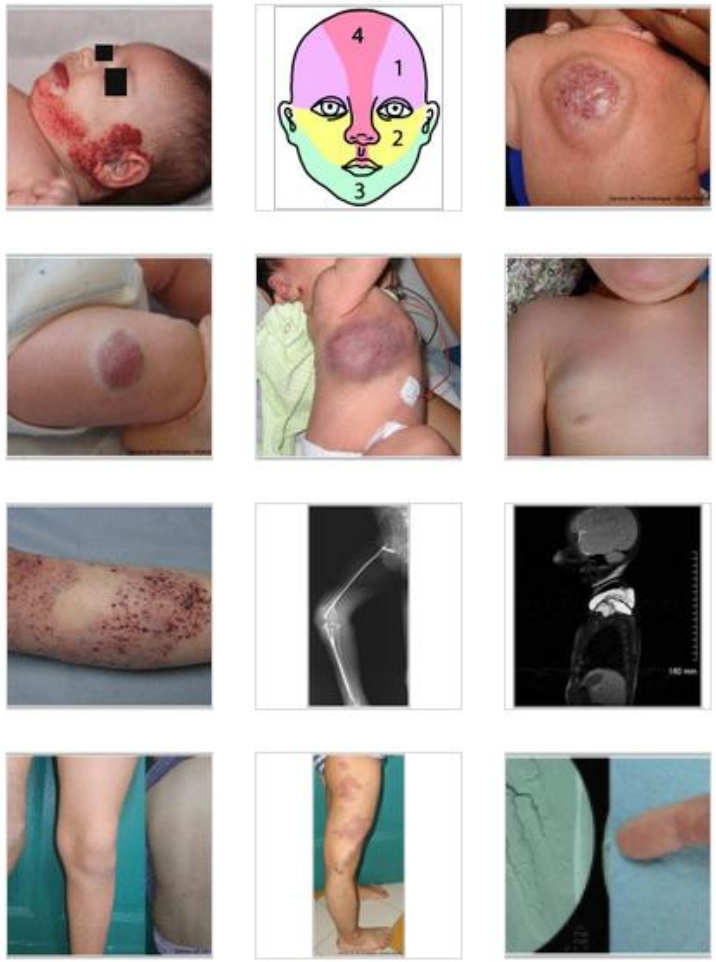
Caractérisation transcriptomique spatiale et ciblage de la mutation activatrice du gène GNAQ dans les anomalies vasculaires. « siGNAnova »

Paul Rossi, Yamina Idrissi, Léa Pechtimaldjian, Marie-Laure Jullié, Muriel Cario, Hamid-Reza Rezvani, Sorilla Mary-Prey, Christine Leauté-Labrèze, Fanny Morice-Picard, François Moisan

Les anomalies vasculaires sont des pathologies complexes

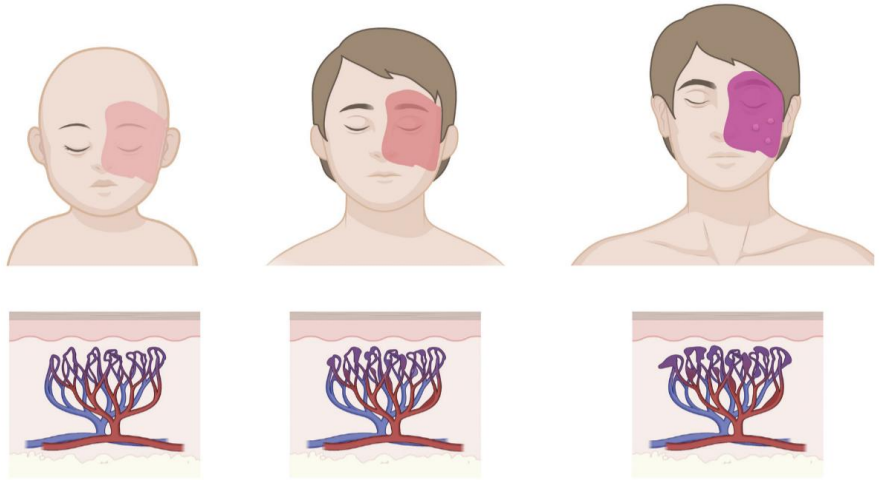


- Hémangiomes infantiles, d'autres tumeurs vasculaires rares
- Malformations vasculaires : veineuses, lymphatiques, artérioveineuses et capillaires.
- Grande partie congénitale
- Options thérapeutiques sont rares
- Chirurgie n'est pas toujours possible

Boccara O, Maruani A, Léauté-Labrèze C, J Bul Can, 2018

malformation capillaire liée à GNAQ

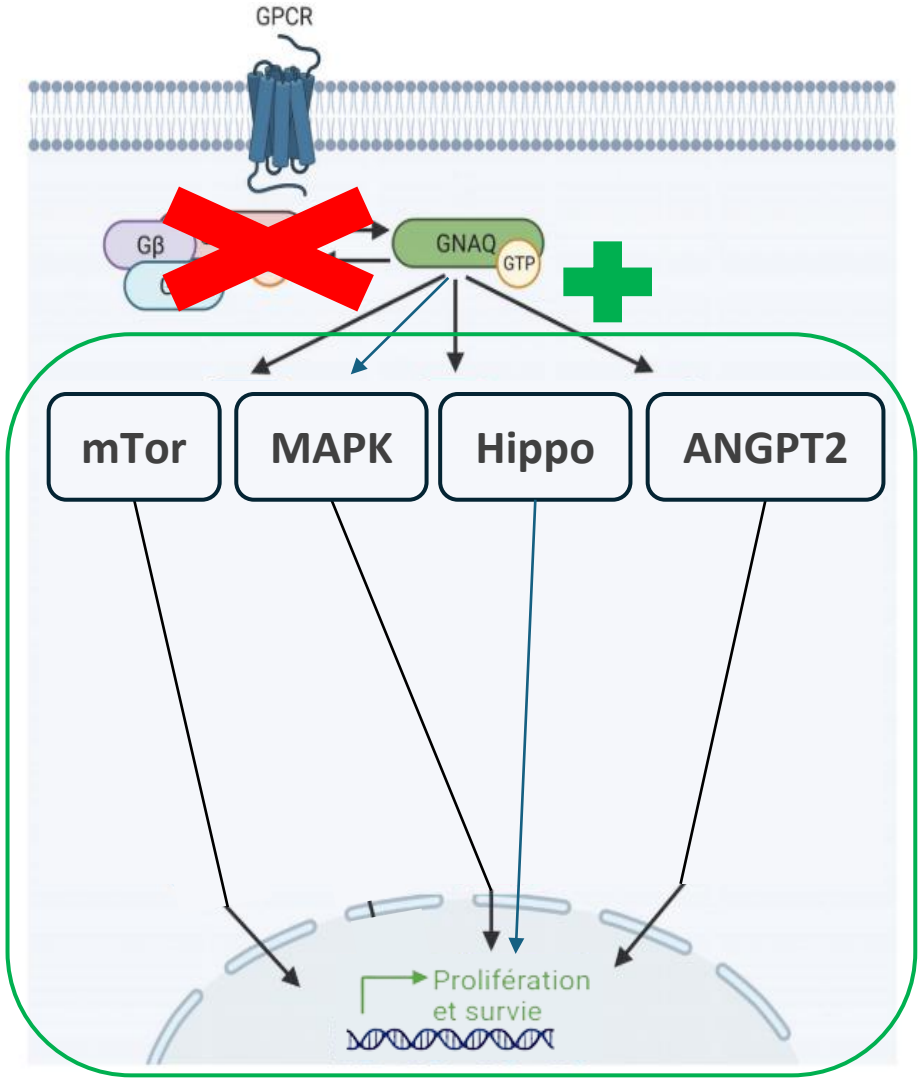
Progression avec l'âge de l'angiome cutané



Prolifération endothéliale

- mutation somatique mosaïque et dominante de *GNAQ* : **p.Arg183Gln**

Fréquence allélique : 1 à 18%



William K et al, 2002 ; Dutkiewicz et al, 2015 ; Jordan et al., 2020

malformation capillaire liée à GNAQ

Hypothèses :

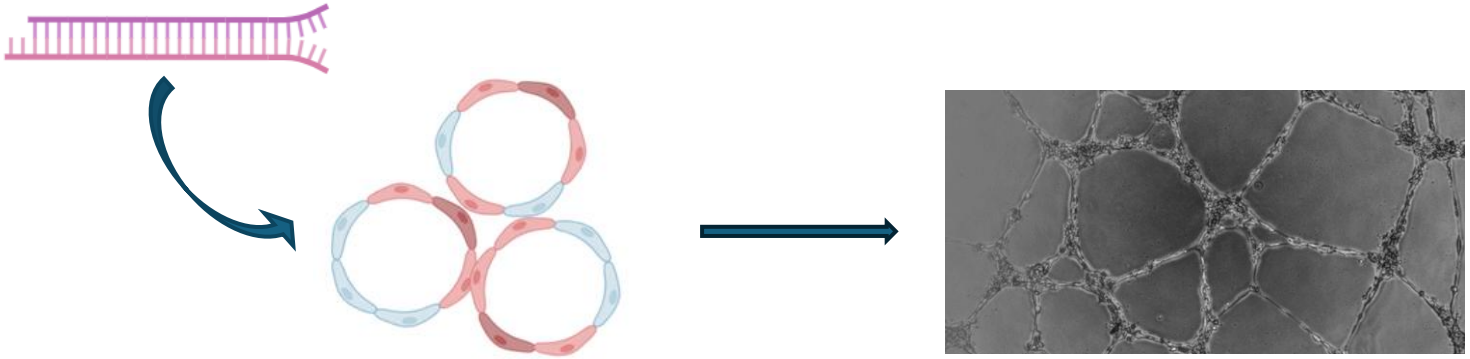
La mutation mosaïque est responsable de régulations transcriptomiques pouvant expliquer la maladie.

L'application d'un siRNA spécifique de la mutation GNAQ p.Arg183Gln, inhibe l'angiogenèse dans un modèle cellulaire endothélial.

Objectifs

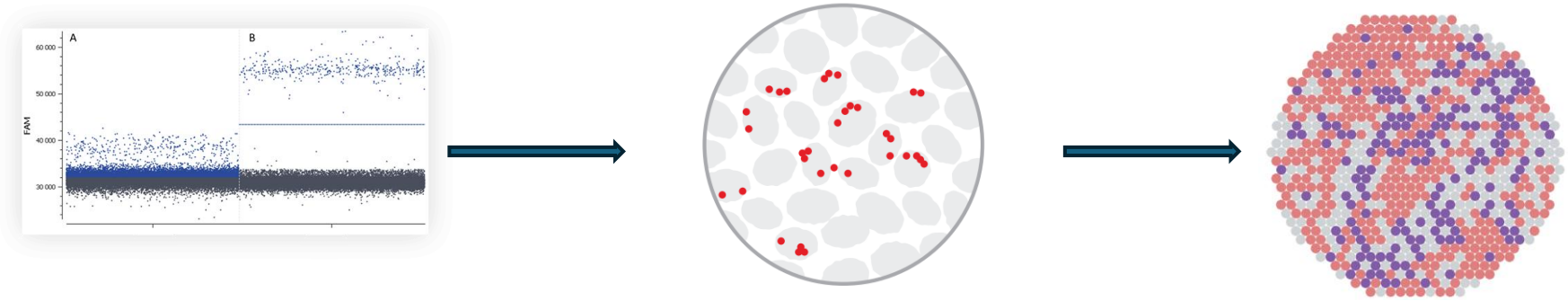
Effet fonctionnel de la mutation et des siRNA

WP1



Identification et caractérisation de la mutation

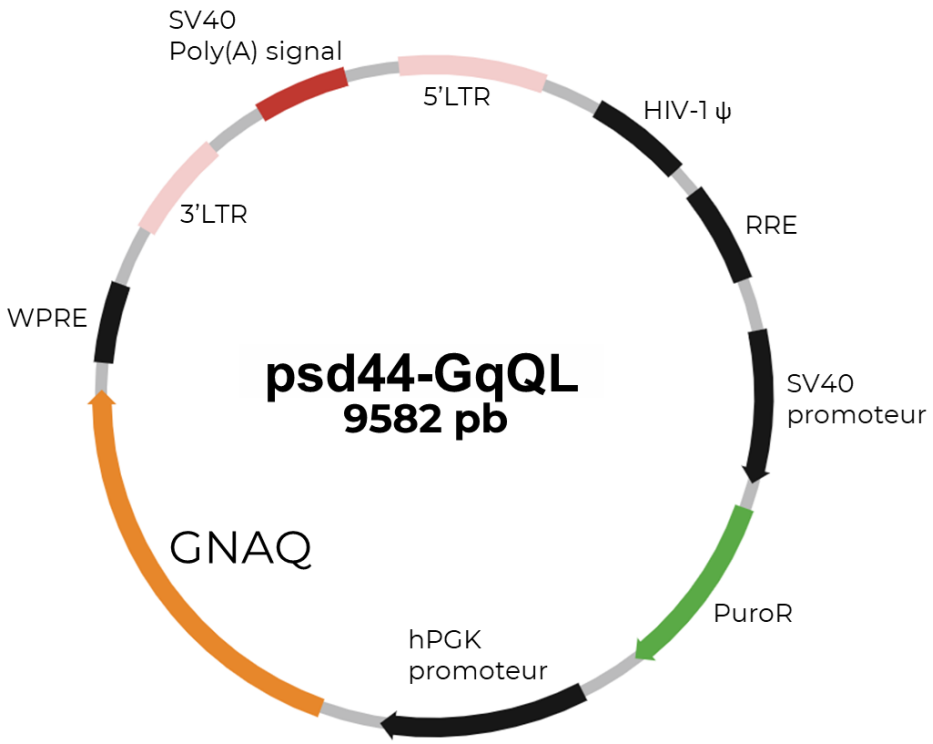
WP2



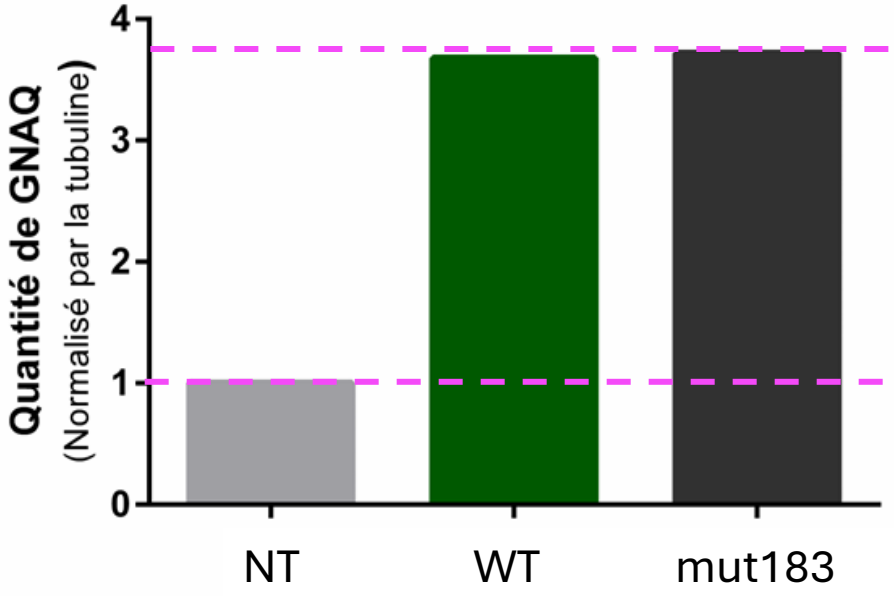
Modèle

Modèle cellulaire HUVEC

Vecteur psd44 (simplifié)



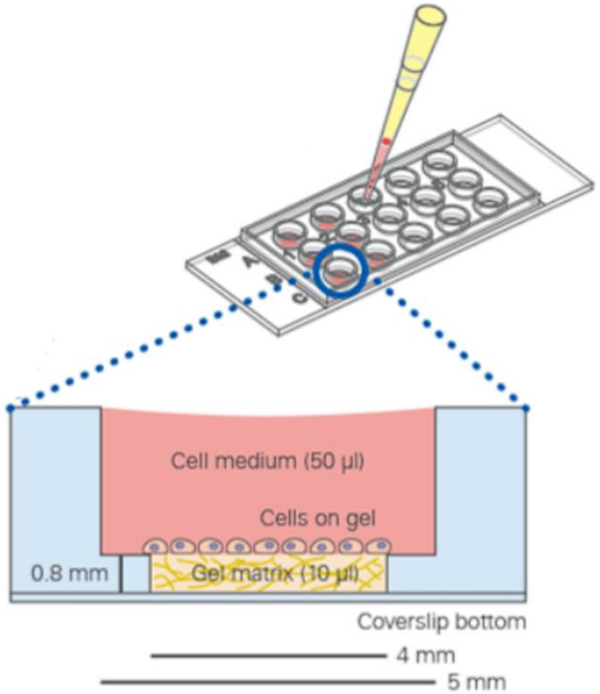
Expression relative de GNAQ



Test fonctionnel

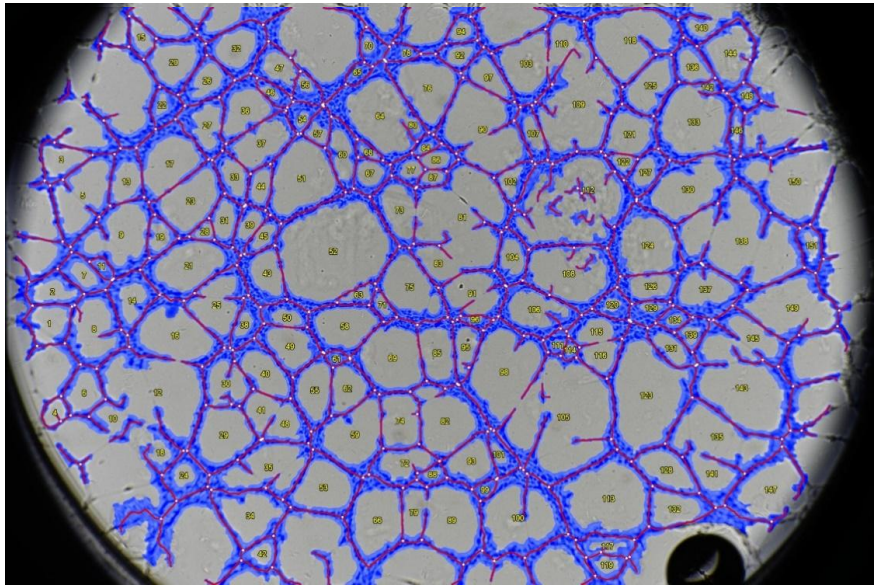
Modèle *in vitro* : test de tubulogenèse

Protocole de tubulogenèse



Lame 15 puits Ibidi®

Analyse de tubulogenèse par WimTube



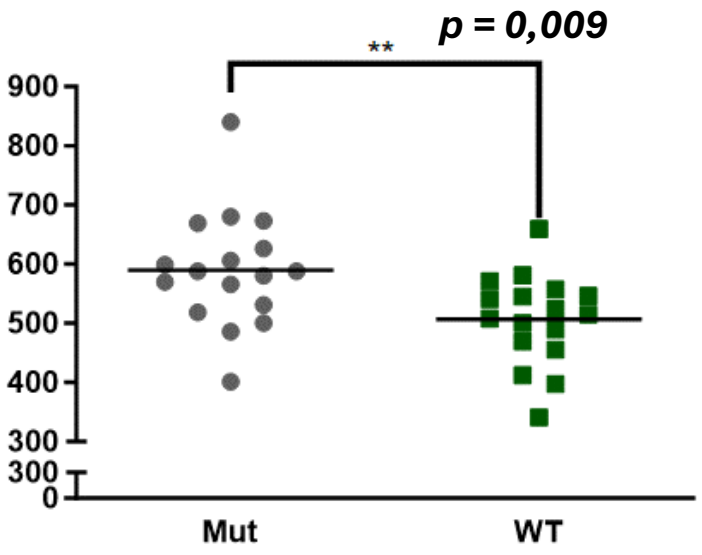
Tubes formés *Aire couverte*

Boucles *Points de branchement*

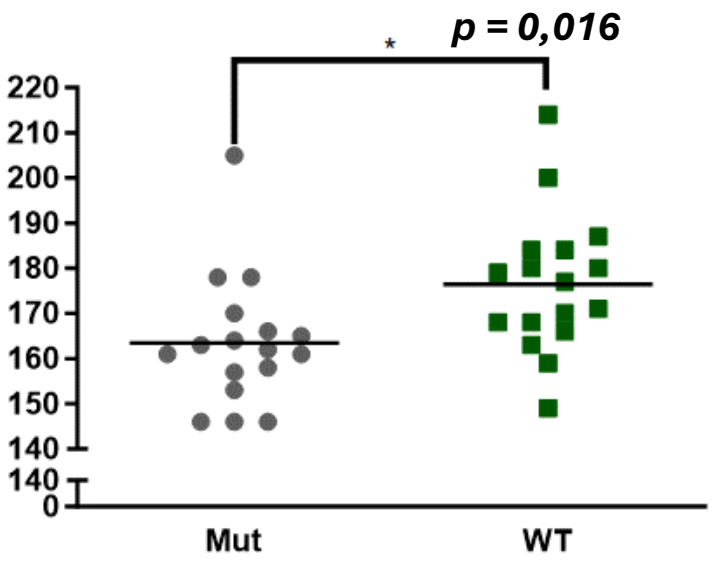
Effet de la mutation in vitro

n = 17

Nombre de tubes



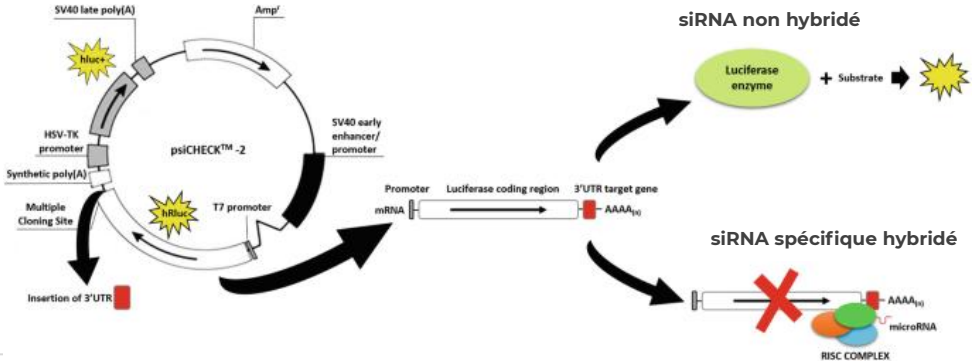
Moyenne de la longueur des tubes

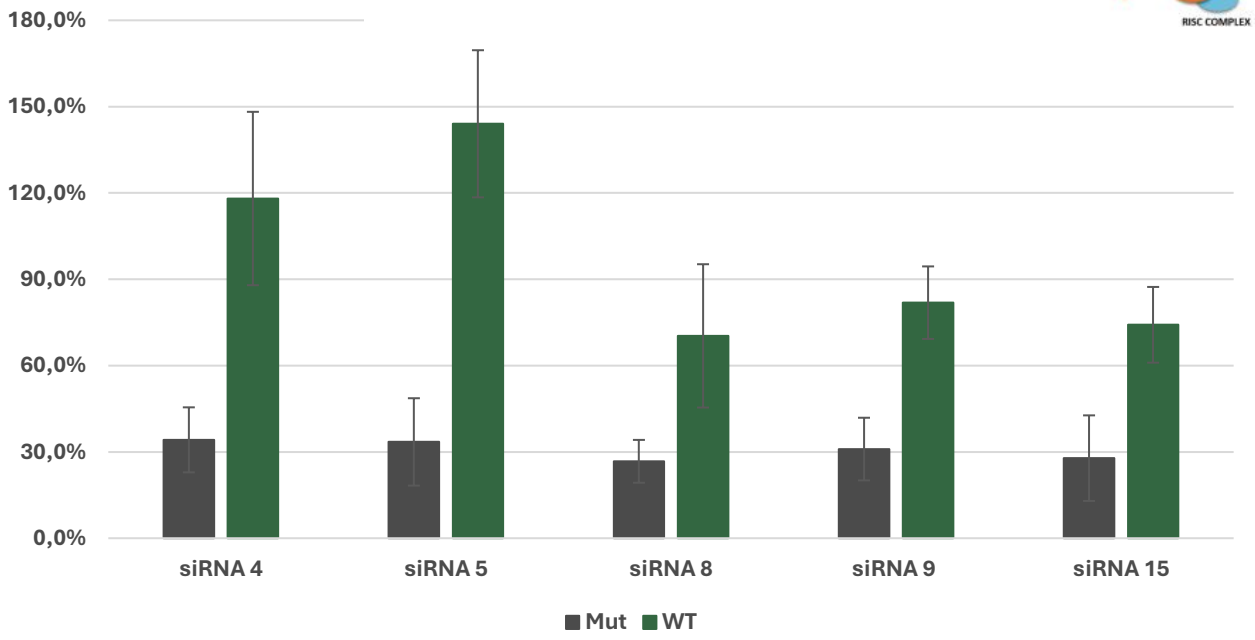


siRNA design et sélection

c.548G>A

GNAQ WT	5'-ACGCAACAAGATGTGCTTAGAGTTCGAGTCCCCACCACAGGGATCATCGAA-3'
GNAQ R183Q	5'-ACGCAACAAGATGTGCTTAGAGTTCAAGTCCCCACCACAGGGATCATCGAA-3'
siRNA GNAQ 548A.1	AAGAUGUGCUUAGAGUUCAUU
siRNA GNAQ 548A.2	AGAUGUGCUUAGAGUUCAAUU
siRNA GNAQ 548A.3	GAUGUGCUUAGAGUUCAAGUU
siRNA GNAQ 548A.4	AUGUGCUUAGAGUUCAAGUUU
siRNA GNAQ 548A.5	UGUGCUUAGAGUUCAAGUCUU
siRNA GNAQ 548A.6	GUGCUUAGAGUUCAAGUCCUU
siRNA GNAQ 548A.7	UGCUUAGAGUUCAAGUCCCUU
siRNA GNAQ 548A.8	GCUUAGAGUUCAAGUCCCCUU
siRNA GNAQ 548A.9	CUUAGAGUUCAAGUCCCCAUU
siRNA GNAQ 548A.10	UUAGAGUUCAAGUCCCCACUU
siRNA GNAQ 548A.11	UAGAGUUCAAGUCCCCACCUU
siRNA GNAQ 548A.12	AGAGUUCAAGUCCCCACCAUU
siRNA GNAQ 548A.13	GAGUUCAAGUCCCCACCACUU
siRNA GNAQ 548A.14	AGUUCAAGUCCCCACCACAUU
siRNA GNAQ 548A.15	GUUCAAGUCCCCACCACAGUU
siRNA GNAQ 548A.16	UUCAAGUCCCCACCACAGGUU
siRNA GNAQ 548A.17	UCAAGUCCCCACCACAGGGUU
siRNA GNAQ 548A.18	CAAGUCCCCACCACAGGGAUU
siRNA GNAQ 548A.19	AAGUCCCCACCACAGGGAUUU

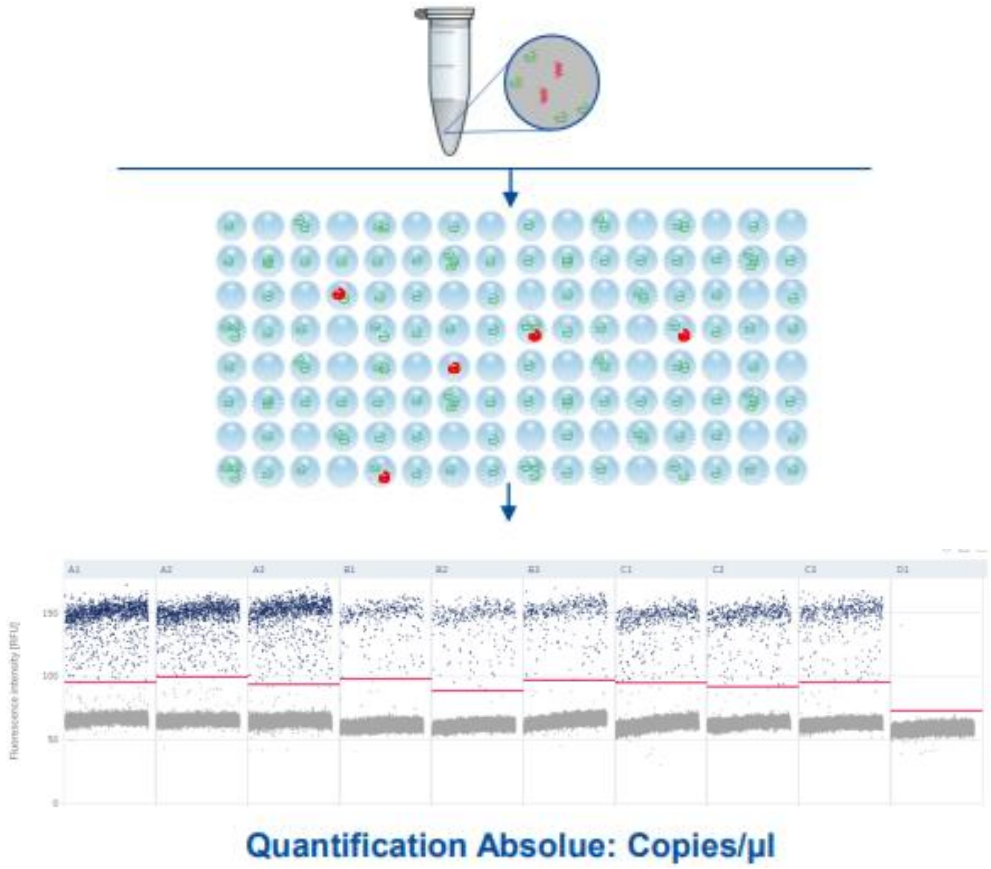




Activité résiduelle de luciférase par siRNA

Méthode – Identification et caractérisation

PCR digitale



Qiagen

Amorce spécifique de *GNAQ*^{R183Q}

Mismatch

GNAQ EXON 4 → 5'-GCGCAACAAGATGTGCTTAGAGTTCGAGTCC-3'

Amorce sens → 5'-AACAAGATGTGCTTAGAGTGCGA-3'

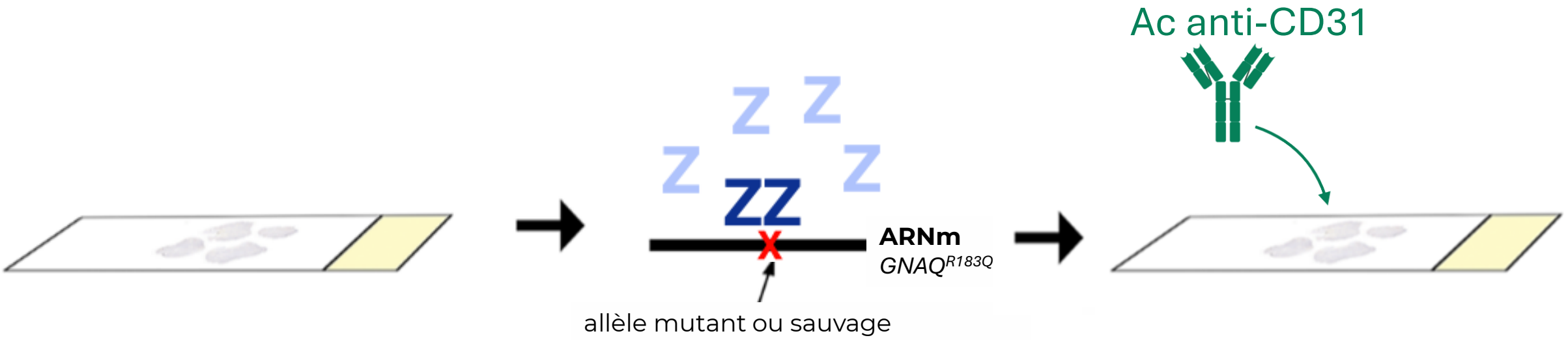
Mutation

Méthode – Identification et caractérisation

Co-marquage

- BaseScope
- CD31

Marquage par BaseScope



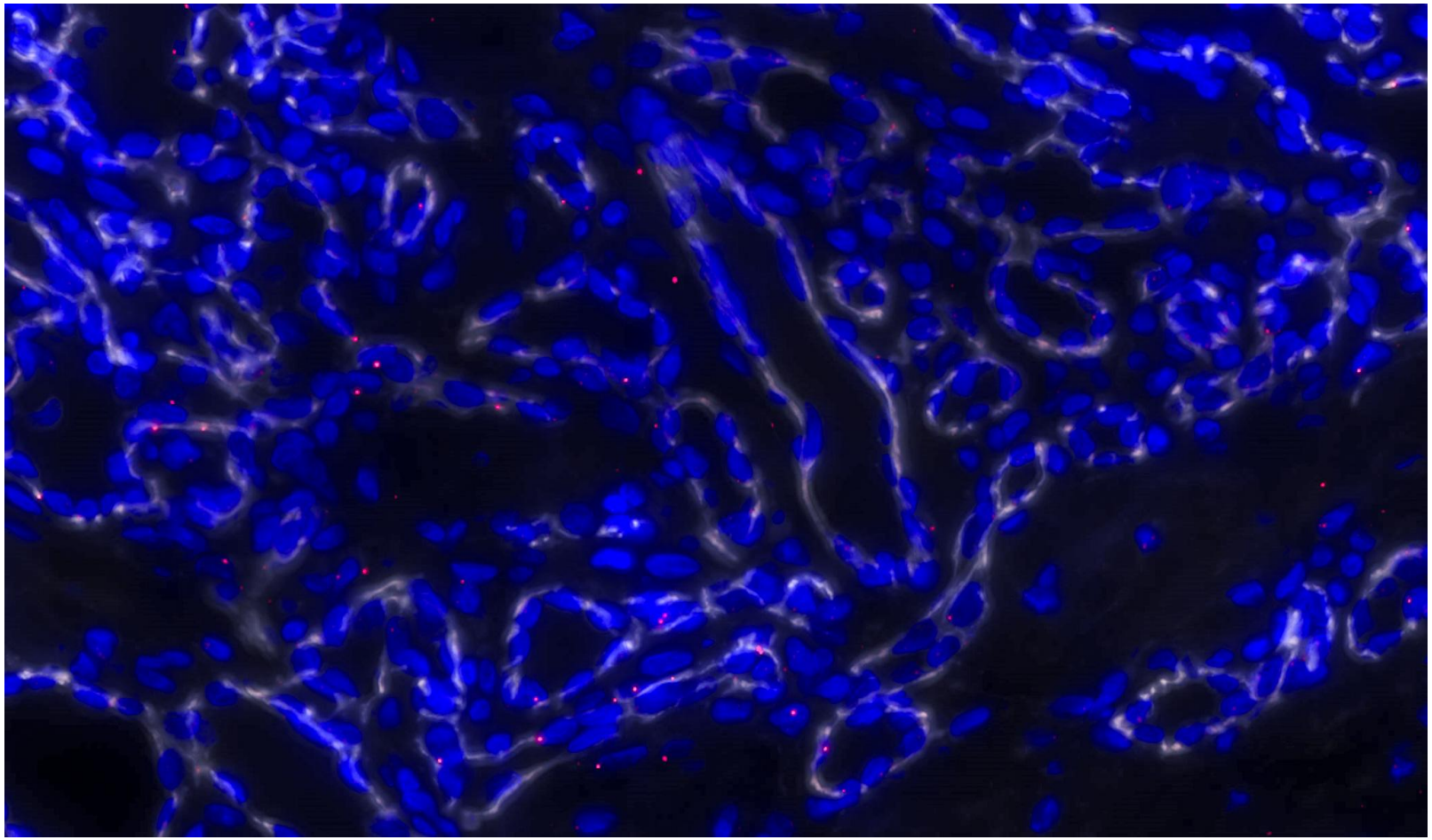
Perméabilisation du tissu

Hybridation des sondes ZZ

Marquage anticorps anti-CD31

Résultats – Identification et caractérisation

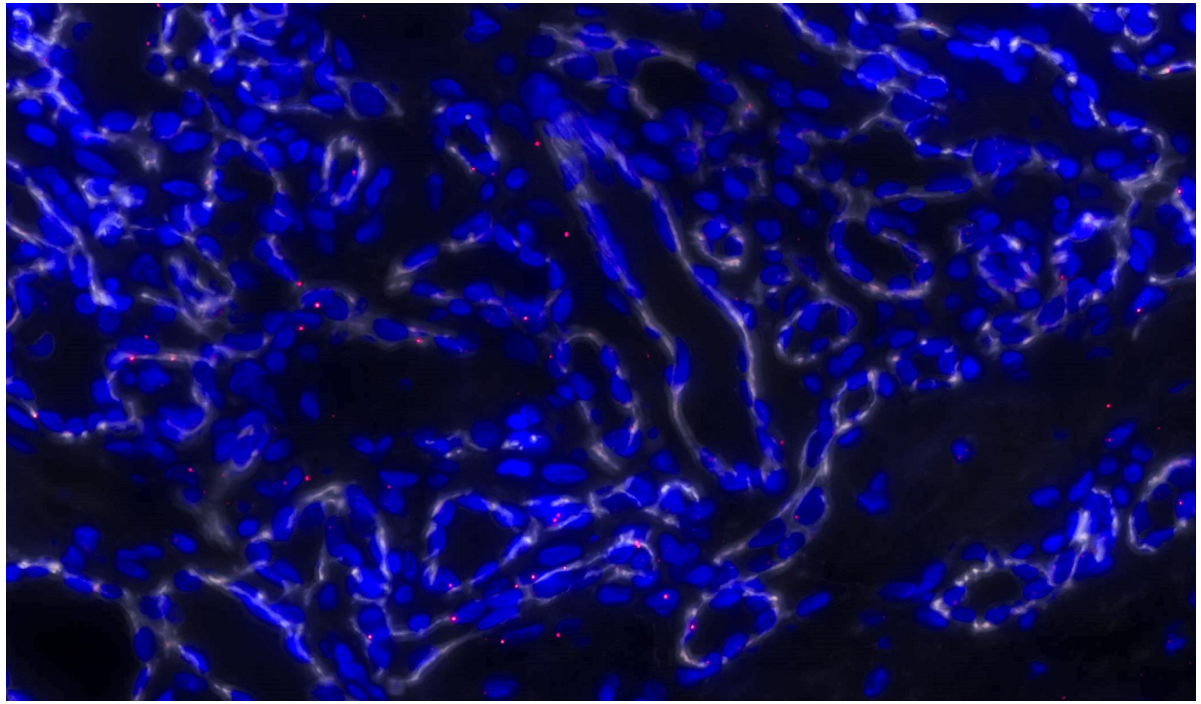
Co-marquage d'un échantillon de patient positif pour la mutation en NGS



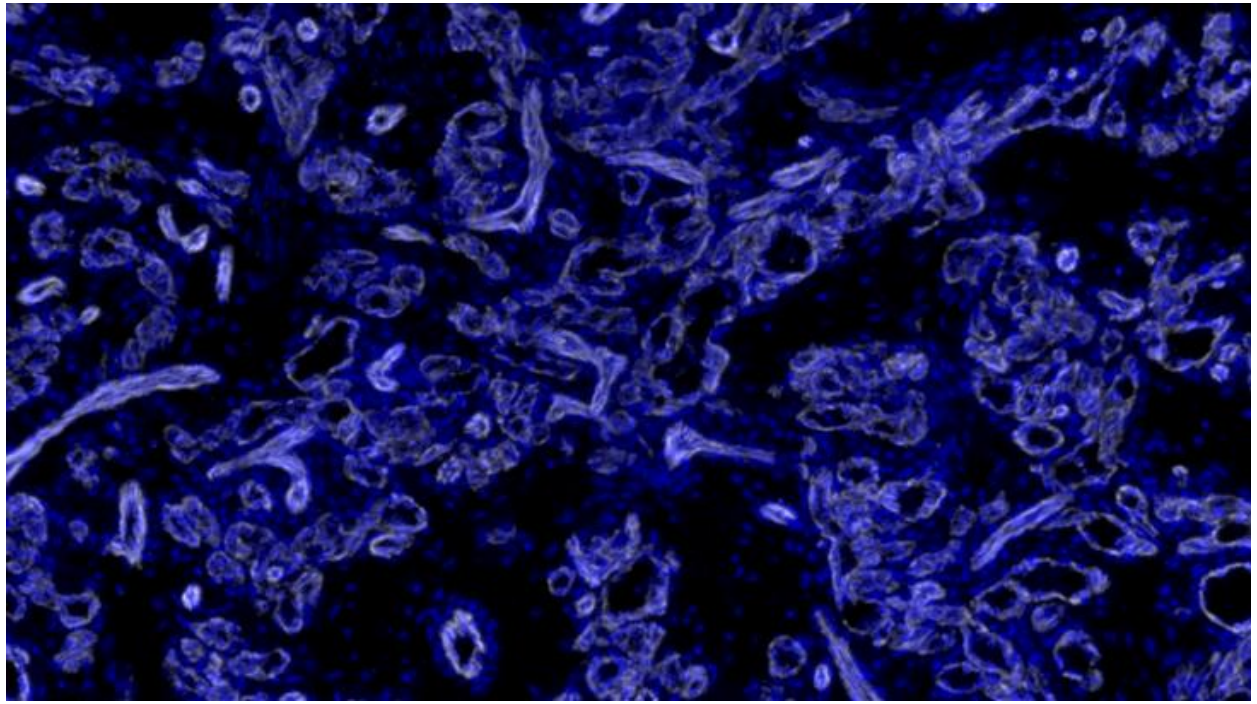
- *GNAQ*^{R183Q}
- CD31+
- Noyau

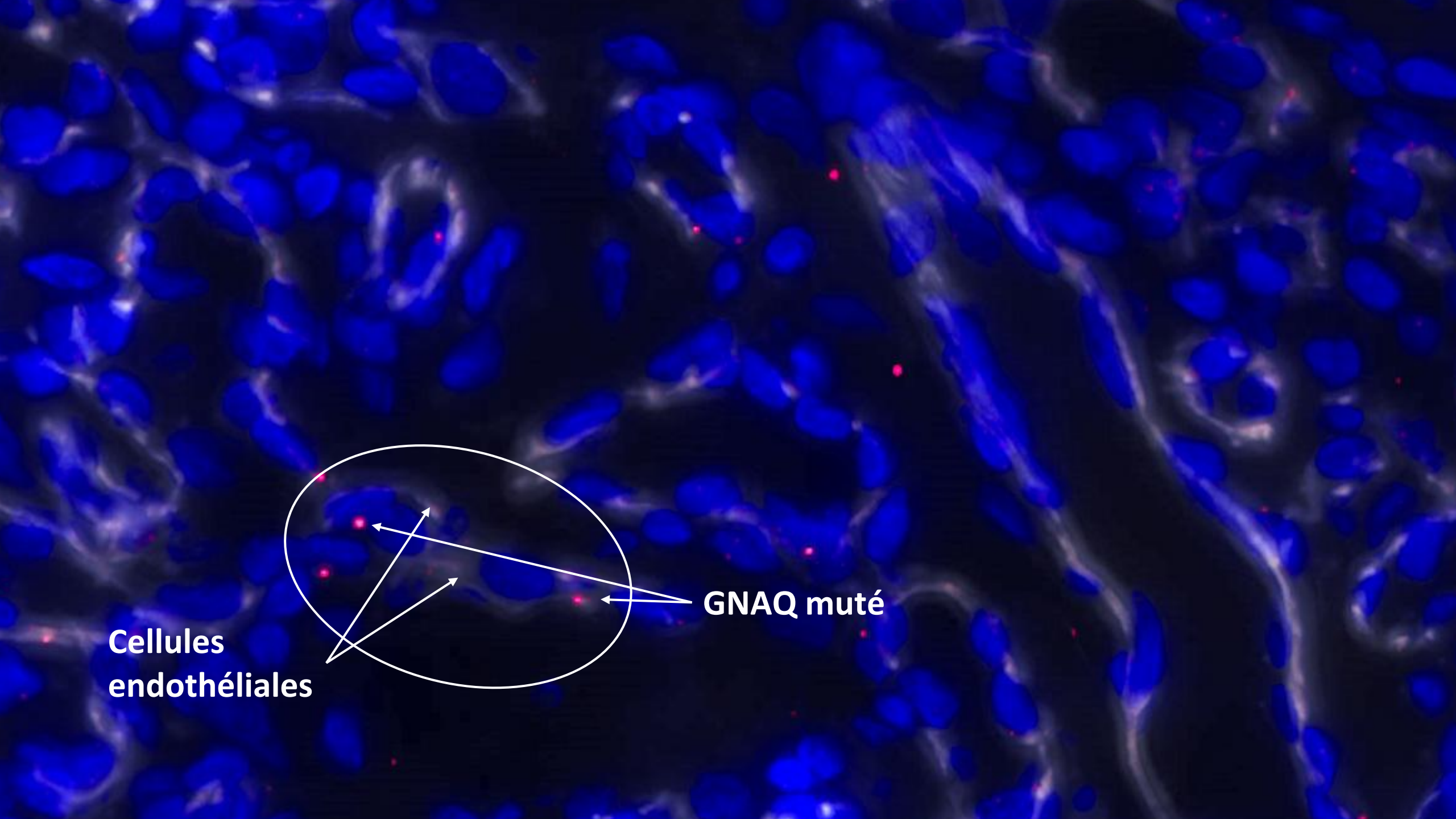
Résultats – Identification et caractérisation

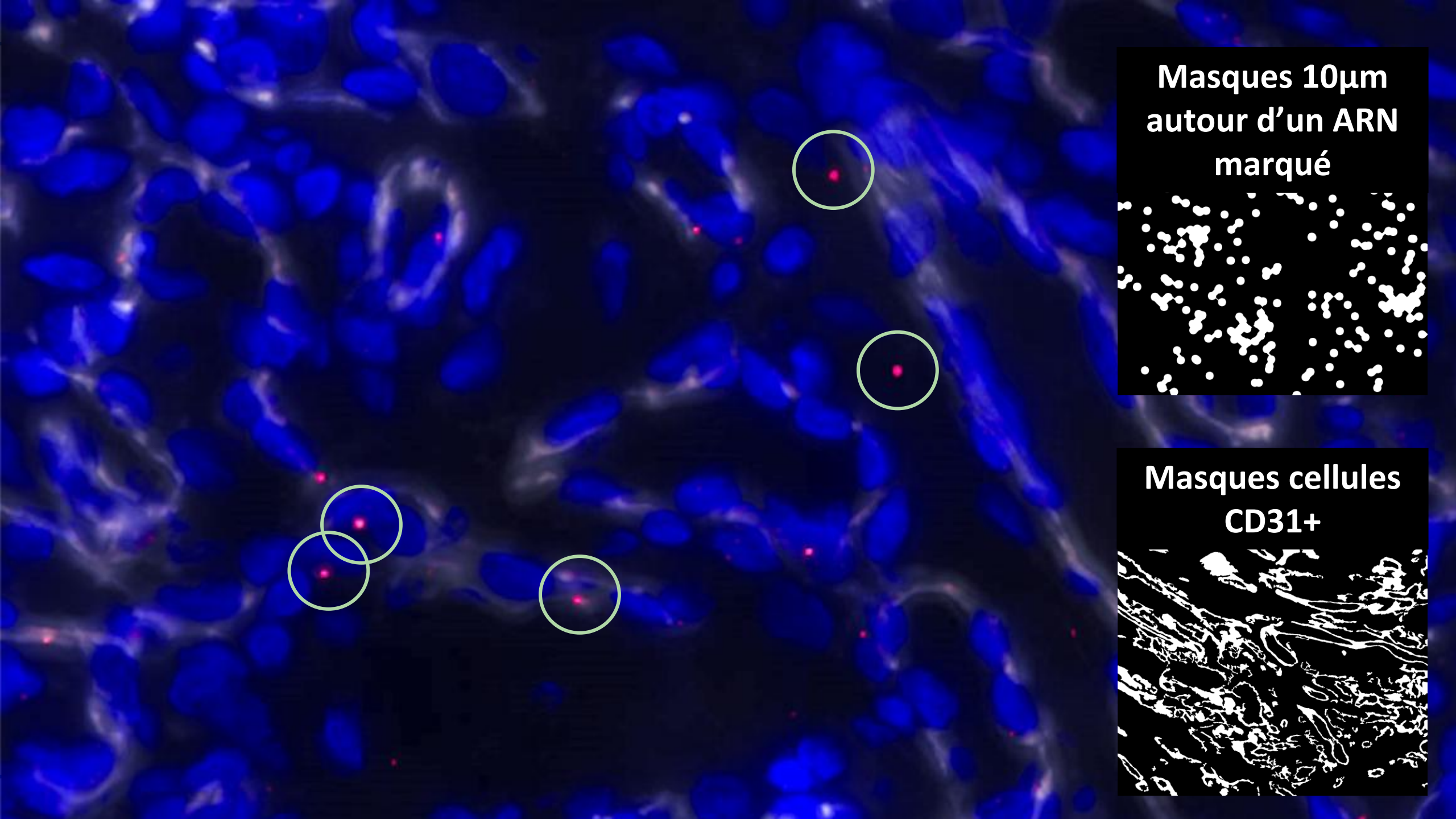
Co-marquage d'un échantillon de patient positif pour la mutation en NGS



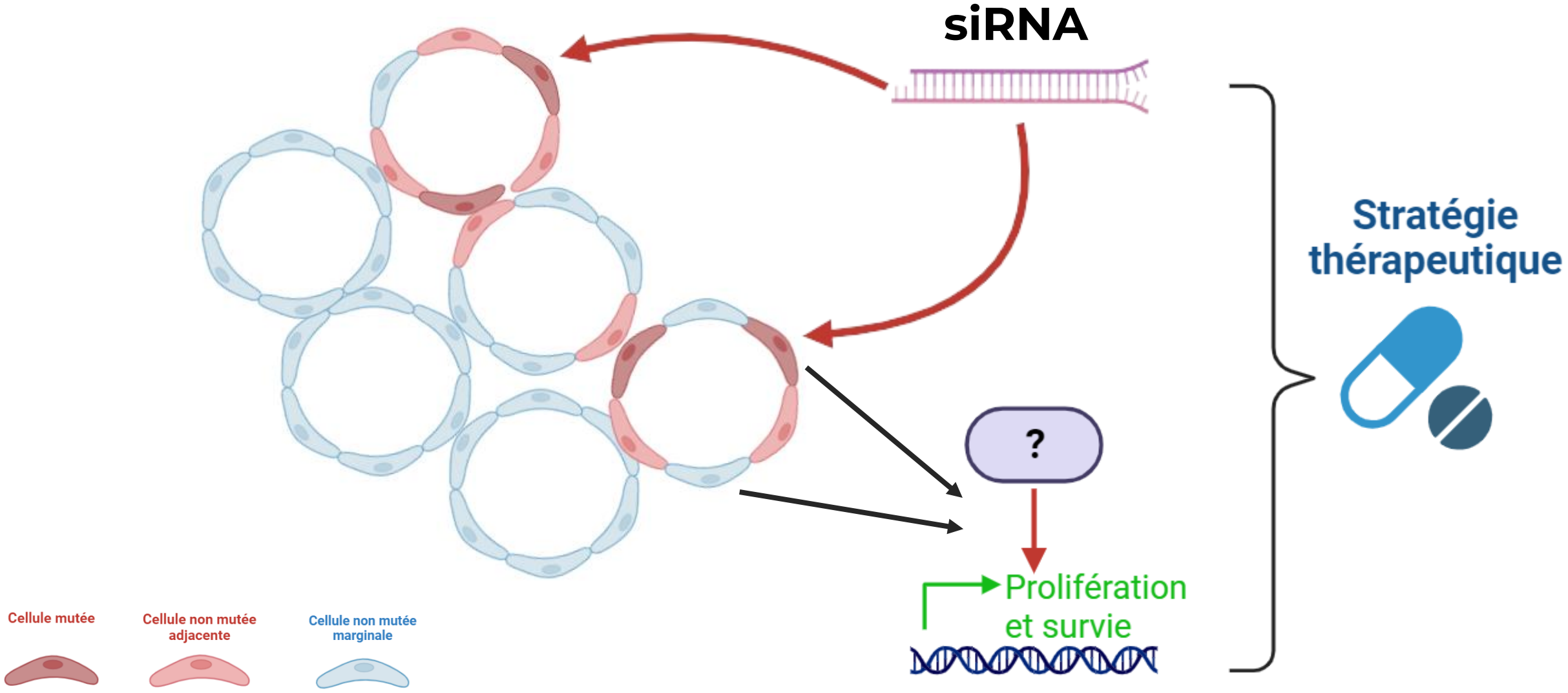
Co-marquage d'un échantillon d'hémangiomatose négatif pour la mutation




GNAQ muté
Cellules endothéliales


Masques 10µm autour d'un ARN marqué
Masques cellules CD31+

Conclusion


siRNA
?
Prolifération
et survie
Stratégie
thérapeutique
Cellule mutée
Cellule non mutée
adjacente
Cellule non mutée
marginale

Inserm U1312 - BRIC TRIO2 team

université de BORDEAUX

Léa Pechtimaldjian

Sandra Ouchérif

Yamina Idrissi

Muriel Cario

Alain Taieb

Sorilla Prey

Maya Loot

Marie-Laure Jullié

Fanny Morice-Picard

Christine Léauté-Labreze

Marie Beylot-Barry team

Collaborators :

Thomas Mathivet

Jérémie Teillon

Fabrice Cordelieres

Sébastien Marais

MAGEC Sud Bordeaux

CHU BDX CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE BORDEAUX

BRIC BORDEAUX INSTITUTE OF ONCOLOGY

Vect'UB

cgfb PROTÉOME

BIC Bordeaux Imaging Center

Mutation mosaïque causale. Quelles cellules?

Table 2

GNAQ Mutational Analysis in Capillary Malformation Cell Populations

Patient	Mutant Allelic Frequency (%)			
	Endothelial Cells	PDGFRβ+ Cells	Stromal Cells	CD45+ Cells
5c	11.3	-	0.4	0
10*	17.1	0	4.6	-
11*	7.6†	0	11.2†	0
12a*	41.8	0	2.2	0.3
12b*	42.9	0	0	0
13	2.8	0	0	0

*Sturge-Weber syndrome

†p.R183G

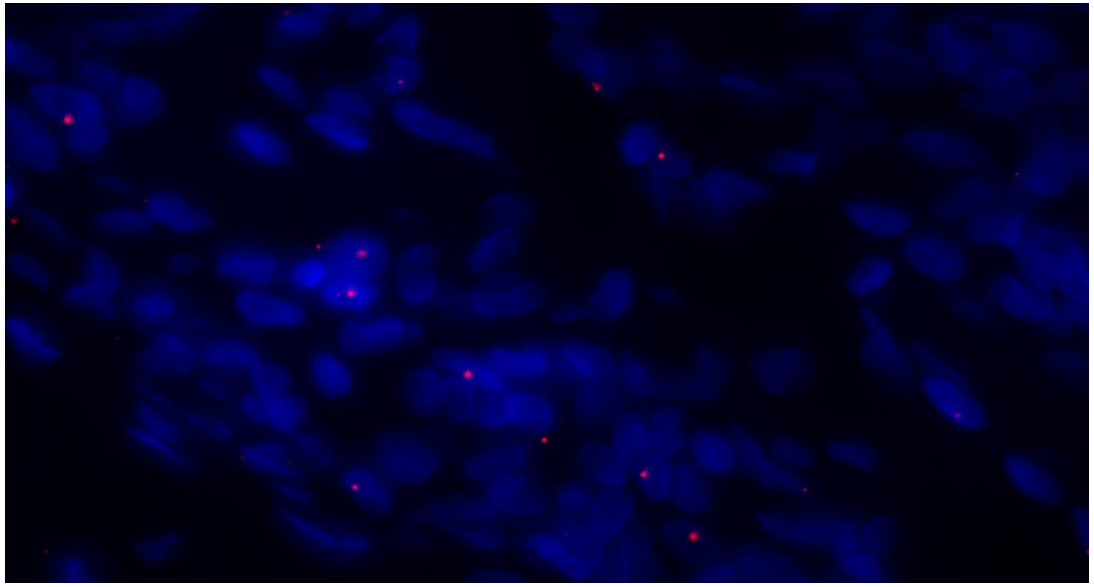
(-) = not performed

Gray shaded area indicates multiple CM specimens from the same patient.

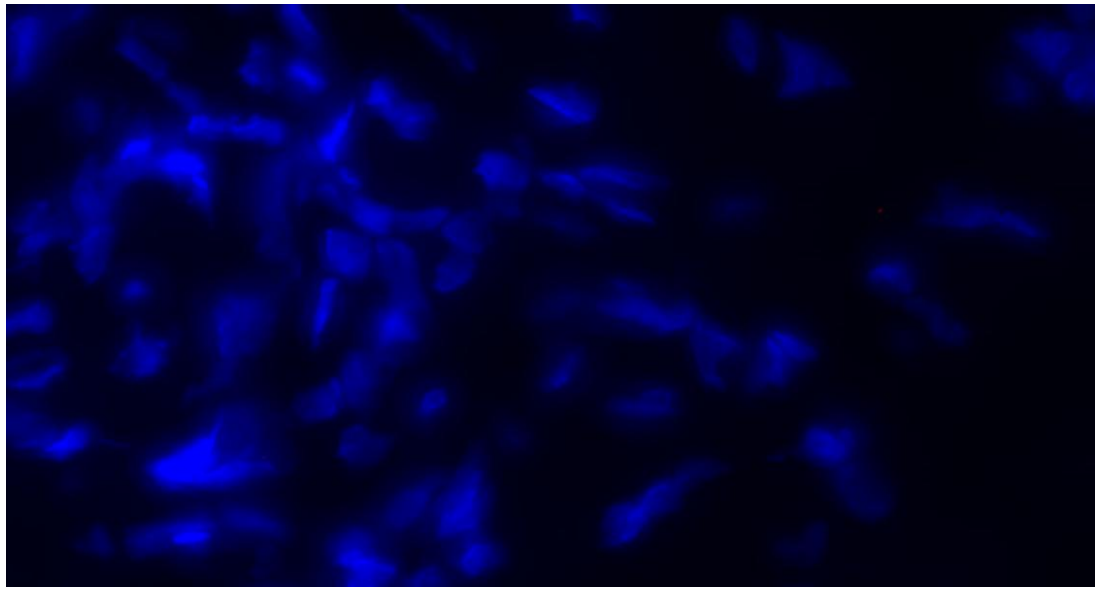
Couto JA, Huang L, Vivero MP, Kamitaki N, Maclellan RA, Mulliken JB, Bischoff J, Warman ML, Greene AK. Endothelial Cells from Capillary Malformations Are Enriched for Somatic GNAQ Mutations. Plast Reconstr Surg. 2016

Signal cellules lésion vs adjacent

Sonde GNAQ mut183
Sur Angiome mutant NGS 3%



Sonde GNAQ mut183
Sur Angiome mutant tissu adjacent



Import de la technique au labo > cohorte bordelaise angiome et NICH