail s Single	Score Mobidetail s Meta
34C0369	28/10/1961	52	M	5,8	18,2	53	9	140%	2	c.*1570>A	p.(T)				
34C4392	29/06/1979	43	M	7	14,1	43,8	5,1	238%	1	c.*1522A>G	p.(T)				
34C3845	23/06/1948	74	M	5,3	27,3	30,7	8,8	212%	2	c.1129G>3A>G	p.(T)	0.0006	1	/	/
34C3725	14/01/1975	47	M	5,7	19,8	36,7	2,67	106%	1	c.1129G>3A>G	p.(T)	0.0006	1	/	/
34C0925	13/12/1957	65	M	7	18,8	54,3	7	272mL	2	c.1127C>T	p.(Arg43Cys)	0.0003	02.58 %	0.794	0.225
12772195	25/09/1972	49	M	7	16,7	32,4	7,2	38mL/kg	2	c.1232G>A	p.(Glu78Lys)	0.0008	00.67 %	0.634	0.203
125-0027	10/12/1975								2	c.1232G>A	p.(Glu78Lys)				
13502211	16/11/1987	34	M	7,5	18,9	52,1	1,2	117%	2	c.238C>T	p.(Arg80Cys)	0.0001	09.62 %	0.775	0.114
13516128	09/10/1993	28	M	7	21,8	59	/	non fait	2	c.242A>G	p.(Asp81Gly)	0.319e-05	2%	0.421	0.100
13321893	28/08/1946	72	M	/	/	/	/	non fait	2	c.76G>T	p.(Ser182Ile)				
20C2244	10/06/1961	61	M	/	/	/	/		2	c.622G>C	p.(Glu208Gln)	0.0009	23.61 %	0.815	0.151
21C1052, 11051890	03/05/1953	67	M	5,49	18,4	54	27,5	30mL/kg	2	c.622G>C	p.(Glu208Gln)	0.0009	23.61 %	0.815	0.151
20561808	03/08/1977	44	M	19,7	58		19mL/kg	Normal	2	c.639C>A	p.(Ser213Arg)	0.0005	03.43 %	0.820	0.143
34C3360	10/02/1957	65	M	5,98	17,6	53	7	/	2	c.639C>A	p.(Ser213Arg)	0.0005	03.43 %	0.820	0.143
34C0361									2	c.657C>T	p.(Arg219)	0.316e-05	16.1 %	/	/
34C3774	22/02/1948	75	M	Aucune info				/	2	c.680C>T	p.(Ala227Val)	0	04.35 %	0.299	0.070
30772046	28/05/1957	63	M	5,6	15,2	46,3	20	134%	3	c.714G>T	p.(Glu238Asp)	0	08.25 %	0.704	0.170
34C1435									2	c.724C>T	p.(Pro242Ser)	0.0019	05.05 %	0.802	0.171
20102193	31/01/1966	55	M	5,76	15,2	46,3	20	134%	3	c.794G>A	p.(Arg265Gln)	0.0003	09.33 %	0.793	0.111
11151401	27/11/1996	25	M	5,03	17,5	47,9	13,1	Normal	3	c.794G>A	p.(Arg265Gln)	0.0003	09.33 %	0.793	0.111
11042122	26/07/1986	37	M	5,93	18,3	53	9		2	c.977G>A	p.(Ser328Asn)	0.314e-05	4.08 %	0.540	0.109
1100917									2	c.1101C>A	p.(Ser337Tyr)	0	08.88 %	0.671	0.128
34C3828	21/12/1980	42	M	5,15	19,2	53,4	10	119%	2	c.936A>G>A	p.(T)	0.72 %	/	/	/
Patients Francis avec Polyglutuline															
34C3845	23/06/1948	74	M	5,77	17,2	40	12,1	230%	2	c.1093C>T	p.(Pro345Ser)	0	16.9 %	0.259	0.235
20C2290	29/10/1956	66	M	5,52	18,6	46,6	9	212%	2	c.1093G>A	p.(Thr355)	0.315e-05	05.61 %	/	/
12813770	18/09/1973	47	M	5,2	19,2	54	14	130%	2	c.1198G>A	p.(Glu400Lys)	0.0008	05.03 %	0.836	0.323
11881891	24/05/1964	59	M	5,1	19,6	55,7	1,3	340%	2	c.1198G>A	p.(Glu400Lys)	0.0008	05.03 %	0.836	0.323
12081676	13/10/1974	49	M	7	17	51	10	138	2	c.1198G>A	p.(Glu400Lys)	0.0008	05.03 %	0.836	0.323
11922046	17/02/1994	29	F	5,25	16	44	1,2	/	2	c.1198G>A	p.(Glu400Lys)	0.0008	05.03 %	0.836	0.323
20182146	24/03/1975	46	M	5,1	18,6	53,8	8,6	129%	5	c.1204G>A	p.(Val402Met)	7.776e-06	07.62 %	0.845	0.615
34C3367	25/02/1963	60	M	8,85	22,3	45,7	4,7	/	6	c.1227G>A	p.(Gly409)	0.588e-06	05.01 %	/	/
17C3077	18/12/1998	24	M	4,48	18,6	53,8	11,9	143%	7	c.1257A>C	p.(Thr419)	0.0002	09.76 %	/	/
11261903	14/01/1989	33	M	5,44	17,5	52,8	8,6	134%	8	c.1463C>A	p.(Ser488Tyr)	0.0002	07.81 %	0.445	0.074
31401945	21/04/1958	62	M	7	18	/	N	43 mL/kg	8	c.1523G>A	p.(Arg508Gln)	0.0028	54%	0.277	0.075
10721094	06/03/1998	25	M	5,69	18,2	51,2	/	/	8	c.1552C>T	p.(Arg518)	0	2.58 %	/	/



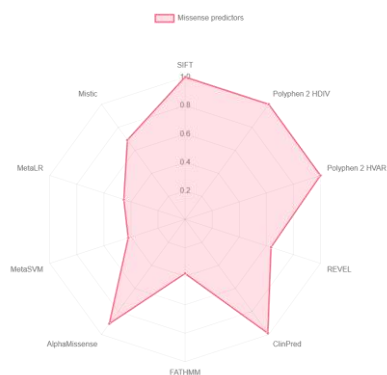
Exon	Pos cDNA	Pos protéique	GnomAD v3	Risk splicing	Score Mobidetail s Single	Score Mobidetail s Meta	Localisation de la mutation (domaine ou non)
2	c.544T>C	p.Phe182Leu	0.1021	03.48 %	0.085	0.079	out
2	c.557G>T	p.(Ser186Ile)	0.0051	03.48 %	0.344	0.125	out
2	c.622G>C	p.(Glu208Gln)	0.0008	23.61 %	0.815	0.151	in PH
2	c.794G>A	p.(Arg265Gln)	0.0003	69.33 %	0.793	0.311	in PH
4	c.1010C>A	p.(Ser337Tyr)	0	08.04 %	0.671	0.328	out
6	c.1183G>A	p.(Glu395Lys)	0.0002	04.35 %	0.857	0.637	in SH2
6	c.1198G>A	p.(Glu400Lys)	0.0008	05.03 %	0.836	0.323	in SH2
6	c.1204G>A	p.(Val402Met)	7.776e-06	07.62 %	0.845	0.615	in SH2
6	c.1217A>C	p.(Asn406Thr)	0	43.04 %	0.862	0.506	in SH2

Matériels et méthode

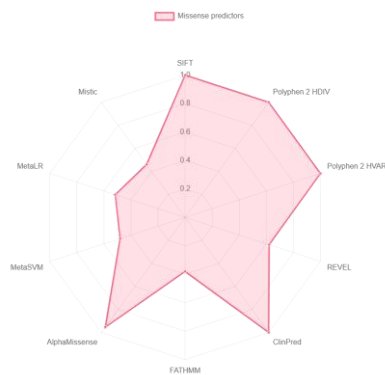
Etude *in silico*



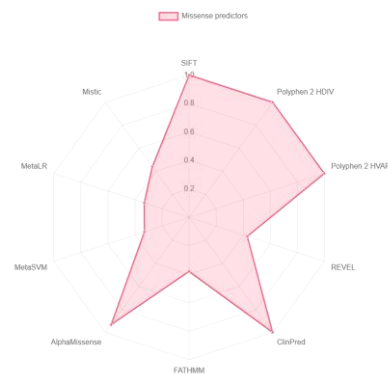
p.(Ser186Ile)



p.(Glu395Lys)



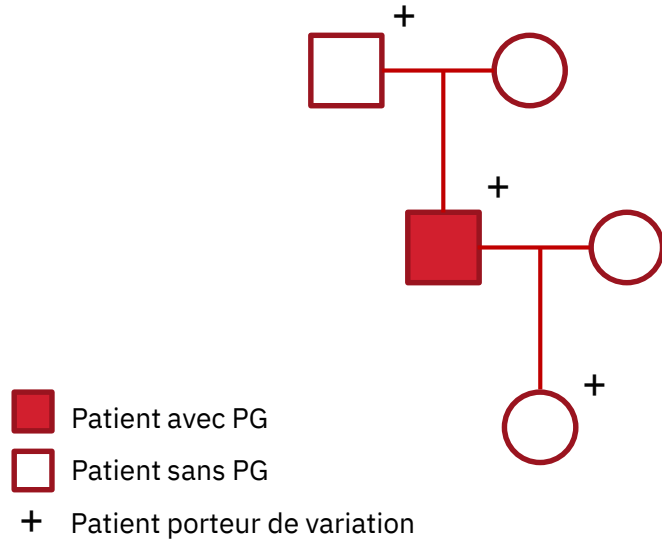
p.(Val402Met)



p.(Asn406Thr)

Matériels et méthode

Etudes familiales



- ◇ Importance des études familiales dans l'exploration +++
- ◇ Variation non retenue car portée par des patients non atteints de polyglobulie

En cours pour les autres variations

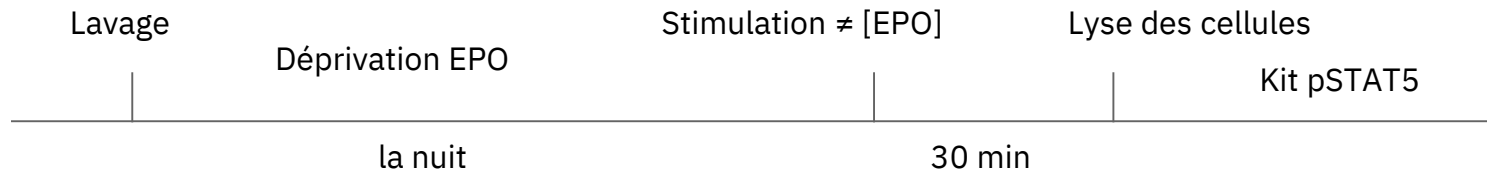
SH2B3

Impact sur la fonction de LNK

Matériels et méthode

Test STAT5

Mutagenèse +
nucléofection UT7



« technique d'immuno-essai sandwich » (Alpha Technology)

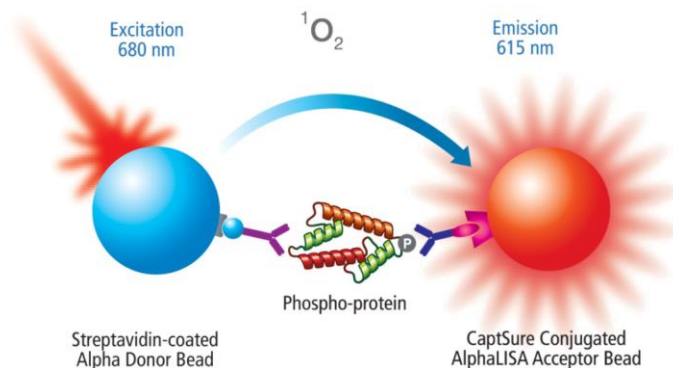
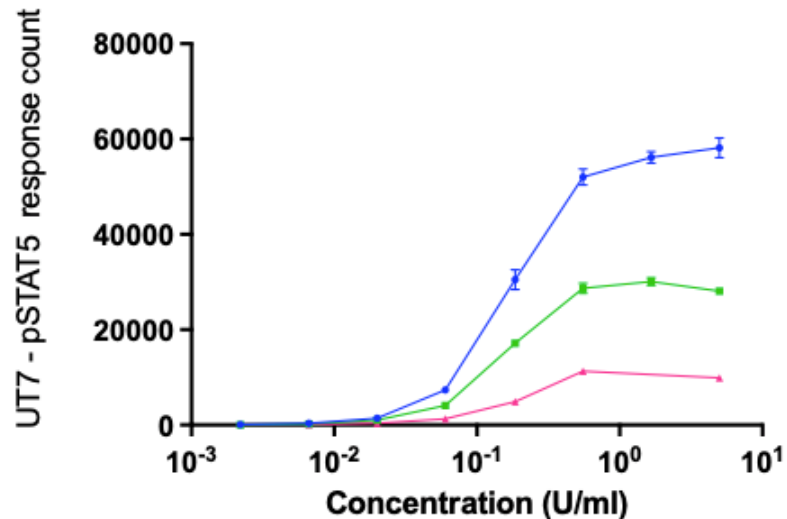


Schéma issu du manuel AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-STAT5 (Tyr694/699) Assay Kit

Résultats préliminaires

Impact sur la fonction de LNK

◇ Courbe dose/réponse



—●— NT
—■— GFP
—▲— LNK WT

◇ Transfection *SH2B3*/LNK WT vs GFP:
↘ du signal

A reproduire sur les variants *SH2B3* à
étudier

Impact sur l'épissage de *SH2B3*

Matériels et méthode

Tests Minigènes

1) Choix 2 variants avec **score SPIP élevé**

NM_005475.3:**c.1408+5G>C**

Fréquence (gnomAD) : 0

SPIP : 98.41 %

NM_005475.3:**c.1217A>C**

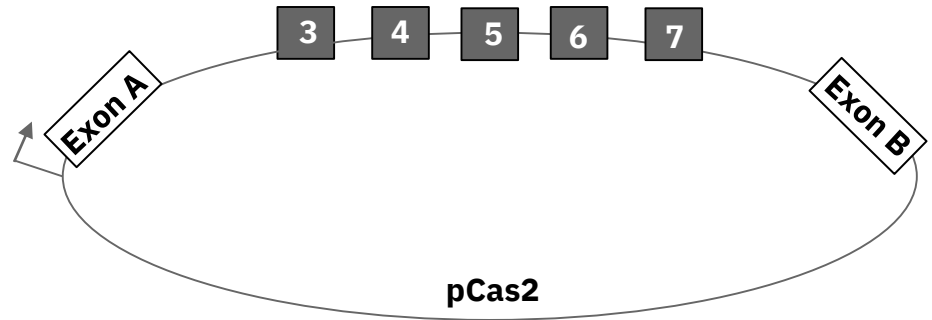
Fréquence (gnomAD) : 0

SPIP : 43.04 %

2) Amplification par PCR du fragment d'exon d'intérêt

3) Clonage des séquences entre 2 exons artificiels
« A » et « B » dans un minigène pCas2

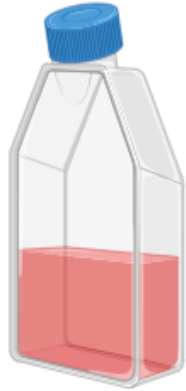
Test Minigène



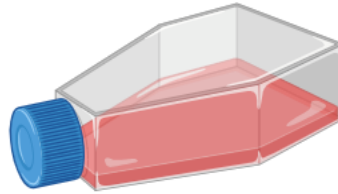
Matériels et méthode

Tests Minigènes

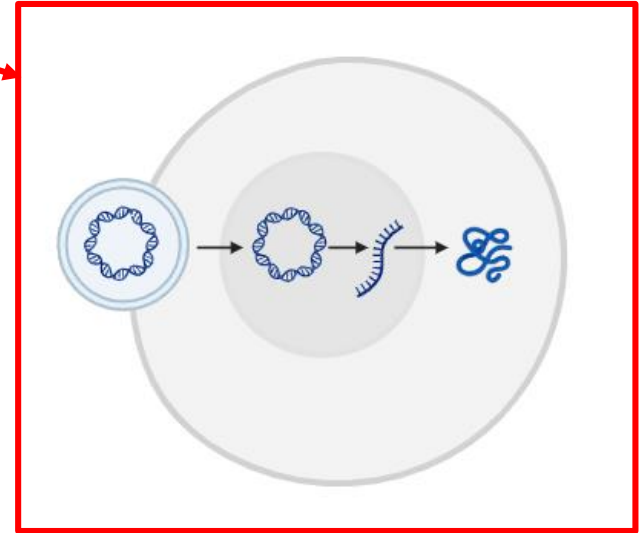
4) Choix de 2 types cellulaires pour transfection des constructions minigènes



UT7 : lignée dérivée de cellules d'un patient adulte atteint de leucémie aigüe myéloïde exprimant les récepteurs à l'EPO



HEK2 : cellules épithéliales adhérentes de rein provenant d'un homme adulte sain



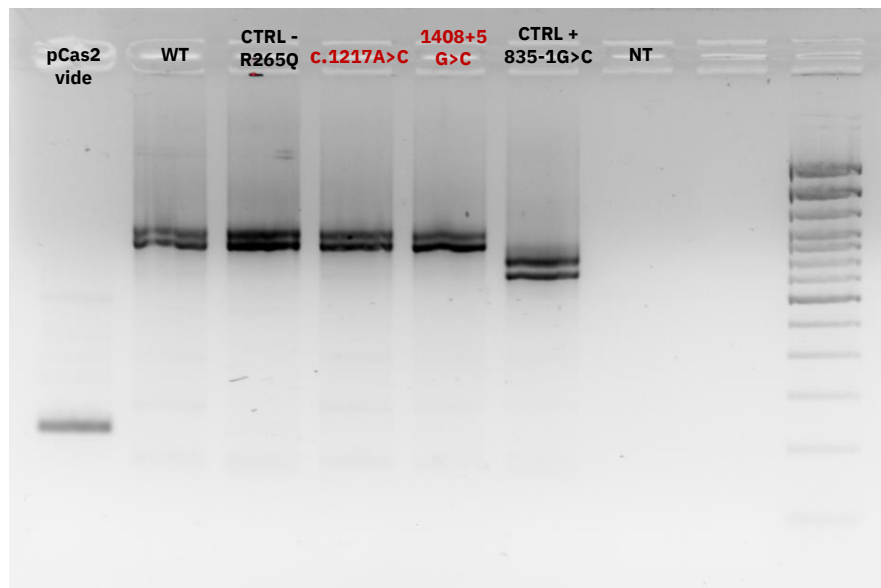
5) Extraction d'ARN

6) RT-PCR

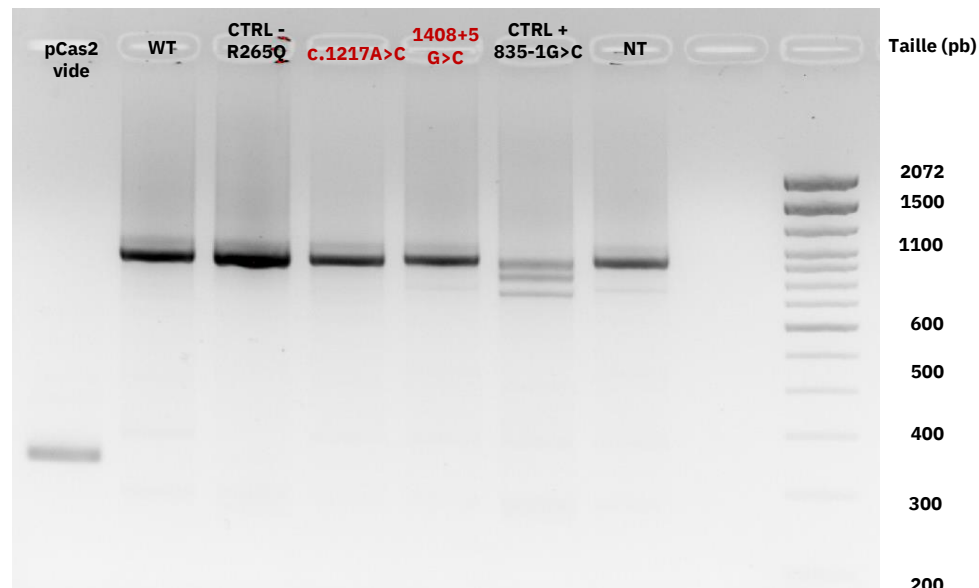
7) Dépôt sur gel

Résultats préliminaires

Impact sur l'épissage de *SH2B3*



HEK2

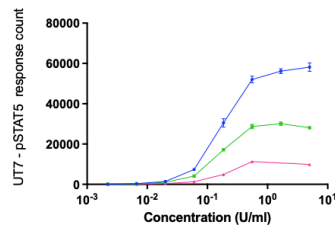
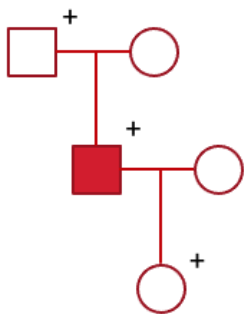


UT7

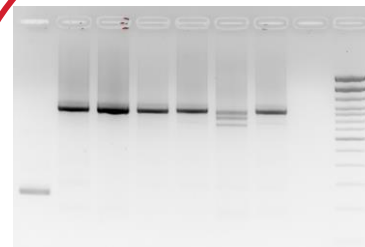
A planifier

Test STAT5

Etudes familiales



Test Minigènes



Remerciements

LABORATOIRE HEMATOLOGIE

- FRANCOIS GIRODON

INSTITUT DU THORAX NANTES

- BETTY GARDIE
- MARINE DELAMARE
- SALAM IDRIS
- VALENA

COLLABORATEURS

- FILIERE MCGRE
- INSERM U1231

LABORATOIRE GCM

- PATRICK CALLIER
- BERNARD ARAL
- EQUIPE TECHNIQUE

Étude fonctionnelle de variants du gène *SH2B3* identifiés chez des patients atteints d'érythrocytose héréditaire

Nada Maaziz – Betty Gardie - François Girodon

2 février 2024

Campus Picpus, Paris