



Faculté
de Médecine
Aix-Marseille Université



Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Recherche de **nouveaux gènes** dans les **myosites à inclusions familiales**

SEVY Amandine
Master 2

Laboratoire INSERM UMR_ S910 : Pr LEVY

Service clinique : Centre de référence des maladies neuromusculaires et de la SLA : Pr POUGET

Directeurs de recherche : Dr KRAHN et Dr BARTOLI équipe de Myologie Translationnelle

mi MYOLOGIE
TRANSLATIONNELLE

Myosite à inclusions (MI)

Sporadique : **Première cause de myopathie acquise >50 ans**
Prévalence 1/100.000 à 10/100.000

I/ Clinique

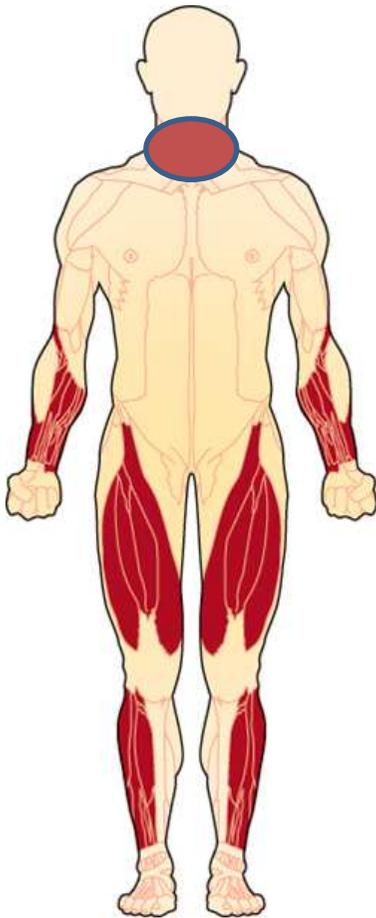
Durée > 6 mois, âge > 30 ans,
EMG « compatible »

Atteinte *quadricipitale* > psoas

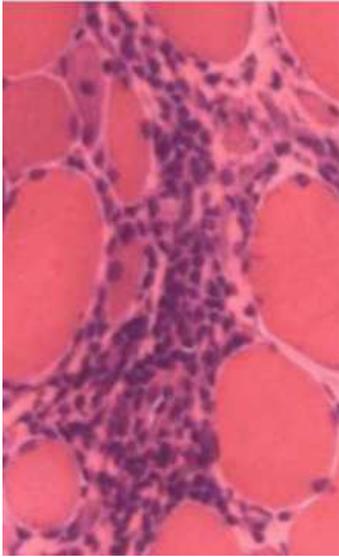
Atteinte des *Fléch des doigts* > abduction d'épaule

Benveniste et al., Neuromusc Disorders, 2009

GRIGGS et al., Ann Neuro, 1995



II/ Anatomopathologie

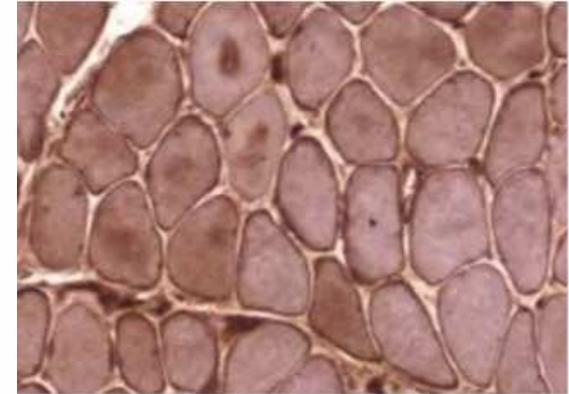
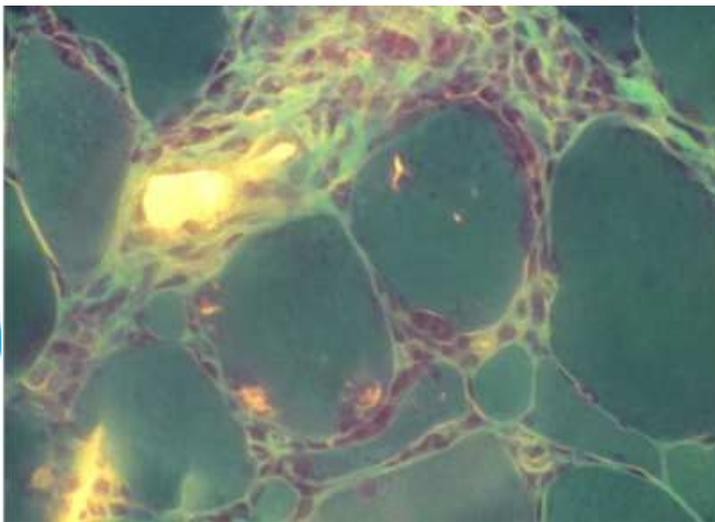


HE : **infiltration lymphocytaire**

Critères anatomopathologiques pour parler de MI
« anatomopathologiquement définie » selon Benveniste et al. :

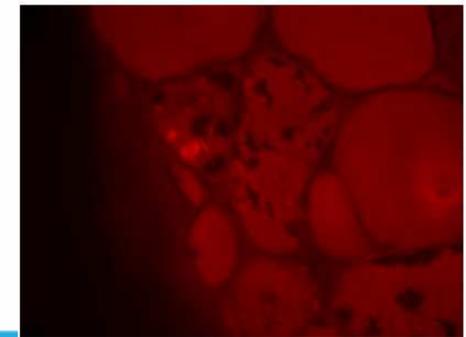
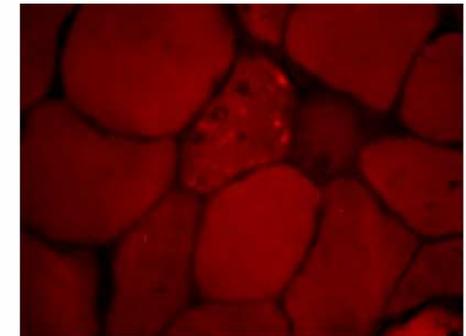
- Exsudat endomysial
- Infiltration de cellules mononucléées dans des fibres musculaires non nécrotiques
- Vacuoles bordées
- Dépôts amyloïdes au rouge congo
- Présence de filaments de 15-18 nm en microscopie électronique, ou TDP43 ou tau (SMI-31) p62/SQSTM1

TC : **VB**



IHC : expression **diffuse HLA1**

RC : **dépôts amyloïdes**



Cas familiaux :

GNE (distal) AR (Eisenberg et al., Nat Genet 2001)

VCP (IBMPFD, SLA) AD (Watts et al., Nat Genet, 2004)

... Autres familles sans mutation dans *VCP* ni *GNE*



Hypothèse de travail

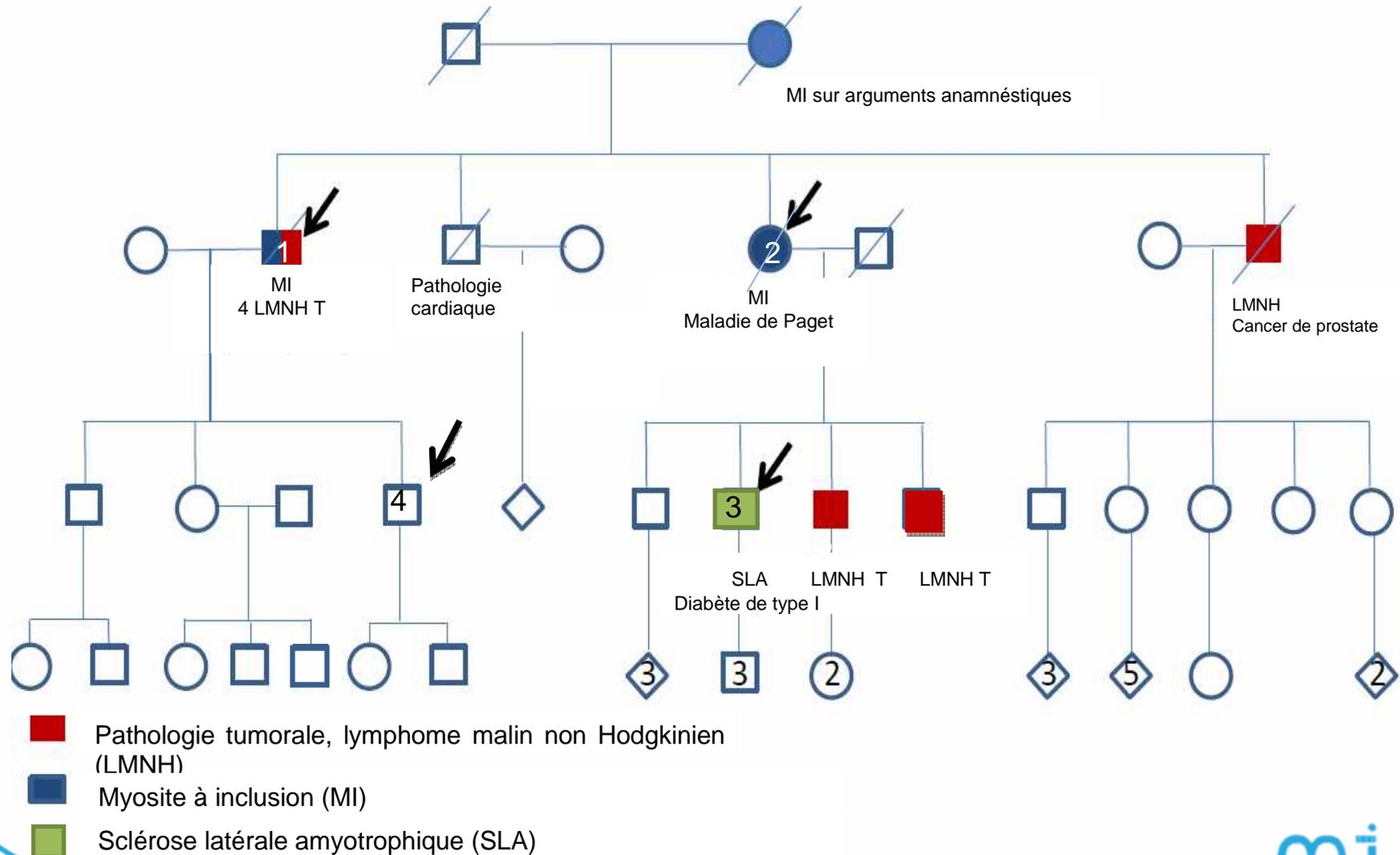
Il existe **d'autres gènes** impliqués dans les myosites à inclusions familiales

Objectifs

- 1 – Mettre en évidence de **nouveaux gènes** impliqués dans les myosites à inclusions familiales
- 2 - Grâce aux **analyses fonctionnelles**, meilleure compréhension de la **physiopathologie**

Méthodologie

1/ Caractérisation de la population :



Séquençage des exomes à haut débit

A] Exclusions par les centres experts *VCP, GNE*

B] Données ERIS INTEGRAGEN.

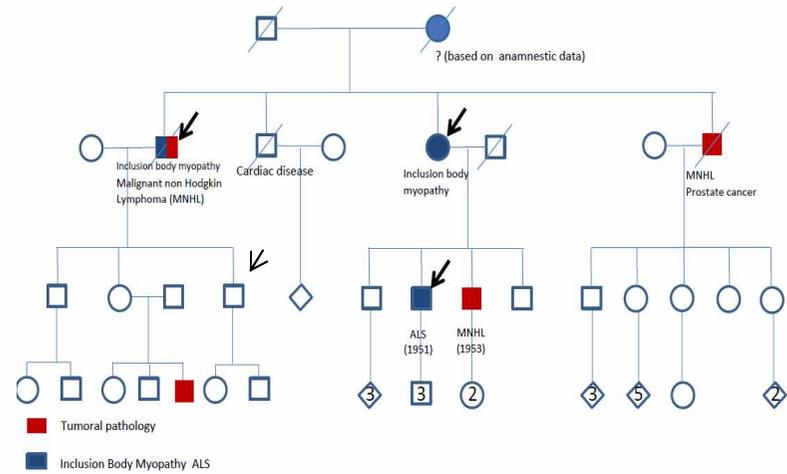
Exclusion gènes impliqués dans SLA familiales : *VCP, GNE, SOD, FUS, MYHC2A, TDP43, SQSTM1, SQTM1, ANG, CLP1, hnRNPA2B1 et hnRNPA1, C9ORF72*

The image shows a screenshot of a variant calling software interface with the following sections:

- Variations**: A dropdown menu set to "All".
- Type**: A grid of checkboxes for variant types:
 - 3'UTR, 5'UTR, Intronic (all unchecked)
 - Missense, Nonsense, Synonymous (all checked)
 - Exonic (indel), Splice intron, Splice exon (all unchecked)
- External Databases**:
 - Keep known SNPs (dbSNP132): No
 - Exclude benign Polyphen2: Yes
 - EVS variant freq max (%): 0.5
 - Integrage het freq max (%): 0.5
 - 1000G variant freq max (%): 0.5
 - Integrage homo freq max (%): 0.5
 - Hapmap variant freq max (%): 0.5
- Quality Control**:
 - Min depth: 10
 - Exclude ambiguous genotypes:
 - Exclude "No Coverage":
- Locus / Gene search**:
 - Position: [text input]
 - Filter by gene(s): [text input]
 - Filter by refseq: [text input]
- Other**:
 - Breakpoints only: No
 - miRNAs only: No
 - Exclude Ensembl: No

Profil de transmission autosomique dominante

Simulation de 2 cas de figure



3 atteints (Hétérozygote)
1 sain (Homozygote sain) :

4 atteints (Hétérozygote):

53 Variations de Séquence

88 Variations de Séquence

141 VS... Sélection **gènes d'intérêt**

Lieu d'expression

(Aceview, NCBI, genecard, uniprot, gene ontology)

muscle, lymphes, moelle osseuse

ou

Implication pathologique

- Majeure : myopathie, SLA, pathologie lymphoproliférative, Paget
- Mineure : Démences, maladies autoimmunes

ou

Prédiction pathogénie

- Type de mutation (stop)
- DB SNP (132)
- Missens : Polyphen 2, ProphyLER

3 atteints 1 sain : 11/53

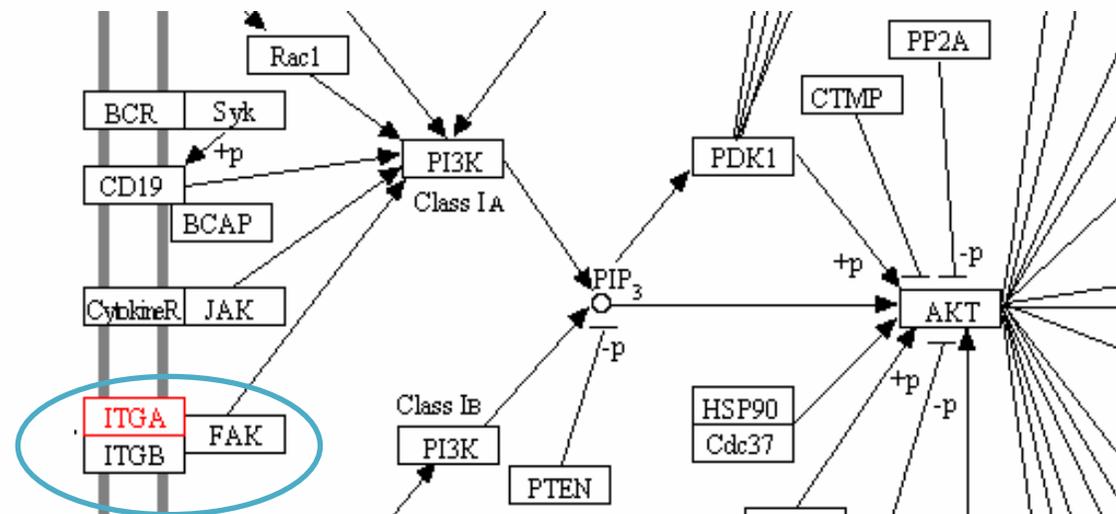
*ITGA7, ACOXL, BNT2A2, CIITAR,
DNAH10, NXPH4, RUNX, SLX4, SMC1B,
SYNE2, TNF*

4 atteints : 3/88

ATP2A3, PIK2C2G, PRG

Analyses fonctionnelles

Analyse mutationnelle : *ITGA7*



Dystrophie musculaire congénitale (1998)

Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy; Hayashi YK et al.; Nat. Genet.; 1998 19:94-97

Gène suppresseur de tumeur

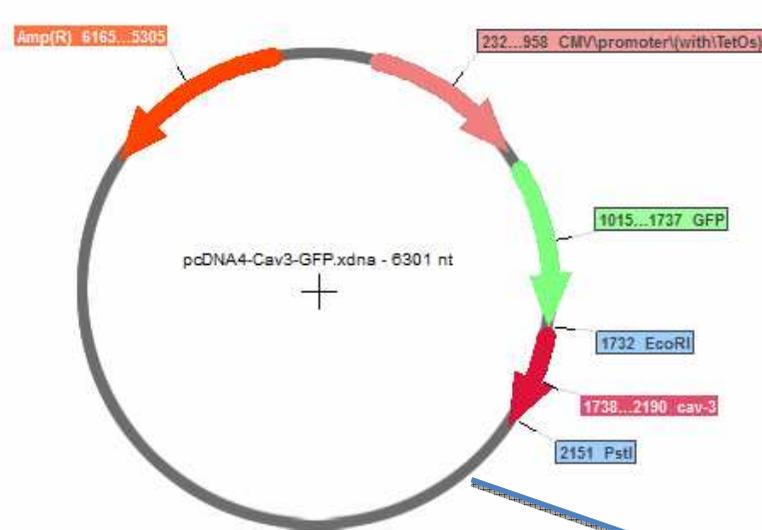
Interaction of Integrin-Linked Kinase and Miniature Chromosome Maintenance 7—Mediating Integrin $\alpha 7$ Induced Cell Growth Suppression; Han YC et al; Cancer Res. 2010 Jun 1;70(11):4375-84.

A] Clonage ITGA7

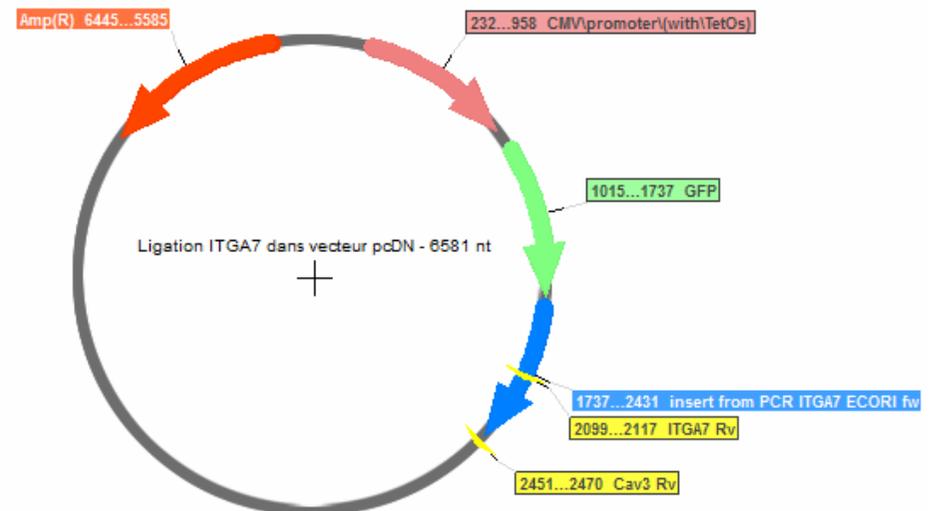
Vecteur : pcDNA4-Cav3

Insert : exon 25 *ITGA7* (intracytoplasmique)

Sites de restriction **ECORI-HF** et **PSTI-HF**

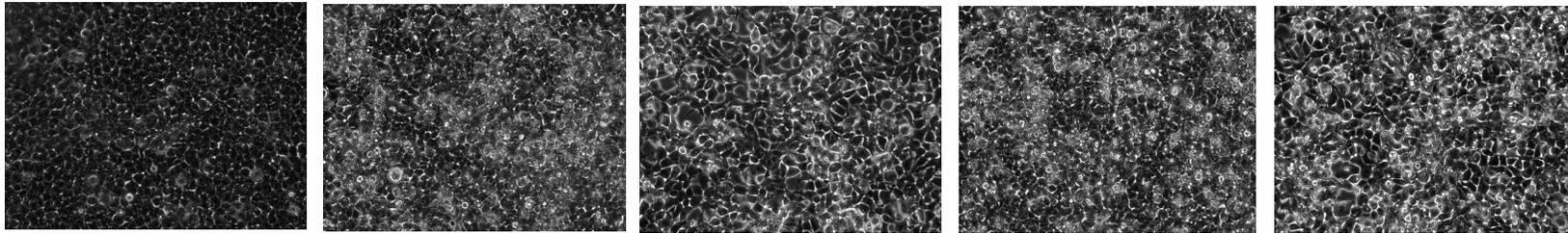


ITGA7 Exon 25 699 pb

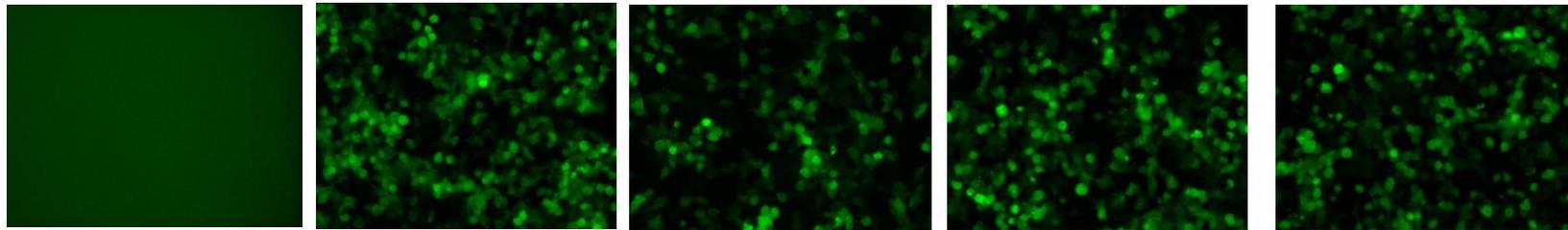


B] Transfection HEK 293

Microscope
À contraste
de phase
20X



Microscope à
Fluorescence
20X



Témoin négatif MOCK

50.2 (WT)

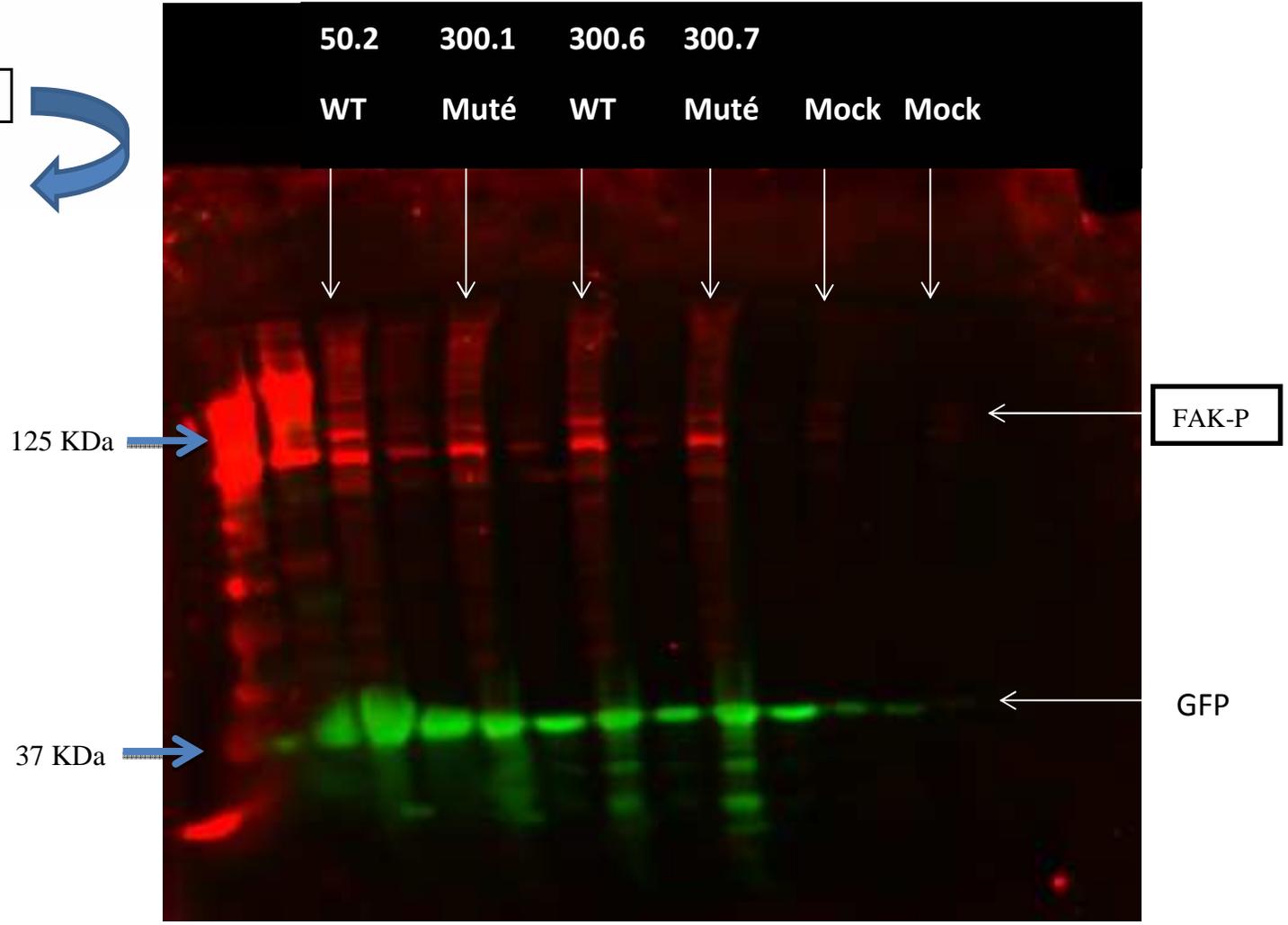
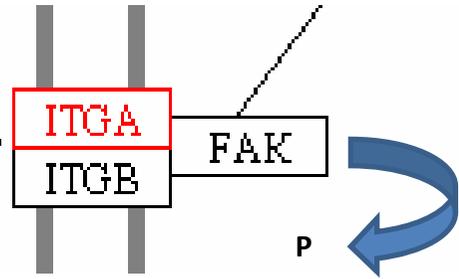
300.6 (WT)

300.1 (muté)

300.7 (muté)

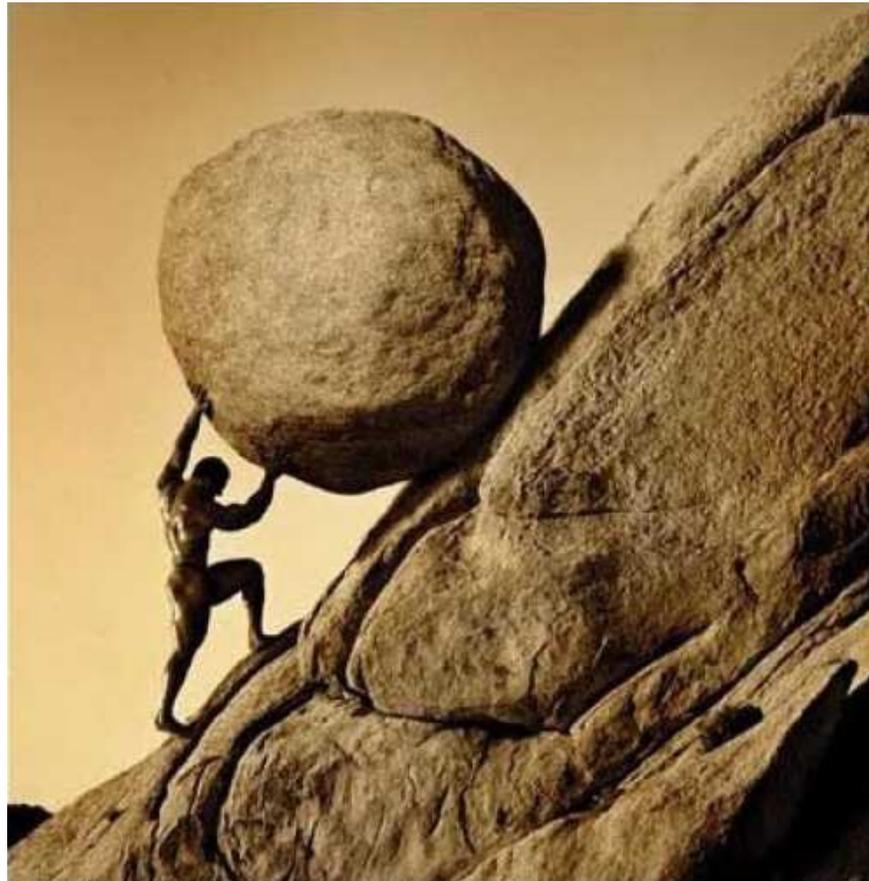
Vérification de l'efficacité de la transfection

C] WB anti FAK-P



Conclusion

L'étude d'ITGA7 semble prometteuse... mais il reste du travail





Merci à toute l'équipe de

mi MYOLOGIE
TRANSLATIONNELLE

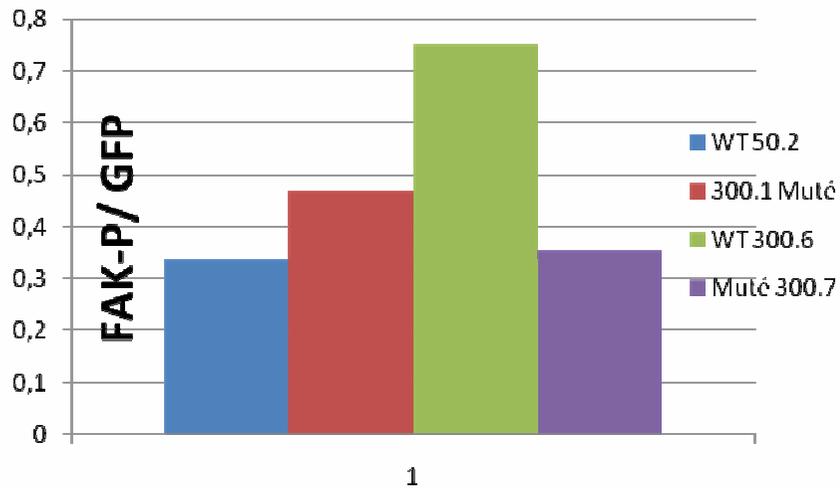
B) Détail des 14 gènes candidats

Chrs	gène	nom du gène	protéine	expression	fonction/pathologie	polyphen 2	prophylER	refseq	Protéine mutée	Type de mutation	génotype
chr6	BTN2A2	Butyrophilin subfamily 2 member A2	Q8WVV5	thymus, cerveau, muscle	Métabolisme lipidique	Potentiellement dommageable 0,997	/	NM_001197237 NM_181531 NM_001197239 NM_006995	V403A V287A V193A V403A	Faux sens	CT TT
chr6	TNF	Tumor Necrosis Factor	P01375	Centre germinal B (CGB) , sang	Potentiellement impliqué dans la physiopathogénie de la SLA et de la maladie d'Alzheimer	Bénin 0,007	Bas 0,5458	NM_000594	E118Q	Faux sens	CG GG
chr12	ITGA7	Integrin alpha 7	Q13683	muscle	Dystrophie musculaire, cardiomyopathie, cancers (gène suppresseur tumeur)	Bénin 0,008	Bas 0,2514	NM_001144997 NM_001144996 NM_002206	R1015W R1112W R1108W	Faux sens	AG GG
chr12	DNAH10	dynein, axonemal, heavy chain	Q8IVF4	Moelle osseuse, muscle.	Fonctions moléculaires, Dyskinésie ciliaire	Probablement dommageable 0,999	/	NM_207437	K3586E	Faux sens	AG AA
chr16	CIITA	Synonyme: MHC2TA	P33076	Moelle osseuse, lymphes, CGB	Maladies auto-immunes, pathologies lymphoprolifératives,	Potentiellement dommageable 0,953	/	NM_000246	R795Q	Faux sens	AG GG
chr16	SLX4	Structure-specific endonuclease subunit	Q8IY92	lymphes, Centre germinal B	Recombinaison ADN Anémie Fanconi	Potentiellement dommageable 0,997	/	NM_032444	R278W	Faux sens	AG GG
chr2	ACOXL	acyl-CoA oxidase-like	/	Muscle, Ilots de Langerhans, tumeurs germinales, prostate, testicules, colon	"Pathologie hématologique »	/	/	NM_001142807	C469*	Non sens	AT TT

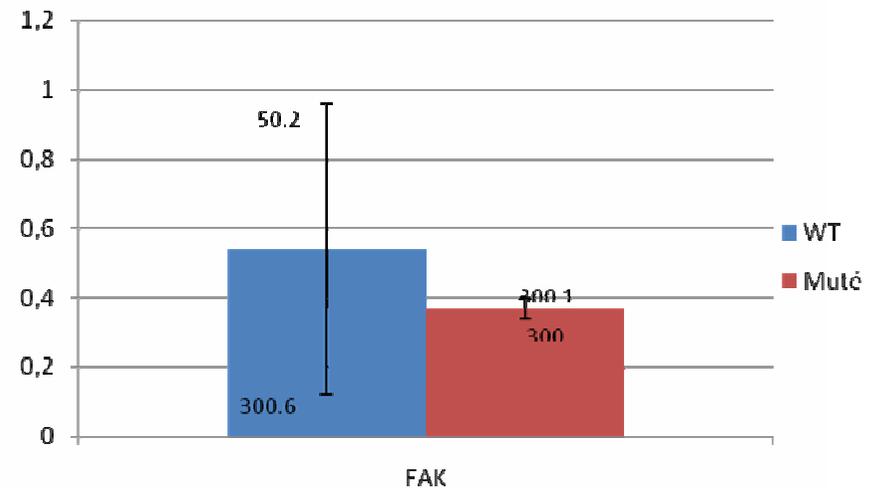
chr12	NXP4	neurexophilin 4		muscle	otites externes	/	/	NM_007224	K98K	Synonyme	AG GG
chr14	SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	Liaison entre organelles et cytosq d'actine	muscle squelettique	Dystrophie musculaire Emery-Dreifuss type 5	/	/	NM_182914 NM_015180	P1461P P1461P	Synonyme	AG AA
chr21	RUNX1	runt-related transcription factor	lymphome Burkitt, LMC, leucémies aiguës	thymus	Prolifération lymphocytaire B, pathologies auto-immunes, atteintes du SNC	/	/	NM_001754 NM_001001890	R423R R396R	Synonyme	AG GG
chr22	SMC1B	structural maintenance of chromosomes 1B1	/	Ubiquitaire	Cycle cellulaire, pneumopathies	/	/	NM_148674	Q716Q	Synonyme	CT TT
Chr11	PGR	<u>récepteur progestérone</u>	<u>Muscle sq</u>	/	<u>Tumeurs muscle lisse, Léiomyosarcomes.</u>	Probablement dommageable Score 0,986	/	NM_000926	S54Y	Faux sens	GT
Chr12	PIK3C2G	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 gamma1	<u>Muscle sq</u>	/	Œdème, toxicités médicamenteuses Sarcomes	/	/	NM_004570	H541H	Synonyme	CT
Chr17	ATP2A3	ATPase Ca transporting	Centre germinal B, lympho T, muscles.	Maladie Alzheimer, voies de signalisation calcium	Dystrophie myotonique 1	/	/	NM_174955 NM_005173 NM_174953 NM_174958 NM_174956	P784P P784P P784P P784P P784P	Synonyme	AG

Quantification du signal

Normalisation du signal FAK-P avec celui de la GFP.



Normalisation du signal de FAK-P avec celui de FAK non phosphorylé



Famille II

2 frères jumeaux homozygotes, Antillais. Fille, sœur : ➤ CPK asymptomatique

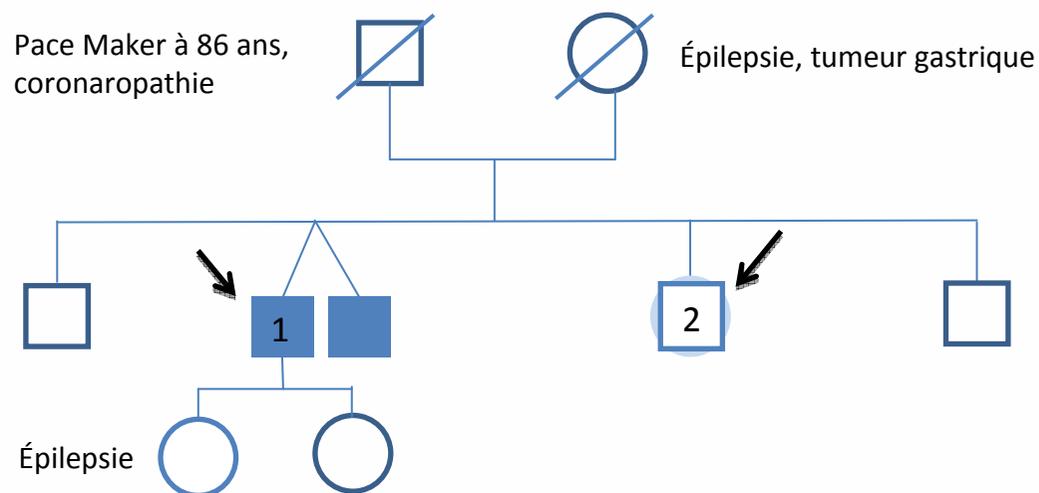
Âges de début : 40 et 60 ans. Troubles de déglutition, atteinte proximale MI

CPK initiaux : 6300 et 3950, phosphatases alcalines normales

Exclusion mutation FSH, DM1 et 2; HIV HTLV négatifs

Anatomopathologie : inflammation, VB, HLA1 diffus, anti P62+

Cylindrome (tumeur parotidienne)



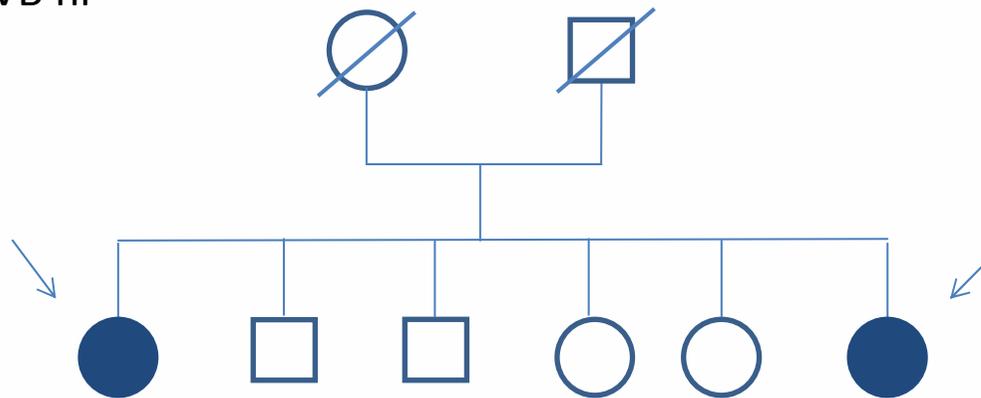
Famille III

Anatomopathologie

Inflammation, HLA1
diffus, pas de VB ni
d'inclusions

Exclusion mutations

VCP GNE FSH
DM1 DM2
Maltase acide



Catherine
Début 45 ans
Faiblesse proximale MI
CPK initiaux 300

Association of a S IBM and SGS in carriers of HLA-
DR3 and 8,1 MCH ancestral haplotype, Rojana et
al., Clin Neurol and neurosurg, 2011

SGS

Famille IV

