



Classification fonctionnelle de variants génétiques plaquettaires par l'utilisation de CRISPR HDR dans des cellules CD34+ différenciées en mégacaryocytes

Functional classification of platelet gene variants using CRISPR HDR in CD34+ cell-derived megakaryocytes

Kosaka Y, Lopez B, Kishimoto N, Jacob S, Montenont E, Huallanca R, *et al.*
Am J Hum Genet 2025 ; 112 : 2888-901.

Analyse commentée réalisée par Alexandre BUTELET

Date de publication : 17 septembre 2026

JUSTIFICATIFS ET OBJECTIFS

L'interprétation des variants génétiques à l'origine des pathologies plaquettaires constitutionnelles (PPC) est un défi clinique majeur puisque la plupart de ceux-ci sont classés en variants de signification indéterminée (VSI). La fiabilité d'un modèle cellulaire spécifique plaquettaire pour l'étude fonctionnelle de ces VSI est une étape clé. Les auteurs de cette étude ont développé un système d'édition génique *via* une réparation de l'ADN par recombinaison homologue basé sur la technique CRISPR-Cas9 dans des cellules CD34+ différenciées en mégacaryocytes (MK) leur permettant le reclassement de 3 VSI par une étude fonctionnelle globale dans la thrombasthénie de Glanzmann (TG).

METHODES

Les auteurs ont modifié une technique basée sur l'édition génique, *via* le complexe ribonucléoprotéique CRISPR-Cas9, optimisée pour l'étude des PPC, dans des MK issus de cellules CD34+ de donneurs volontaires sains ou de sang de cordon ombilical humain. Les cellules CD34+ étaient mises en culture et transfectées par le complexe CRISPR-Cas9 pour diriger une modification de l'ADN par recombinaison homologue avec différentes séquences simple brin (ADNsb). Les ADNsb étaient des séquences connues bénignes, malignes ou des VSI pour les gènes *ITGA2B* et *ITGB3*. Une étude fonctionnelle a ensuite été réalisée sur les MK de ces cellules CD34+ modifiées (**Figure 1**).

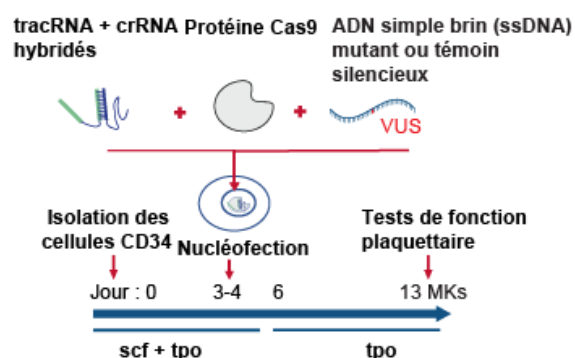


Figure 1 : Principe de l'utilisation du système CRISPR Cas9 HDR appliqué à l'étude des mégacaryocytes dérivés de cellules hématopoïétiques humaines CD34+ dans la thrombasthénie de Glanzmann.

Pour générer des mégacaryocytes (MK) modifiés par CRISPR avec des variants correctement intégrés, les cellules CD34+ sont cultivées avec du facteur de croissance de cellules souches et de la thrombopoïétine pour initier les cultures de MK (J0 à J6). Les cellules cultivées sont isolées et transfectées entre les J3 et J5 avec le complexe guide ARN CRISPR/ARN CRISPR transactivateur, la protéine Cas9 et un ADN simple brin pour la recombinaison homologue avec le variant cible souhaité ou une séquence silencieuse. Les cellules modifiées sont différenciées en MK fonctionnels avec la TPO de J6 à J13 jusqu'à ce que 70 à 90 % des cellules expriment les marqueurs de maturation des MK (ie α IIb [CD41]+/GPIX [CD42a]+).

RESULTATS

Les auteurs ont modifié et différencié en MK au moins 90 % de cellules CD34+ avec leur technique CRIMSON HD (CRISPR-edited megakaryocytes [MKs] for surveying platelet variant functions through homology-directed repair [HDR]). La validation de cette technique reposait sur l'étude d'un variant *ITGA2B* (p.Phe191_Ser192insArgThr) déjà caractérisé responsable d'une TG de type III avec notamment une vérification de l'intégration par méthode Sanger. L'étude de la reproductibilité de cette méthode évaluait la fixation de l'anticorps PAC-1 et du fibrinogène soluble à l'intégrine α IIb β ₃, ainsi que l'expression de P-sélectine après stimulation par la convulxine. L'insertion du variant p.Phe191_Ser192insArgThr permettait une expression de surface normale de l'intégrine α IIb β ₃ à des niveaux comparables à ceux observés dans les témoins non édité.

Cependant, malgré une expression de surface conservée de l'intégrine α IIb β ₃, les MK stimulés par la convulxine et porteurs du variant p.Phe191_Ser192insArgThr présentaient une perte complète de la liaison au PAC-1, tandis que la translocation de la P-sélectine restait intacte dans tous les groupes, confirmant que l'insertion p.Phe191_Ser192insArgThr affecte spécifiquement l'activation de l'intégrine α IIb β ₃. Pour évaluer l'utilité de la technique CRIMSON HD dans la classification fonctionnelle des variants, les auteurs ont étudié un variant probablement pathogène du gène *ITGA2B*, c.601G>A (p.Gly201Ser [G201S]), ainsi que deux VSI voisins issus de la banque de données ClinVar : *ITGA2B* c.602G>C (p.Gly201Ala [G201A]) et c.599C>T (p.Ala200Val [A200V]).

L'étude fonctionnelle des variants p.Gly201Ser et p.Ala200Val du gène *ITGA2B* a permis de les classer en variants probablement pathogènes. Celle du gène *ITGB3* a reclassé le variant p.Arg119Gln en pathogène (Tableau 1). Ce dernier variant serait responsable de la perte de l'épitope plaquettaire HPA-

1a associé à une thrombopénie fœtale et néonatale allo-immune, les résultats orientent plutôt vers une diminution de la liaison par anticorps à HPA-1a *via* une expression défectueuse de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Tableau 1 : Impact du système CRIMSON HD sur le reclassement de variants de signification indéterminée des gènes *ITGA2B* et *ITGB3*.

Gène	Variant étudié	Expression de l'intégrine α_{IIb}	Expression de l'intégrine β_3	Expression de la P-sélectine	Liaison à l'anticorps PAC-1	Classification selon l'ACMG avant modification	Reclassement envisagé selon l'ACMG après édition puis étude fonctionnelle
<i>ITGA2B</i>	p.Gly201Ser [G201S]	-	ND	ND	ND	4	5
	p.Ala200Val [A200V]	+	+	ND	+	3 (VSI)	1
<i>ITGB3</i>	p.Arg119Gln [R119Q]	↘	↘	+	-	3 (VSI)	5

Légende : ACMG : American College of Medical Genetics ; classification des variants ACMG ; 1 : bénin ; 2 : probablement bénin ; 3 : signification indéterminée ; 4 : probablement pathogène et 5 : pathogène ; ND : non déterminé ; + : présence d'une expression ; - : absence d'expression ; ↘ : expression diminuée. PAC-1 : anticorps se liant à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ de conformation active ; VSI : variant de signification indéterminée.

AVIS D'EXPERT

L'interprétation des variants génétiques dans les PPC est un défi clinique majeur en raison de la prévalence de ces pathologies estimée entre $1/10^6$ et $1/10^4$ par rapport à la population générale. La preuve biologique de l'impact de ces variants sur les fonctions plaquettaires est difficile à obtenir. A ce jour, 72 gènes ont été identifiés comme étant à l'origine de PPC. Cependant, 98 % des variants identifiés de manière générale sont classés en VSI selon la classification ACMG (1), ce qui implique des décisions thérapeutiques basées sur des hypothèses. On dénombre 800 variants impliqués dans les PPC dont 657 portant sur les gènes *ITGA2B* et *ITGB3* codant pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Les auteurs de cette étude sont parvenus à modifier une technique d'édition génique permettant une intégration et un remplacement fiable de séquences à étudier (2).

La difficulté de l'étude des VSI en PPC repose sur l'interprétation des résultats issus des lignées cellulaires. L'étude de cellules CD34+ humaines différenciées en MK semble s'approcher d'un modèle cellulaire plus fiable sans toutefois permettre l'étude du micro-environnement hématopoïétique. Une alternative à l'utilisation de cellules CD34+ pourrait être la différenciation dirigée de cellules souches pluripotentes induites en MK, puis en plaquettes. Les plaquettes étant dépourvues de noyau, l'édition génique appliquée aux MK semble un compromis pertinent et acceptable pour l'étude des fonctions plaquettaires sans toutefois permettre pour le moment l'étude fiable des signaux *inside-out* de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Bien qu'intéressants, ces résultats appliqués à la TG devront être confirmés et étudiés pour les autres PPC. La technologie CRIMSON HD ouvre un champ d'application à d'autres pathologies constitutionnelles, la réponse cellulaire aux traitements médicamenteux, l'étude de la signalisation intracellulaire ou la génération de plaquettes.

RÉFÉRENCES

1. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015 ; 17 : 405-24.
2. Riesenberger S, Kanis P, Macak D, Wollny D, Düsterhöft D, Kowalewski J, *et al.* Efficient high-precision homology-directed repair-dependent genome editing by HDRobust. *Nat Methods* 2023 ; 20 : 1388-99.