

**UNIVERSITE PARIS DESCARTES**  
En co-tutelle avec  
**L'UNIVERSITE SAINT-JOSEPH**

**THESE**

En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Ecole doctorale : Gc2iD

**Et**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SAINT-JOSEPH**

Ecole doctorale : Sciences et Santé

Discipline : Génétique et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

**Cybel MEHAWEJ**

Le 25 novembre 2013

**Identification de gènes impliqués dans des dysplasies osseuses rares  
dans des familles libanaises consanguines**

**Membres du jury**

Pr Josué FEINGOLD  
Pr Marie-Christine DE VERNEJOL  
Pr Dominique BONNEAU  
Dr Agnès DELAHODDE  
Pr Valérie CORMIER-DAIRE  
Pr André MEGARBANE

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse



*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes parents Hanane et Fares,*

*à mes frères Roy et Elie,*

*A toute ma famille et*

*A mes amis,*

*Sans vous, je n'y serais pas arrivée...*

## **Remerciements**

*En préambule à cette thèse, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.*

*Je tiens à remercier dans un premier temps le Professeur Josué Feingold de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Professeur Marie-Christine De Vernejoul et le Professeur Dominique Bonneau d'avoir accepté de juger ce travail. Mes sincères remerciements vont aussi au Docteur Agnès Delahodde pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse mais surtout pour avoir contribué à une partie de notre projet.*

*Je remercie profondément mes co-directeurs de thèse, le Professeur Valérie Cormier-Daire et le Professeur André Mégarbané de m'avoir accueillie au sein de leurs équipes, soutenue, conseillée et guidée tout au long du trajet. Je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour leur bienveillance, leur dévouement et leur disponibilité. J'espère avoir été à la hauteur de leur confiance. Ils resteront toujours ma source d'inspiration !!!*

*J'exprime ma gratitude envers le Professeur Arnold Munnich de m'avoir accueillie au sein de son unité.*

*Je suis extrêmement reconnaissante pour le Docteur Eliane Chouery Khoury pour avoir cru en moi depuis mon travail de master qu'elle a dirigé, pour sa disponibilité, ses conseils, sa grande patience et sa gentillesse. Je lui adresse mes plus cordiaux remerciements pour son support continu !*

*Un grand merci pour l'ensemble de l'équipe de l'Unité de Génétique Médicale (UGM), pour leur accueil bienveillant. Je les remercie pour la passion et l'amour du travail qu'ils m'ont appris, pour cet esprit de famille qu'ils m'ont transmis et pour leur hospitalité généreuse!!! Une pensée particulière est adressée à l'équipe de biologie moléculaire, Joelle, Nabiha, Nadine et Sandra, avec qui j'ai travaillé quotidiennement, pour leur amitié, leur aide et leurs conseils avisés.*

*Je remercie également Rima Chedid d'avoir eu la gentillesse de réviser le manuscrit de ma thèse.*

*Je tiens à remercier sincèrement l'équipe « Bases moléculaires et physiopathologiques des chondrodysplasies » à l'unité INSERM 781 de l'hôpital Necker enfants-malades, de leur accueil, leur soutien et leurs encouragements surtout durant tous les moments difficiles.*

*J'exprime ma gratitude envers le Docteur Valérie Delague pour son accueil pendant deux mois, ses conseils et sa gentillesse.*

*Mes remerciements vont également à l'Agence Universitaire de la Francophonie pour avoir financé mes voyages en France durant ces deux dernières années, au Conseil de Recherche de l'Université Saint-Joseph (USJ) pour avoir financé ce projet et à l'Association Médicale Franco-Libanaise pour le prix qu'elle m'a accordé.*

*Pour Nancy et José, j'exprime mon bonheur d'avoir vécu avec eux des moments agréables et avoir partagé des joies et même des difficultés.*

*Enfin, pour leur amour, leurs encouragements et leur soutien qui m'ont permis d'accomplir cette thèse dans de très bonnes conditions, je remercie chaleureusement mes parents Hanane et Fares, mes frères Roy et Elie, ma famille et tous mes proches et amis. C'est à eux que je dois ma confiance en moi, mon optimisme et mon ambition...*

## Résumé

La pratique du mariage entre apparentés au sein de la population libanaise, favorisée par des raisons sociales, religieuses, géographiques et aussi politiques, a vu apparaître des sous-groupes de populations de taille plus ou moins réduite, parfois à la limite d'isolats génétiques. Ceci a engendré une augmentation de la prévalence des maladies autosomiques récessives fréquentes mais aussi et surtout rares. Parmi ces dernières, les chondrodysplasies ont retenu notre attention. Elles sont caractérisées par un retard statural dû à un défaut du processus d'ossification endochondrale, qui est responsable de la croissance des os longs. Au cours de ces dernières décennies, plus de 230 gènes responsables d'environ 400 maladies osseuses constitutionnelles ont été identifiés. Cependant, les bases moléculaires d'une centaine de dysplasies osseuses restent, à ce jour, inconnues. L'identification de gènes codant pour des protéines de nature extrêmement variée a contribué à la compréhension du mécanisme complexe d'ossification endochondrale.

Mon travail de thèse, réalisé en cotutelle entre l'équipe de recherche « Bases moléculaires et physiopathologiques des chondrodysplasies » de l'hôpital Necker enfants-malades, à Paris en France et l'Unité de Génétique Médicale (UGM) de l'Université Saint-Joseph au Liban, a consisté à identifier des gènes impliqués dans des dysplasies osseuses autosomiques récessives dans quatre familles libanaises consanguines. Dans ce cadre, différentes stratégies ont été adoptées.

La première a été une stratégie d'intersection des variations détectées par le séquençage de l'exome de deux patients, atteints d'une forme sévère de dysplasie spondylodysplastique létale et issus de deux familles libanaises consanguines et non apparentées (Familles A et B). Nous avons identifié une mutation homozygote du gène *MAGMAS* (NM\_016069, p.Asn76Asp) (Mitochondria-associated granulocyte macrophage CSF-signaling molecule) à l'origine de la maladie dans les deux familles A et B. *MAGMAS* est une protéine associée à la mitochondrie et impliquée dans la régulation de l'import actif des protéines vers la matrice mitochondriale. Par immunohistochimie, nous avons montré que *MAGMAS* est spécifiquement exprimée au niveau de l'os et de la zone hypertrophique du cartilage. *MAGMAS*, ayant une fonction cruciale pour la survie, est très conservé entre les espèces. Après avoir généré des souches de levures exprimant une copie normale ou mutée du gène humain *MAGMAS*, nous

avons validé l'effet délétère de la mutation p.Asn76Asp, i) sur la croissance des levures, en montrant que les souches portant le gène humain muté présentent un caractère thermosensible, ii) sur la fonction d'import des protéines vers la matrice mitochondriale, qui est altérée dans les souches mutées et iii) sur la stabilité de la protéine. Nous avons également observé un effet de la mutation sur la morphologie des mitochondries et des peroxysomes des cellules de levures, suggérant une induction de l'autophagie dans les souches de levures portant la mutation p.Asn76Asp. L'identification de mutations de *MAGMAS* dans une dysplasie osseuse sévère, permet d'attribuer à cette protéine un rôle spécifique dans le processus complexe d'ossification endochondrale.

La deuxième stratégie a été une combinaison, au sein d'une même famille, d'une stratégie de cartographie par homozygotie et du séquençage de l'exome d'un seul patient. Cette approche a été utilisée dans une famille consanguine avec 3 enfants atteints porteurs d'une dysplasie rhizomélique (Famille C). Nous avons identifié une mutation homozygote du gène *NWD1* (NACHT and WD repeat domain containing 1) (NM\_001007525, p.Cys1376Tyr) responsable de la maladie dans cette famille C. Ce gène code pour une protéine ayant des domaines WD répétés qui lui confèrent un rôle dans divers mécanismes comme la transduction de signal, la régulation de la transcription, le transport vésiculaire et le contrôle du cycle cellulaire. En utilisant la même approche dans une famille consanguine avec deux enfants porteurs d'un syndrome caractérisé par une avance staturale et des malformations craniofaciales (Famille D), nous avons identifié une mutation homozygote non-sens dans le gène *METTL21D* (Methyltransferase Like 21D) (NM\_001040662, p.Tyr33X). Ce gène code pour une méthyltransférase dont le rôle dans les maladies de développement peut être dû à la régulation, par méthylation, de certaines protéines dont les protéines histoniques.

En parallèle, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres travaux dont l'étude moléculaire par séquençage direct du gène *ROR2* codant pour un récepteur orphelin de la tyrosine kinase, qui a permis d'identifier une nouvelle mutation (NM\_004560, p.Arg272Cys), chez une famille libanaise consanguine présentant une atteinte modérée du syndrome de Robinow. De même, j'ai participé à l'étude moléculaire de 8 patients atteints d'ostéolyse multicentrique carpotarsienne et identifié ainsi trois nouvelles mutations du gène *MAFB* (NM\_005461, p.Ser54Trp, p.Pro63Leu et p.Ser65Ile). Cette étude de corrélation génotype –

phénotype a montré une homogénéité génétique contrastant avec une grande hétérogénéité clinique.

En conclusion, l'identification et l'étude moléculaire de plusieurs gènes impliqués dans des dysplasies osseuses, a permis de confirmer la grande hétérogénéité génétique de ces maladies. La compréhension de la fonction des protéines nouvellement identifiées à l'origine de ces dysplasies contribuera à la compréhension des mécanismes d'ossification endochondrale, permettra l'affirmation d'un diagnostic postnatal, l'établissement de corrélations génotype-phénotype, et ouvrira peut être de nouvelles perspectives thérapeutiques.

# Table des matières

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Table des Matières .....	vii
Liste des Abréviations.....	xiii
Liste des Figures .....	xviii
Liste des Tableaux .....	xxi
I- Etude Bibliographique.....	1
1. Les Dysplasies Osseuses.....	2
1.1. Généralités.....	3
1.2. L'épidémiologie des dysplasies osseuses.....	3
1.3. Classification des dysplasies osseuses .....	4
1.4. Les bases moléculaires des dysplasies osseuses .....	5
2. Le Système Squelettique.....	7
2.1. Les caractéristiques du tissu osseux .....	8
2.1.1. L'organisation structurale de l'os.....	8
2.1.1.1. La structure primaire de l'os .....	8
2.1.1.1.1. Le tissu non lamellaire .....	8
2.1.1.1.2. Le tissu osseux lamellaire .....	8
2.1.1.2. La structure secondaire de l'os lamellaire.....	9
2.1.1.2.1. L'os cortical ou compact.....	9
2.1.1.2.2. L'os trabéculaire .....	9
2.1.2. L'anatomie d'un os long.....	10
2.1.2.1. La diaphyse.....	10
2.1.2.2. Les métaphyses.....	10
2.1.2.3. Les épiphyses .....	10

2.1.3. La composition de l'os .....	11
2.1.3.1. Les cellules osseuses .....	11
2.1.3.1.1. Les cellules ostéoformatrices .....	11
2.1.3.1.2. Les cellules ostéoclastes .....	13
2.1.3.2. La matrice extracellulaire osseuse.....	13
2.1.3.2.1. La phase organique de la MEC ou « ostéoïde ».....	13
2.1.3.2.2. La phase minérale de la MEC.....	14
2.2. Le développement embryonnaire du squelette.....	14
2.3. L'ostéogenèse.....	16
2.3.1. L'ossification membranaire ou endoconjonctive .....	17
2.3.2. L'ossification endochondrale .....	17
2.4. La croissance de l'os .....	20
2.4.1. La croissance en largeur ou appositionnelle.....	20
2.4.2. La croissance en longueur .....	21
2.4.2.1. Histophysiologie de la plaque de croissance .....	21
2.4.2.1.1. La zone de réserve .....	22
2.4.2.1.2. La zone proliférative .....	22
2.4.2.1.3. La zone hypertrophique .....	22
2.4.2.1.4. La zone du cartilage calcifié .....	24
2.4.2.2. La régulation de l'ossification endochondrale .....	24
2.4.2.2.1. Les facteurs de transcription .....	25
2.4.2.2.2. Les voies de signalisation .....	26
2.5. Le remodelage osseux .....	30
3. La consanguinité .....	33
3.1. Définition de la notion de consanguinité .....	34
3.2. La consanguinité dans le monde .....	36
3.3. L'effet de la consanguinité sur la santé.....	38

3.4. La consanguinité et son impact sur l'apparition des maladies génétiques au Liban.....	40
4. Les approches utilisées pour l'identification de gènes morbides.....	42
4.1. La cartographie par homozygotie ou homozygotie par filiation.....	43
4.1.1. Généralités.....	43
4.1.2. Applications.....	45
4.1.3. Le principe de la technique.....	45
4.1.4. Les marqueurs génétiques .....	45
4.1.4.1. Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polymorphismes de longueur de fragments de restriction .....	46
4.1.4.2. Les microsatellites .....	46
4.1.4.3. Les SNP ou Single Nucleotide Polymorphism.....	47
4.1.5. Paramètre statistique pour l'évaluation de la liaison : le Lod score .....	47
4.1.6. Les facteurs dont dépend la puissance d'une analyse de liaison .....	48
4.1.7. Conclusion.....	48
4.2. Le séquençage de l'exome .....	49
4.2.1. Généralités.....	49
4.2.2. Applications.....	50
4.2.3. Le principe de la technique.....	51
4.2.4. L'analyse du séquençage de l'exome .....	52
II- Objectif de la thèse.....	54
III- Matériel et Méthodes .....	57
1. La Méthodologie.....	58
2. Les patients ayant participé à ce projet.....	60
2.1. Familles A et B.....	60
2.1.1. La patiente AP1 .....	61
2.1.2. Le patient AP2.....	62
2.1.3. Le patient BP1 .....	62
2.1.4. La patiente BP2 .....	63

2.2. Famille C.....	65
2.3. Famille D.....	67
2.3.1. La patiente DP1 .....	67
2.3.2. Le patient DP2.....	68
2.4. Famille E .....	70
2.4.1. La Patiente EP1 .....	71
2.4.2. La patiente EP2.....	72
3. Les Méthodes .....	73
3.1. Extraction de l'ADN à partir du sang selon la méthode saline .....	73
3.2. Le dosage de l'ADN .....	74
3.3. L'amplification de l'ADN par PCR .....	74
3.4. La vérification de la PCR.....	76
3.5. Le séquençage fluorescent .....	77
3.6. Le génotypage par microsatellites.....	79
3.7. Etude de liaison par puces d'ADN à SNP.....	81
3.8. Le séquençage de l'exome .....	82
3.9. L'extraction de l'ARN à partir du sang.....	86
3.10. La synthèse de l'ADNc par RT.....	87
3.11. L'étude de l'expression des gènes.....	88
3.12. La PCR en temps réel.....	88
3.13. Le marquage immunohistochimique.....	90
3.14. La transformation des bactéries immunocompétentes par un vecteur .....	92
3.15. L'extraction et la purification du plasmide amplifié.....	93
3.16. Mutagenèse dirigée .....	94
3.17. La transformation de levures.....	99
3.18. Les tests de complémentation .....	102
3.19. Le Western blot.....	103

3.20. L'étude microscopique de l'aspect des mitochondries et des peroxysomes .....	105
3.21. L'étude du profil d'ARNr dans les souches de levures.....	106
IV- Les Résultats.....	108
1. Familles A et B .....	109
1.1. Identification du gène responsable de la dysplasie osseuse des familles A et B .....	109
1.2. Immunohistochimie de la protéine MAGMAS au niveau de la plaque de croissance murine .....	113
1.3. Test de complémentation .....	114
1.4. L'évaluation de la fonction de MAGMAS.....	116
1.5. L'évaluation de l'expression de MAGMAS .....	118
1.6. Analyses morphologiques .....	118
1.7. L'analyse du profil d'ARNr dans les différentes souches de levures .....	119
2. Famille C.....	121
2.1. Etude de liaison par puces à ADN .....	121
2.2. Construction des haplotypes par marqueurs microsatellites .....	123
2.3. Le séquençage de l'exome .....	127
3. Famille D .....	130
3.1. Etude de liaison par puces à ADN .....	130
3.2. Le séquençage de l'exome .....	131
3.3. Analyse de l'expression du gène METTL21D par qRT-PCR .....	133
4. Famille E.....	134
V- Interprétation des résultats.....	138
1. Famille A et B.....	139
2. Famille C.....	144
3. Famille D .....	146
4. Famille E.....	150
VI- Conclusion et discussion générale.....	153
Références.....	157

- Annexe 1: The identification of MAFB Mutations in Eight Patients with Carpo-Tarsal Osteolysis Supports Genetic Homogeneity but Clinical Variability
- Annexe 2: Sib Pair With Previously Unreported Skeletal Dysplasia
- Annexe 3: A Second Family with Autosomal Recessive Spondylometaphyseal Dysplasia and Early Death
- Annexe 4: Marfanoid Habitus, Inguinal Hernia, Advanced Bone Age, and Distinctive Facial Features: A New Collagenopathy?
- Annexe 5 : La liste des réactifs utilisés dans l'extraction de l'ADN
- Annexe 6 : La liste des amorces utilisées pour le séquençage de gènes
- Annexe 7 : La liste des amorces utilisées pour l'étude de l'expression de gènes
- Annexe 8 : Les milieux utilisés pour la mutagenèse dirigée
- Annexe 9 : Les amorces utilisées pour le séquençage du plasmide
- Annexe 10: Les solutions utilisées pour la transformation de levures
- Annexe 11: The impairment of MAGMAS function in human is responsible for a severe skeletal dysplasia
- Annexe 12: Identification of a novel causative mutation in the ROR2 gene in a Lebanese family with a mild form of recessive Robinow syndrome

## Liste des abréviations

AAA+	ATPase associated with various cellular activities
AC	Anticorps
AcLi	Acétate de Lithium
ADN	Acide désoxyribonucléotidique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide Ribonucléotidique
ATPase	Adenosine TriPhosphatase
BLB	Blood Lysis Buffer
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CBFA1	Core-Binding Factor, Runt domain, Alpha subunit 1
Cdk	cyclines-dependent kinases
Cf.	Confer
CHST14	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) Sulfotransferase 14
CKI	Cyclines-dependent Kinases Inhibitors
CRD	Cystein Rich Domain
CSF	Colony stimulating factor
CGH	Hybridation Génomique Comparative
cM	centiMorgan
CMDA	Cardiomyopathie dilatée avec ataxie
CNV	Copy Number Variation
COL2A1	Collagen type II alpha 1
Ct	Cycle Threshold
DAB	3,3'-DiAminoBenzidine tetrahydrochloride
DbSNP	SNP Database
DEPC	DiEthyl PyroCarbonate
DMSO	DiMéthyl SulfOxide
dNTP	désoxyriboNucléotides TriPhosphates
ddNTP	didésoxyriboNucléotides TriPhosphates
DO	Densité Optique

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ERAD	Endoplasmic Reticulum-associated protein degradation
EVS	Exome Variant Server
F	Coefficient de consanguinité
FBN	Fibrillin
FGF	Fibroblast-Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GDF	Growth and Differentiation Factor
GERP	Genomic Evolutionary Rate Profiling
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GTTYPE	GeneChip Genotyping Analysis Software
Fz	Frizzled
FOA	FluoroOrotic Acid
GFP	Green Fluorescent Protein
H2O2	Péroxyde d'Hydrogène
HRP	HorseRadish Peroxidase
Hox	Homeobox
IBD	Identity By Descent
IBMPFD	Inclusion Body Myopathy associated with Paget disease of bone and Frontotemporal Dementia
IHC	ImmunoHistoChimie
IHH	Indian HedgeHog
IL	InterLeukine
INPPL1	Inositol Polyphosphate Phosphatase-Like1
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
ISDS	The International Skeletal Dysplasia Society
LOD	Logarithm Of Odds
MAGMAS	Mitochondria-associated granulocyte macrophage CSF-signaling molecule
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mb	Mégabases

MEC	Matrice Extracellulaire
METTL21D	Methyltransferase Like 21D
MIF	Mullerian Inhibiting Factor
Min	minute
mL	milliLitre
MLL2	Myeloid/Lymphoid or Mixes Lineage Leukemia 2
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mM	milliMolaire
MPP	Mitochondrial processing peptidase
MMP13	Matrix Metallopeptidase 13
mtHsp70	mitochondrial Heat shock protein 70
NACHT	[Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP), MHC Class II Transcription Activator (CIITA), incompatibility locus protein from <i>Podospora anserina</i> (HET-E), and Telomerase-associated Protein (TP1)]
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NWD1	NACHT and WD repeat domain containing 1
nm	nanometer
OH	Hydroxyle
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
ON	Over Night
OPG	ostéoprotégérine
Pax	Paired box
Pb	paire de bases
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Phosphate-Buffered Saline-Tween20
PC	Périmètre Crânien
PDE4D	Phosphodiesterase 4D
PEG	PolyEthylène Glycol
PKMT	Protéines lysine méthyltransférases
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PolyPhen	POLYmorphism PHENotyping

PPR	PTH/PPTHrP Receptor
PRMT	Protéines arginine méthyltransférases
Ptch-1	Patched-1
PTH	Parathyroïde Hormone PTHrP
PTS1	Peroxisomal Targeting Signal type
PTHrP	Parathyroïde Hormone Related Protein
qRT-PCR	Reverse Transcriptase Quantitative
qsp	quantité suffisante pour
RANKL	Receptor activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROR2	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 2
rpm	rotations par minute
RRS	Recessive Robinow Syndrome
RS	Robinow Syndrome
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
RUNX2	Runt-Related Protein 2
SAM	S-adénosylméthionine
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Sec	second
SMAD4	[SMAD (mothers against decapentaplegic homolog 4, Drosophila) family member 4]
Smo	smoothened
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
STR	Short Tandem Repeat
STRAP	Serine/Threonine kinase Receptor Associated Protein
SOX9	Sry Box Containing Protein 9
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Acide trichloracétique
TE	Tris EDTA

TGFb	Transforming Growth Factor beta
TGFBR	Transforming Growth Factor beta Receptor
TIM	Translocase of the inner mitochondrial membrane
Tm	melting temperature
TOM	Translocase of the outer mitochondrial membrane
U	Unité
UGM	Unité de Génétique Médicale
VCP	Valosin-Containing Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
W0	milieu minimal de culture
WD	tryptophane-acide aspartique
WDR62	WD Repeat domain 62
WLB	White Lysis Buffer
Wnt	Wingless
WT	Wild Type ou normal
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
YPG	Yeast extract Peptone Glycerol
Z	LOD Score
Θ	Taux de recombinaison entre deux loci
μL	microlitres

## Liste des figures

Figure 1: Organisation structurale de l'os.....	11
Figure 2 : La régulation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en lignées ostéoblastiques ou chondrocytaires.....	16
Figure 3: Le mécanisme d'ossification endochondrale. ....	20
Figure 4: Coupe histologique d'une plaque de croissance d'une souris adulte avec une représentation schématique des zones de différenciation tissulaire.....	23
Figure 5: La régulation de l'ossification endochondrale par différents facteurs de transcription et voies de signalisation .....	25
Figure 6: La répartition globale des mariages consanguins dans le monde.....	38
Figure 7: Le principe de la cartographie par homozygotie. ....	43
Figure 8: La recombinaison par « crossing over ».....	44
Figure 9: Les pedigrees des familles A et B .....	60
Figure 10: Données radiologiques des patients BP2 à 9 mois et AP2 à la naissance et à 3 mois..	64
Figure 11: Le pedigree de la famille C .....	65
Figure 12 : Photos et radiographies du patient CP3 à 9 ans.....	66
Figure 13: Le pedigree de la famille C. ....	67
Figure 14: Figure 14 : Photos de la patiente DP1 .....	68
Figure 15 : Les radiographies de la patiente DP1 .....	69
Figure 16: Le pedigree de la famille E.....	70
Figure 17: Photos de la patiente EP1 à l'âge de 4 ans, 8 ans et 18 ans.....	70
Figure 18 : Les examens radiologiques de la patiente EP1 à l'âge de 4 ans.....	72
Figure 19: Le protocole de l'analyse de liaison par le kit Affymetrix GeneChip Human Mapping NspI 250K Array. Schéma extrait du manuel du kit.....	82
Figure 20: Schéma récapitulatif du protocole de séquençage de l'exome.....	83
Figure 21: Le protocole de la capture par le kit «Agilent SureSelect 50Mb » .....	84
Figure 22: Le protocole du séquençage avec des terminateurs réversibles .....	85
Figure 23: Le protocole de l'immunohistochimie .....	91
Figure 24 : Le protocole de la mutagenèse dirigée, selon le kit QuickChange II XL. ....	966
Figure 25: La ségrégation de p.Asn76Asp avec la dysplasie spondylo-dysplastique de la famille A.....	110

Figure 26: L'analyse de l'expression des transcrits PAM16, CORO7, CORO7-PAM16 et GAPDH au niveau de fibroblastes, chondrocytes et ostéocytes contrôles .....	112
Figure 27: Immunolocalisation de MAGMAS au niveau de la plaque de croissance.....	113
Figure 28: Analyse de croissance in vivo.....	115
Figure 29: Les voies d'import des protéines vers la mitochondrie.....	116
Figure 30: La translocation des pré-protéines et l'analyse de l'expression de MAGMAS dans les souches de levures.....	117
Figure 31: Analyse morphologique par Microscopie Electronique des différentes souches de levures.....	119
Figure 32: Profil normal des ARN ribosomiaux des différentes souches de levures .....	120
Figure 33: Résultats de l'étude de liaison de la famille C, réalisée à l'aide du kit d'Affymetrix 250K NspI et analysée le logiciel EasyLinakge et HomozygosityMapper.....	122
Figure 34: Haplotype de la région d'intérêt de la famille C localisée sur le chromosome 2.....	124
Figure 35: Haplotype de la région d'intérêt de la famille C localisée sur le chromosome 7.....	125
Figure 36: Haplotype de la région d'intérêt de la famille C localisée sur le chromosome 19....	126
Figure 37: Variations sélectionnées au niveau des régions d'homozygotie.....	127
Figure 38: Résultats de l'étude de liaison de la famille D, réalisée à l'aide du kit d'Affymetrix 250K NspI et analysée le logiciel EasyLinakge et HomozygosityMapper.....	131
Figure 39: Ségrégation de la mutation p.Arg272Cys avec la mutation dans la famille E.....	134
Figure 40: L'organisation structurale de MAGMAS.....	141
Figure 41: Le récepteur ROR2.....	151

## Liste des tableaux

Tableau 1: Les fréquences génotypiques selon le type de population.....	35
Tableau 2: Le programme utilisé pour la réaction de PCR.....	76
Tableau 3 : Le programme utilisé pour la réaction de séquence.....	78
Tableau 4: Le programme utilisé pour l'amplification par PCR de microsatellites lors de notre étude.....	80
Tableau 5 : Le programme utilisé pour la PCR de la mutagenèse.....	95
Tableau 6 : Le programme utilisé pour la réaction de séquence pour la vérification de la mutagenèse.....	98
Tableau 7 : Les souches de levures et les plasmides utilisés.....	100
Tableau 8 : Liste des variations génomiques homozygotes sélectionnées du séquençage des exomes des patients AP2 et BP2.....	111
Tableau 9 : Variations homozygotes sélectionnées du séquençage de l'exome de CP1.....	128
Tableau 10 : Liste des variations homozygotes sélectionnées après le filtrage des résultats du séquençage de l'exome de DP1.....	132
Tableau 11 : Comparaison clinique entre les patients portant une mutation du domaine CRD..	136



# **I- Etude Bibliographique**

# **1. Les Dysplasies Osseuses**

« Un médecin combat les effets d'une maladie en recherchant les causes » Alphonse Karr

## **1.1. Généralités**

Les dysplasies osseuses ou ostéochondrodysplasies constituent un groupe hétérogène de maladies rares qui affectent le système squelettique et se différencient par leurs caractéristiques cliniques, radiologiques et physiopathologiques. Les chondrodysplasies, caractérisées par un retard statural et des déformations osseuses de différents degrés, représentent une forme de dysplasies osseuses en relation avec un défaut du processus d'ossification endochondrale, processus responsable de la croissance des os longs (Rimoin et al., 2007). Certaines dysplasies osseuses sont en rapport avec une anomalie des ostéoblastes ou des ostéoclastes, c'est le cas des maladies ostéolytiques et des maladies osseuses condensantes. D'autres sont liées à un développement anarchique du tissu cartilagineux, comme la maladie des exostoses multiples. A ce groupe d'affections osseuses généralisées, s'ajoutent les dysostoses qui sont des atteintes d'un ou de plusieurs os souvent associées, dans le cadre d'un syndrome malformatif, à d'autres anomalies (Warman et al., 2011).

## **1.2. L'épidémiologie des dysplasies osseuses**

Suite à une étude épidémiologique conduite entre les années 1978 et 1983 en Amérique latine, l'incidence des dysplasies osseuses a été estimée à 2,3 cas pour 10,000 naissances (Orioli et al., 1986). Une autre étude menée par Stoll et ses collègues entre les années 1979 et 1986 avait rapporté une incidence de 3,2 cas pour 10,000 naissances à Strasbourg en France (Stoll et al., 1989). En 1996, Bassett a estimé l'incidence globale des dysplasies osseuses à 1 cas pour 3,000-5,000 naissances (Sponseller, 2001). Les dysplasies osseuses les plus fréquentes sont : l'achondroplasie, l'ostéogenèse imparfaite et la maladie exostosante (Orioli et al., 1986)

### 1.3. Classification des dysplasies osseuses

Depuis les années 60, un grand nombre de dysplasies osseuses ont été décrites sur la base de leurs manifestations cliniques et radiologiques. La contribution du Professeur P. Maroteaux dans l'individualisation d'un nombre important de ces maladies a été marquante (Maroteaux, 1982). En 1970, la première classification internationale a été établie (1970; McKusick and Scott, 1971). Elle a été par la suite soumise à plusieurs révisions (1978; Spranger, 1992; 1983). L'identification des bases moléculaires de certaines dysplasies osseuses a conduit à proposer l'établissement, en 1997, d'une classification moléculaire (1998) et à l'introduction, en 2001, du terme de « nosologie » qui représente un catalogue des entités définies sur des critères cliniques, radiographiques et moléculaires (Hall, 2002). Cette nosologie est révisée tous les 4 ans lors du congrès international des dysplasies osseuses (ISDS pour *The International Skeletal Dysplasia Society*) (Superti-Furga and Unger, 2007). La dernière version, publiée en 2010, reconnaît 456 entités réparties en 40 groupes (Warman et al., 2011). Les groupes 1 à 8 comportent les dysplasies qui sont dues à des mutations du même gène ou de la même voie de signalisation. Les groupes 9 à 17 rassemblent les entités classifiées selon la structure osseuse affectée (épiphyses, métaphyses, diaphyses, vertèbres) ou le segment (rhizo, méso ou acro) impliqué. Les groupes 18 à 20 se distinguent par des signes cliniques spécifiques. Les groupes 21 à 26 et le groupe 28 sont associés à des anomalies de minéralisation de la matrice osseuse (l'état de minéralisation, la densité osseuse et l'ostéolyse). Le groupe 27 comprend les maladies lysosomales associées à des atteintes osseuses. Le groupe 29 comporte des entités caractérisées par un développement anarchique des structures squelettiques. Les groupes 30 et 31 correspondent respectivement aux groupes des avances staturales, et celui des ostéoarthrites et des inflammations d'origine génétique. Finalement, les groupes 32 à 40 sont consacrés aux dysostoses (Warman et al., 2011).

## 1.4. Les bases moléculaires des dysplasies osseuses

A ce jour, plus de 230 gènes responsables d'environ 450 maladies osseuses constitutionnelles ont été identifiés. Ces bases moléculaires ont démontré une très grande variabilité clinique au sein d'une même entité. Ainsi, des mutations du *COL2A1* (Collagen, type II, alpha 1) [MIM 120140] codant pour la chaîne alpha-1 du collagène de type II, entraînent différentes dysplasies osseuses allant d'une forme modérée, le syndrome de Stickler [MIM 609508] à une atteinte osseuse létale, l'achondrogenèse de type II [MIM 200610]. De même, des mutations du gène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) [MIM 134934], qui code pour un récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes, sont à l'origine de la dysplasie thanatophorique [MIM 187600], du syndrome de SADDAN [MIM 134934], de l'achondroplasie [MIM 100800] ou de l'hypochondroplasie [MIM 146000] (Rimoin et al., 2007; Zelzer and Olsen, 2003). Nous pouvons également citer *FBNI* (Fibrillin 1) [MIM 134797] qui code pour la fibrilline 1 et est à l'origine de phénotypes osseux divers, voire opposés, dont le syndrome de Marfan [MIM 154700] caractérisé par une avance staturale et les dysplasies gélophysiques [MIM 614185] et acromicriques [MIM 102370] caractérisées par un retard statural. Par ailleurs, des phénotypes osseux similaires peuvent résulter de mutations dans différents gènes. Ainsi, les dysplasies multi-épiphysaires peuvent être dues à des mutations de 6 gènes différents (Rimoin et al., 2007). Les corrélations de type génotype-phénotype ne sont pas toujours clairement établies.

La découverte des bases moléculaires d'un nombre important de dysplasies osseuses a montré la diversité des protéines impliquées dans les phénomènes d'ossification, parmi lesquelles i) les protéines structurales de la matrice extracellulaire, ii) les protéines des voies de signalisation, iii) les protéines impliquées dans le repliement et la dégradation des macromolécules, iv) les facteurs de transcription, v) les oncogènes et les suppresseurs des tumeurs et vi) les protéines du métabolisme et de l'épissage des acides nucléiques (Superti-Furga et al., 2001).

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans des dysplasies osseuses contribue à la compréhension des processus d'ossification.

## **2. Le Système Squelettique**

Sa structure, son développement et son maintien.

Formé par les tissus osseux et cartilagineux, le système squelettique humain constitue la charpente de l'anatomie qui soutient le corps, permet le mouvement et protège les organes internes vitaux. Il est constitué du squelette axial (comportant la colonne vertébrale, le crâne, les os de la face et ceux de la cage thoracique) et du squelette appendiculaire (composant les membres inférieurs et supérieurs). Il s'agit d'une structure complexe qui comporte 206 os articulés dont 204 os squelettiques (os longs, courts, plats et irréguliers) et 2 os sésamoïdes (Ramé and Théron, 2006).

## **2.1. Les caractéristiques du tissu osseux**

### **2.1.1. L'organisation structurale de l'os (Figure 1)**

#### **2.1.1.1. La structure primaire de l'os**

La structure de l'os dépend de son type; on distingue :

##### **2.1.1.1.1. Le tissu osseux non lamellaire ou fibrillaire**

Le tissu osseux non lamellaire est un tissu mécaniquement très fragile caractérisé par des fibres de collagène entrecroisées et de calibre inégal, une matrice peu minéralisée et des ostéocytes volumineux et nombreux. Il s'agit d'un tissu immature et provisoire retrouvé chez le fœtus ou dans des cas pathologiques tels que les cals de fracture, les tumeurs ostéogéniques et les ossifications ectopiques. C'est le type de tissu qui est formé en premier mais qui disparaît au fur et à mesure de la maturation des pièces osseuses pour être remplacé par le tissu osseux lamellaire.

##### **2.1.1.1.2. Le tissu osseux lamellaire**

Le tissu osseux lamellaire est un tissu mécaniquement très solide constitué par des ostéocytes ovoïdes et des fibres de collagène organisées en lamelles parallèles de 3 à 7 $\mu$ m d'épaisseur chacune. Il s'agit du tissu osseux mature ou adulte caractérisé par sa structure très régulière (Marie, 1992; Thomas et al., 2008)

### **2.1.1.2. La structure secondaire de l'os lamellaire**

L'organisation architecturale particulière des tissus osseux lamellaires permet de distinguer deux types :

#### **2.1.1.2.1. L'os cortical ou compact**

L'os cortical représente environ 80% du squelette humain; il forme la diaphyse des os longs et la couche externe de la majorité des os. Sa structure est dense et massive, constituée par la juxtaposition de nombreuses ostéones, également connues par « systèmes de Havers ». Il s'agit de systèmes cylindriques formés par des lamelles concentriques centrées autour d'un canal « le canal de Havers » renfermant un vaisseau sanguin et une fibre nerveuse amyélinique. Ce canal est orienté parallèlement à l'axe de la diaphyse dans le cas des os longs. Les différentes ostéones sont reliées entre elles par des canaux transversaux de Volkmann. Des lamelles arciformes s'interposent entre les ostéones pour combler l'espace.

#### **2.1.1.2.2. L'os trabéculaire ou spongieux**

L'os trabéculaire, représentant 20% du squelette humain, se trouve au niveau des corps vertébraux, des épiphyses et des métaphyses des os longs et au niveau des os plats et des os courts. Ce type de tissu osseux lamellaire est caractérisé par un réseau tridimensionnel complexe où les travées osseuses (ou spicules) s'anastomosent entre elles délimitant des cavités contenant la moelle osseuse. L'unité de base dans ce cas est « l'hémiostéon » qui a la forme d'un croissant ouvert vers la moelle. Les tissus adipeux et hématopoïétiques, entourant les travées osseuses, facilitent les échanges entre le tissu osseux et les liquides interstitiels.

Le périoste est une membrane double qui entoure et protège la structure externe de l'os; l'endoste est une fine membrane qui recouvre les travées de l'os spongieux en tapissant les canaux qui traversent l'os compact.

La matrice osseuse ainsi que les cellules qui forment ces deux types de tissus sont les mêmes mais l'organisation architecturale spécifique de chacun de ces deux types leur confère des fonctions différentes. En effet, l'os cortical est reconnu pour sa fonction mécanique et son habilité à protéger les organes internes alors que l'os spongieux joue un rôle dans la régulation des échanges métaboliques notamment dans l'homéostasie phosphocalcique (Marie, 1992; Thomas et al., 2008).

### **2.1.2. L'anatomie d'un os long**

Un os long est constitué de trois parties :

#### **2.1.2.1. La diaphyse :**

Elle correspond à la partie centrale de l'os. Elle est constituée du tissu osseux compact enveloppant le canal médullaire qui contient de la moelle jaune.

#### **2.1.2.2. Les métaphyses :**

Elles sont les parties intermédiaires reliant la diaphyse aux épiphyses. Les métaphyses sont le siège du cartilage de croissance ou cartilage de conjugaison qui est responsable de la croissance en longueur de l'os.

#### **2.1.2.3. Les épiphyses :**

Elles représentent les extrémités élargies et arrondies de l'os long renfermant la moelle rouge osseuse. Elles sont formées du tissu osseux spongieux entouré du tissu compact (Martini et al., 2012).

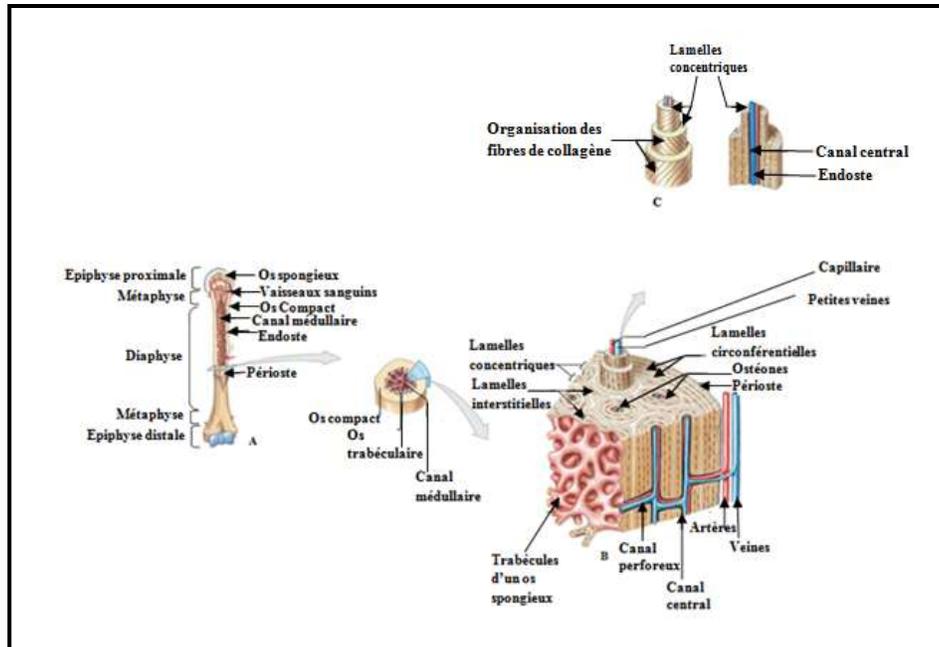


Figure 1: Organisation structurale de l'os. (A) Structure d'un os long. (B) Structure microscopique de l'os compact. (C) Schéma d'un ostéon. Extrait et modifié de Pearson – Human Anatomy, 7ème édition.

### 2.1.3. La composition de l'os

L'os est formé par les cellules osseuses et la matrice extracellulaire (MEC) qui est élaborée par les cellules ostéoformatrices.

#### 2.1.3.1. Les cellules osseuses

Le tissu osseux est un tissu vivant en renouvellement constant. On distingue les cellules ostéoformatrices et les ostéoclastes.

##### 2.1.3.1.1. Les cellules ostéoformatrices

Les cellules ostéoformatrices dérivent des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes. Selon leurs états fonctionnels, on distingue : les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes de l'os.

a. Les ostéoblastes:

Il s'agit de cellules mononucléées de forme cuboïdales avec une extrémité supérieure arrondie. Les ostéoblastes matures sont chargés de synthétiser la fraction organique de la MEC (ou tissu ostéoïde), de participer à sa minéralisation et de réguler le remodelage osseux en contrôlant l'ostéoclastogenèse qui est la différenciation des cellules ostéorésorbantes [I-28 et bone biology]. Ces cellules sont reliées entre elles et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes. En fonction de son degré d'activation, un ostéoblaste peut se différencier en un ostéocyte incorporé dans la MEC ou passer à un état de repos réversible en devenant une cellule bordante (Marie, 1992; Thomas et al., 2008).

b. Les ostéocytes:

Les ostéocytes sont des cellules aplaties et étoilées. Il s'agit d'une fraction d'environ un dixième des ostéoblastes matures qui se différencient et deviennent entièrement entourés par la MEC minéralisée. Ces cellules siègent au sein de logettes dites « ostéoplastes » d'où partent des canalicules anastomosées formant un réseau qui relie les ostéocytes entre eux et aux cellules de la surface (ostéoblastes et cellules bordantes). Bien qu'ils soient moins actifs que les ostéoblastes, les ostéocytes gardent toujours la propriété de synthétiser certaines protéines maintenant ainsi la MEC autour d'eux. De plus, ils jouent un rôle crucial dans l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme (Paquet, 2011; Thomas et al., 2008).

c. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des cellules aplaties et ovalaires tapissant la surface de la majorité des os de l'adulte. Il s'agit des ostéoblastes qui entrent dans une phase de repos réversible, formant ainsi une source de cellules ostéoblastiques de réserve capables de s'activer sous l'action de certains stimuli. Ces cellules jouent aussi un rôle de protection de la MEC et de modulation de l'activité résorbante des ostéoclastes (Paquet, 2011; Thomas et al., 2008).

#### 2.1.3.1.2. Les cellules ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules volumineuses multi-nucléées dérivant de la fusion de précurseurs d'origine hématopoïétique, suite à leur contact avec les cellules stromales préostéoblastiques. Une fois activés, les ostéoclastes sécrètent des acides organiques et des enzymes qui dégradent la matrice organique minéralisée assurant ainsi la résorption osseuse et formant des lacunes appelées « lacunes de Howship » (Paquet, 2011; Thomas et al., 2008).

#### 2.1.3.2. La matrice extracellulaire osseuse

La matrice extracellulaire occupe 92 à 95% du volume du tissu osseux. Elle est constituée d'une phase organique qui forme l'armature sur laquelle se dépose une phase minérale représentant 70 à 90% de cette matrice. La rigidité et la résistance mécanique de l'os lui sont conférées par la matrice minérale alors que son élasticité et sa flexibilité sont dues à la phase organique (Clarke, 2008).

##### 2.1.3.2.1. La phase organique de la MEC ou « ostéoïde »

La matrice osseuse organique est formée de protéines fibrillaires, structurales (collagène, élastine et fibrilline) ou adhérentes (fibronectine), de protéines non fibrillaires (protéoglycanes, glycosaminoglycanes et des petite protéines non collagéniques) ainsi que de faibles quantités de liquides.

Les protéines collagéniques, notamment le collagène de type I, sont les constituants majeurs de l'ostéoïde. Elles représentent environ 90% de la matrice organique et jouent un rôle essentiel dans l'organisation structurale du tissu osseux. Il s'agit d'une grande famille de protéines multimériques dont l'unité structurale est le tropocollagène qui forme une triple hélice de chaînes polypeptidiques. L'organisation particulière de ces dernières en une structure hélicoïdale complexe dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels les modifications post-traductionnelles qu'elles subissent, notamment la glycosylation et l'hydroxylation de résidus proline ou lysine. Cinq molécules de tropocollagènes sont arrangées en une microfibrille ordonnée qui forme l'unité de structure d'une fibrille. Une fibre de collagène est

ensuite constituée par l'assemblage de plusieurs fibrilles. Le déploiement des fibres de collagène d'une manière spécifique a des effets directs sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules osseuses (Thomas et al., 2008; Young, 2003). Aux fibres collagéniques s'associent des protéines non collagéniques secrétées par les ostéoblastes (comme l'ostéocalcine) ainsi que des protéines plasmatiques et des facteurs de croissance. Outre leur contribution dans l'organisation de la matrice osseuse, ces protéines sont impliquées dans divers mécanismes de la physiologie osseuse notamment les processus de minéralisation, le chimiotactisme cellulaire, etc... (Thomas et al., 2008).

#### 2.1.3.2.2. La phase minérale de la MEC

La phase minérale de la MEC osseuse est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite de calcium  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  ainsi que de faibles quantités de phosphates, carbonates et magnésium. La disponibilité de concentrations adéquates en minéraux ainsi que l'existence, au niveau des fibres de collagène, de sites de nucléation permettent la minéralisation de la matrice. La maturation de la matrice est associée à l'expression, par les ostéoblastes, de la phosphatase alcaline ainsi que des protéines non collagéniques (l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse II) qui régulent la quantité et la taille des cristaux d'hydroxyapatite de calcium formés, contrôlant ainsi la disposition de minéraux au niveau de la matrice osseuse (Clarke, 2008; Thomas et al., 2008).

## 2.2. Le développement embryonnaire du squelette

Le squelette est un système complexe qui se développe à partir du mésenchyme notamment du mésoderme para-axial (ou somites), du mésoderme de la plaque latérale ainsi que de la crête neurale (Langman, 1994). D'autre part, les ostéoclastes (ou cellules responsables de la résorption osseuse) dérivent de la lignée hématopoïétique (cf. Paragraphe I-4-le remodelage osseux) (Karsenty, 2001). La

formation des diverses pièces squelettiques consiste en une étape de morphogenèse, comportant la migration et la condensation des cellules mésenchymateuses, suivie d'une étape d'organogenèse correspondant à la différenciation des précurseurs mésenchymateux (en ostéoblastes ou en chondrocytes) et à la formation du squelette (Johnson and Tabin, 1997; Olsen et al., 2000). Les gènes impliqués dans la morphogenèse régulent la migration et la détermination cellulaire. Il s'agit des gènes codant pour des facteurs de transcription (notamment ceux appartenant aux familles Hox (pour Homeobox) et Pax (pour Paired box)) ou des protéines de signalisation (tels que les membres de la superfamille du facteur de croissance TGF $\beta$  (pour Transforming Growth Factor beta)) (Mundlos and Olsen, 1997). La régulation de l'organogenèse fait intervenir des facteurs transcriptionnels, des facteurs de signalisation ainsi que des protéines de la MEC. Ainsi, les cellules mésenchymateuses condensées se différencient en chondrocytes ou en ostéocytes selon l'intensité du signal de la voie Wnt/ $\beta$ caténine qu'elles subissent (Figure 2) (Bonaventure and Silve, 2005).

Le développement du squelette commence à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine embryonnaire. De part et d'autre du tube neural, le mésoderme para-axial forme une série de blocs; il s'agit des somites (à partir de la région occipitale en direction caudale) et des somatomères (dans la région céphalique). Les premiers se différencient dorsalement en dermo-myotome et ventralement en sclérotome qui forme le tissu conjonctif embryonnaire ou mésenchyme. Les cellules mésenchymateuses vont ensuite migrer pour acquérir leurs positions ultimes puis se condenser en précurseurs osseux ou cartilagineux formant le rachis, les côtes et la vertèbre définitive (Langman, 1994; Olsen et al., 2000; Ornitz and Marie, 2002). Le mésoderme para-axial est également à l'origine des os pariétaux, des os temporaux (à l'exception de l'os squamosal) et de l'os occipital (Cohen, 2006; Erlebacher et al., 1995). Par ailleurs, les cellules de la crête neurale dans la région céphalique se différencient en cellules mésenchymateuses formant les os de la face et l'os frontal. Le mésoderme latéral, quant à lui, est à l'origine du squelette appendiculaire. Les bourgeons des membres apparaissent sous forme d'évaginations de la paroi

ventrolatérale du corps. Ils dérivent de la lame latérale notamment de la somatopleure intra-embryonnaire et forment l'os et les parties molles du membre. Certaines cellules, provenant des somites, migrent également vers les bourgeons des membres pour former les nerfs, les vaisseaux sanguins et les muscles (Langman, 1994; Olsen et al., 2000; Ornitz and Marie, 2002).

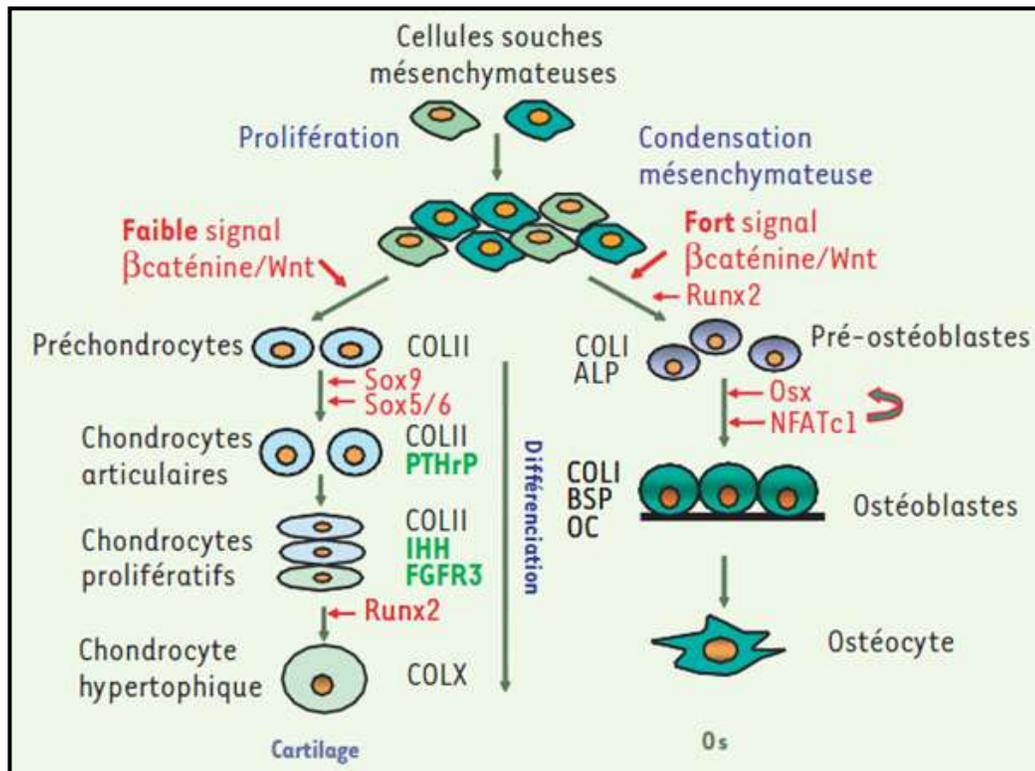


Figure 2 : La régulation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en lignées ostéoblastiques ou chondrocytaires (Bonaventure et Silve, 2005).

### 2.3. L'ostéogenèse

L'ostéogenèse, ou le processus de formation de l'os, se déroule, durant le développement embryonnaire, selon deux mécanismes distincts : l'ossification membranaire ou endoconjonctive et l'ossification endochondrale (Karsenty et al., 2009; Olsen et al., 2000).

### **2.3.1. L'ossification membranaire ou endoconjonctive**

L'ossification membranaire donne naissance aux os plats, notamment ceux de la face, du calvarium et d'une partie de la clavicule. Elle participe également à la croissance radiale des os longs (Cohen, 2006; Karsenty et al., 2009). Selon ce type d'ossification, l'os se développe par la différenciation directe des cellules mésenchymateuses embryonnaires qui, après condensation, se transforment en ostéoblastes, établissant ainsi un centre d'ossification au niveau de la membrane fibreuse du tissu conjonctif. Les ostéoblastes ainsi formés commencent à synthétiser la matrice osseuse ou « ostéoïde » et participent à sa minéralisation. Ces cellules, entièrement entourées par la MEC minéralisée, s'aplatissent et se transforment en ostéocytes. Les différents centres d'ossification s'étendent puis fusionnent pour générer un réseau de travées osseuses entourant les vaisseaux sanguins. L'os fibreux ainsi formé sera ensuite résorbé et remplacé par l'os lamellaire spongieux à la surface duquel, les cellules mésenchymateuses se condensent en périoste. Les trabécules sous-jacentes à ce dernier s'épaississent pour former une surface osseuse compacte entourant l'os spongieux (Martini et al., 2012).

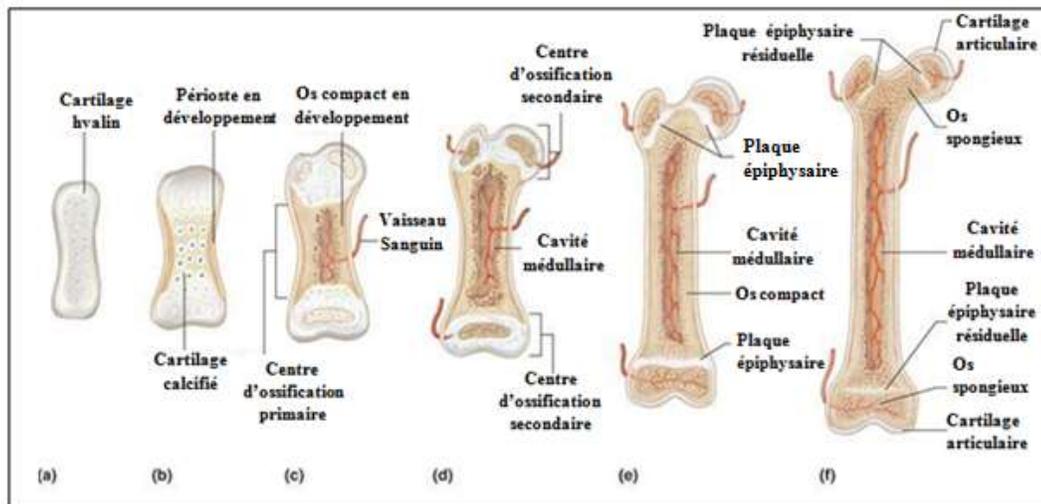
### **2.3.2. L'ossification endochondrale**

L'ossification endochondrale est le processus par lequel se forme la majorité des éléments squelettiques de l'organisme. Elle concerne les os longs, les vertèbres et quelques os de la base du crâne. L'ossification endochondrale est également responsable de la croissance en longueur des os (Karsenty et al., 2009). Il s'agit d'un mécanisme complexe, extrêmement régulé, par le biais duquel l'os sera formé à partir d'une matrice cartilagineuse (Mackie et al., 2008). L'ossification endochondrale consiste donc en une étape de chondrogenèse suivie d'une étape d'ostéogenèse. Au cours du développement embryonnaire, notamment au jour embryonnaire E10,5, l'ébauche du squelette adulte est déjà établi, la majorité des cellules mésenchymateuses est condensée. Ces cellules synthétisent la MEC,

constituée de collagène de type I, puis se différencie en chondrocytes produisant la nouvelle matrice qui est composée de collagène de type II et d'aggrécane (Karsenty et al., 2009). Ce dernier est un protéoglycane qui joue un rôle dans la protection des fibrilles de collagène et la résistance de la matrice à la compression. L'aggrécane est également impliqué dans la signalisation de divers facteurs de croissance (Karsenty et al., 2009; Koziel et al., 2004; Ornitz, 2000; Settembre et al., 2008). En parallèle, les cellules situées à la périphérie des condensations mésenchymateuses restent non différenciées, continuent à produire du collagène de type I et forment le périoste. Le modèle cartilagineux ainsi élaboré est ensuite envahi, au niveau de son centre puis au niveau de chacune de ses deux extrémités, par un ensemble de cellules, constituant, respectivement, les centres d'ossification primaire et secondaires (Mackie et al., 2008). En effet, vers le jour E13,5, les chondrocytes localisés au centre des condensations mésenchymateuses arrêtent de proliférer, s'allongent et se transforment en chondrocytes préhypertrophiques. Ces derniers produisent toujours du collagène de type II jusqu'à ce qu'ils s'hypertrophient (Karsenty et al., 2009). Une fois hypertrophiés, les chondrocytes commencent à synthétiser du collagène de type X et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Le collagène X, exclusivement produit par les chondrocytes hypertrophiques, favorise la minéralisation de la MEC entourant ces cellules (Iyama et al., 1991; Linsenmayer et al., 1991). VEGF, quant à lui, est un facteur angiogénique induisant le développement de vaisseaux sanguins, à partir du périoste. Ce dernier se transforme alors en périoste vascularisé, en dessous duquel, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes. Le périoste assure la croissance en largeur et la consolidation de l'os en cas de fractures (Gerber et al., 1999). La vascularisation du centre d'ossification primaire permet de transporter, à son niveau, des cellules ostéoprogénitrices et hématopoïétiques. Les chondrocytes hypertrophiques subissent ensuite la mort cellulaire par une voie apoptotique, libérant ainsi un espace vide qui sera envahi par des vaisseaux sanguins. A partir des cellules ostéoprogénitrices transportées, les ostéoblastes se forment, s'accumulent autour des cavités créées et produisent la MEC osseuse qui est riche en collagène I. Au niveau

de cette zone, désignée par « la spongieuse primaire », l'os trabéculaire, élaboré dans un premier temps, sera résorbé par les ostéoclastes. Il formera la région interne de l'os mature (cavité médullaire entourée du tissu osseux spongieux résiduel) et sera remplacé, dans un second temps, par l'os lamellaire (Karsenty et al., 2009).

De nouveaux centres d'ossification (centres d'ossifications secondaires) sont créés, durant la période périnatale, grâce à l'invasion des épiphyses par les vaisseaux sanguins. L'ossification épiphysaire qui en résulte est semblable à l'ossification primaire mais n'aboutit pas à la formation d'une gaine externe pareille au périoste ni à une cavité médullaire. Les centres d'ossification s'étendent pour remplacer presque la totalité du cartilage hyalin qui ne persiste à la fin qu'à deux niveaux : à la surface de l'épiphyse constituant le cartilage articulaire et au niveau de la métaphyse constituant le cartilage de conjugaison ou la plaque de croissance épiphysaire cartilagineuse (Figure 3) (Cohen, 2006; Karsenty et al., 2009). L'organisation spatiale des chondrocytes diffère selon le type de cartilage (Byers and Brown, 2006)



**Figure 3: Le mécanisme d'ossification endochondrale** a) Les cellules mésenchymateuses se condensent pour former la matrice cartilagineuse. (b) Le périoste se développe à partir des cellules situées à la périphérie des condensations mésenchymateuses. Au niveau du centre, les chondrocytes arrêtent de proliférer, s'allongent et s'hypertrophient puis sécrètent le collagène X qui facilite la minéralisation de la matrice. (c) Formation du centre d'ossification primaire : invasion de la cavité centrale par les vaisseaux sanguins transportant des précurseurs ostéoblastiques. En dessous du périoste vascularisé, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes. (d) Formation de la cavité médullaire et apparition des centres d'ossification secondaires. (e) Ossification des épiphyses. Les centres d'ossification s'étendent pour remplacer presque la totalité du cartilage hyalin sauf pour le cartilage articulaire et le cartilage de conjugaison ou la plaque de croissance épiphysaire. (f) Les chondrocytes continuent à proliférer et assurent la croissance en longueur de l'os jusqu'à la soudure de la

## 2.4. La croissance de l'os

### 2.4.1. La croissance en largeur ou appositionnelle

Ce type de croissance est assuré par les ostéoblastes profonds du périoste qui déposent des couches successives d'os lamellaire permettant une croissance transversale de l'os. Parallèlement à ce dépôt osseux, il y a accroissement du canal médullaire grâce à une destruction de la matière osseuse par des ostéoclastes (Orwoll, 2003).

## **2.4.2. La croissance en longueur**

Depuis le stade embryonnaire et jusqu'au début de la vie adulte, les os ont la capacité de croître en longueur par un mécanisme d'ossification endochondrale possible grâce à l'existence de la plaque de croissance épiphysaire. Cette dernière constitue une zone cartilagineuse en prolifération active, dont la hauteur est proportionnelle au taux de croissance (Mundlos and Olsen, 1997).

Différents gènes, contribuant au maintien et à la régulation de la plaque de croissance, sont impliqués dans des dysplasies osseuses. D'où, la connaissance de l'organisation et de la fonction de la plaque cartilagineuse permet une meilleure compréhension des bases moléculaires de ces dysplasies et facilite l'élucidation de leurs mécanismes physiopathologiques (Alman, 2008).

### **2.4.2.1. Histophysiologie de la plaque de croissance**

Il s'agit d'une structure complexe localisée au niveau intermédiaire entre chacun des deux noyaux d'ossification secondaires et la diaphyse. La plaque de croissance assure la croissance en longueur de l'os. Sa soudure témoigne de l'arrêt de la croissance osseuse; son observation, par radiographie, permet de déterminer « l'âge osseux » d'un individu (George et al., 2012). Elle est organisée en plusieurs zones cellulaires, correspondant aux différents stades de développement chondrocytaire, et distinguées selon la composition de la matrice cartilagineuse, la forme, le nombre et la fonction des cellules qui les constituent (Figure 4). Des études ultrastructurales ont montré l'existence, au niveau des plaques de croissance, de deux populations de chondrocytes post-prolifératifs, « clairs » et « sombres », qui sont distinguées selon le niveau d'expression de gènes différents (Ahmed et al., 2007). La structure bien agencée de la plaque de croissance reflète le haut niveau de régulation du développement de chaque chondrocyte. On distingue : la zone de réserve, la zone proliférative, hypertrophique et la zone du cartilage calcifié et d'invasion vasculaire (Karsenty et al., 2009; Mackie et al., 2008, 2011).

#### 2.4.2.1.1. La zone de réserve

Située au niveau le plus distal du centre d'ossification primaire, la zone de réserve constitue la zone du cartilage hyalin quiescent qui assure la maintenance et le renouvellement du tissu cartilagineux en prolifération active. Elle est constituée de petites cellules, peu nombreuses, dispersées aléatoirement dans une MEC dense et caractérisées par une production importante de collagène du type IIB et des protéoglycanes (Abad et al., 2002; Burdan et al., 2009). Les cellules de cette zone sont également capables de synthétiser des morphogènes dont l'un oriente l'alignement des chondrocytes prolifératifs en colonnes parallèles à l'axe de l'os et l'autre inhibe la différenciation terminale des chondrocytes prolifératifs. Outre son rôle comme une source de chondrocytes, cette zone est donc responsable de l'organisation de la plaque de croissance en différentes zones (Abad et al., 2002).

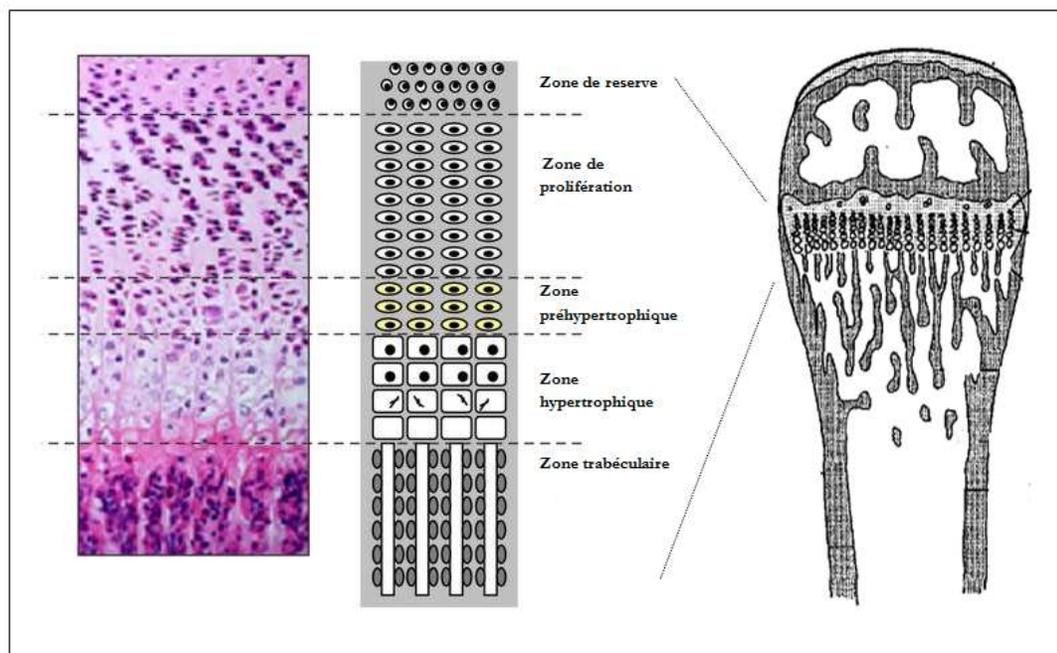
#### 2.4.2.1.2. La zone proliférative

La deuxième couche de la plaque de croissance consiste en une zone proliférative qui est constituée de chondrocytes aplatis, bien répartis en colonnes longitudinales parallèles à l'axe principal de l'os. A la base de ces colonnes, les cellules présentent un fort potentiel mitotique; une cellule souche provenant de la zone de réserve se divise en deux cellules filles qui, à leurs tours, se multiplient en formant des empilements de cellules orientées en colonnes. La croissance longitudinale de l'os est en relation directe avec la hauteur de cette zone qui, à son tour, dépend du taux de prolifération cellulaire. Cette zone est caractérisée par une synthèse importante de collagène du type II et de type XI (Ballock and O'Keefe, 2003; Burdan et al., 2009).

#### 2.4.2.1.3. La zone hypertrophique

Cette couche correspond à la zone de maturation ou de transformation chondrocytaire. Elle est constituée de deux niveaux cellulaires dont l'un est formé de

cellules pré-hypertrophiques et l'autre de cellules hypertrophiques. Au fur et à mesure de la différenciation des chondrocytes préhypertrophiques en hypertrophiques, les changements phénotypiques des cellules deviennent de plus en plus marquants jusqu'à leur dégénérescence au stade terminal de leur différenciation. Au niveau de cette zone, les chondrocytes arrêtent de proliférer, deviennent arrondies, augmentent de volume et commencent à produire la phosphatase alcaline, la métalloprotéinase MMP13 ainsi que des quantités importantes de différents éléments de la MEC. Ils perdent leurs jonctions intercellulaires et logent dans des vésicules formées par la MEC. Cette zone est caractérisée par la présence exclusive de courtes chaînes de collagène, le collagène de type X qui est produit par les chondrocytes au dépend du collagène de type II (Ballock and O'Keefe, 2003; Burdan et al., 2009; Pacifici et al., 1990).



**Figure 4:** Coupe histologique d'une plaque de croissance d'une souris adulte avec une représentation schématique des zones de différenciation tissulaire. Les différentes zones reflètent les niveaux de différenciation cellulaire. Extrait et modifié de (Erlebacher et al., 1995; Piróg and Briggs, 2010).

#### 2.4.2.1.4. La zone du cartilage calcifié

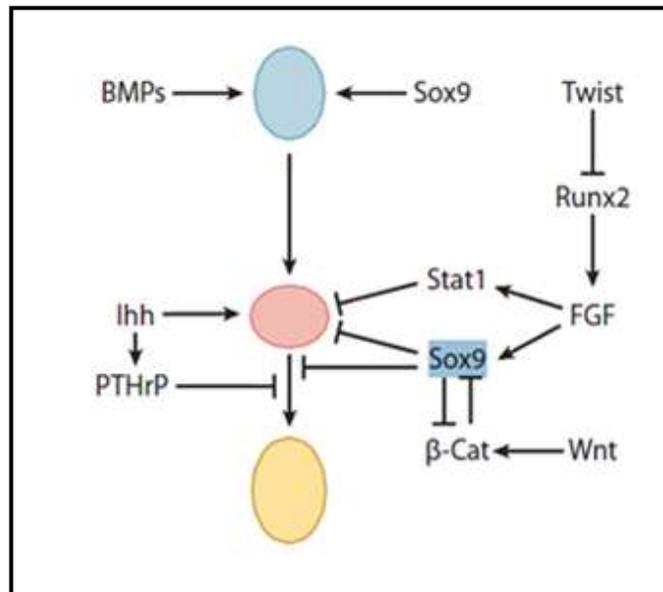
Au stade terminal de différenciation chondrocytaire, la MEC se minéralise puis se dégrade sous l'action des métalloprotéinases et des vésicules riches en phosphatase alcaline sécrétées par les chondrocytes hypertrophiques. Ces derniers expriment des constituants de la matrice osseuse puis meurent, libérant des cavités vides qui seront envahies par un bourgeon conjonctivo-vasculaire riche en cellules provenant du front d'ossification. Les ostéoclastes transportés participent à la dégradation de la matrice alors que les ostéoblastes différenciés déposent du tissu osseux sur les résidus matriciels, permettant ainsi une croissance en longueur de l'os (Ballock and O'Keefe, 2003; Burdan et al., 2009).

#### 2.4.2.2. La régulation de l'ossification endochondrale

Le taux de croissance osseuse longitudinale est lié à deux facteurs : la prolifération des cellules en colonnes et le volume moyen des chondrocytes hypertrophiques (Kember and Walker, 1971). Le processus d'ossification endochondrale, qui est responsable de cette croissance, est un mécanisme complexe, extrêmement contrôlé. Sa dérégulation entraîne un spectre large de dysplasies osseuses. L'établissement du mécanisme physiopathologique d'un nombre important de ces dysplasies a donc permis une meilleure compréhension de ce processus physiologique et une élucidation de divers éléments qui participent à sa régulation (Zelzer and Olsen, 2003).

Différents médiateurs et facteurs locaux et systémiques interagissent pour réguler l'activité des chondrocytes de la plaque de croissance notamment leur prolifération, la modification de leur morphologie ainsi le renouvellement de la matrice extracellulaire qu'ils produisent (Farquharson and Jefferies, 2000). Parmi lesquels, on distingue les facteurs de croissance notamment ceux de la superfamille de TGF $\beta$ , de la famille des FGF (Fibroblast-Growth Factors), les glycoprotéines Wnt (Wingless) et les facteurs locaux PTHrP (Parathyroïde Hormone Related Protein) et IHH (Indian Hedge Hog) ainsi que les facteurs de transcription, en particulier, SOX

9 (Sry Box Containing Protein 9) et RUNX2 (Runt-Related Protein 2) (Figure 5)  
(Alman, 2008; Karsenty et al., 2009; Kronenberg, 2003; Olsen et al., 2000).



**Figure 5: La régulation de l'ossification endochondrale par différents facteurs de transcription et voies de signalisation (Karsenty et al., 2009).**

#### 2.4.2.2.1. Les facteurs de transcription

##### a. SOX 9

Exprimé au niveau des cellules mésenchymateuses et des chondrocytes prolifératifs, SOX9 est essentiel pour la différenciation chondrocytaire initiale à partir des précurseurs mésenchymateux. De plus, ce facteur de transcription stimule l'expression de plusieurs éléments de la matrice cartilagineuse, tels que le collagène de type II, le collagène de type XI et l'aggrécan qui sont des marqueurs des chondrocytes non hypertrophiques (Karsenty et al., 2009; Kronenberg, 2003). SOX9 est également capable d'interagir avec différentes voies de signalisation dont

la voie de la PTHrP (Huang et al., 2001; Murakami et al., 2000), la voie des FGF (Murakami et al., 2000) et la voie Wnt canonique (Akiyama et al., 2004).

Deux autres membres de la même famille SOX, sont coexprimés avec SOX9 et participent à la régulation de sa fonction; il s'agit de SOX5 et SOX6. Bien qu'ils n'aient pas de domaine de transactivation, ces protéines forment avec SOX9 un complexe qui est capable de se lier à différents éléments cis chondrocytaires (Akiyama et al., 2002).

#### b. RUNX2

*RUNX2*, anciennement connu par *CBFA1* (Core-Binding Factor, Runt domain, Alpha subunit 1), code pour un facteur de transcription de la famille RUNX qui est fortement exprimé par les cellules du péri-chondre et les ostéoblastes. Au niveau de la plaque de croissance, son expression est détectée dans les cellules mésenchymateuses condensées, les chondrocytes préhypertrophiques et les chondrocytes hypertrophiques. Une faible expression de Runx2 est aussi observée dans les chondrocytes prolifératifs (Kronenberg, 2003). Outre son rôle crucial dans le contrôle de la formation et de la fonction des ostéoblastes, Runx2 intervient dans différentes étapes de la différenciation chondrocytaire (Karsenty et al., 2009; Komori, 2002; Kronenberg, 2003). Il régule la croissance des membres en induisant la voie de signalisation IHH.

Runx3 est un autre élément de la famille Runx qui, au niveau de certaines pièces squelettiques, joue le même rôle que Runx2 dans la régulation de l'hypertrophie des chondrocytes (Yoshida et al., 2004).

#### 2.4.2.2.2. Les voies de signalisation

##### a. Voie de signalisation de la superfamille de TGF $\beta$

Outre le TGF $\beta$ , cette voie de signalisation fait intervenir différents facteurs de croissance, dont les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), l'activine, l'inhibine, la

protéine nodale et le MIF ( Mullerian Inhibiting Factor), qui sont impliqués dans la régulation de processus fondamentaux de la vie (Kanaan and Kanaan, 2006). En se liant à des récepteurs de type Sérine /Thréonine kinase (Massagué, 1998), le TGF $\beta$  et les BMPs jouent des rôles importants dans la chondrogenèse et dans la skeletogenèse en général (Mackie et al., 2008). Les voies de signalisation intracellulaire déclenchées sont soit dépendantes des protéines Smads, soit indépendantes, impliquant les cascades MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Olsson et al., 2001).

Les BMPs, également désignés par GDF (Growth and Differentiation Factors), sont connus comme des régulateurs majeurs de la formation osseuse (Wu et al., 2007). En induisant la condensation des cellules mésenchymateuses, ils favorisent l'organisation du squelette et la formation de différents organes (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). De plus, ils sont impliqués dans la chondrogenèse selon une voie dépendante de la voie IHH et de SOX9. Les BMPs agissent en antagonisme avec les FGFs pour réguler la prolifération des chondrocytes et leur différenciation terminale (Kronenberg, 2003). L'effet des BMPs sur l'activation de la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance (Minina et al., 2001; Young, 2003) et le contrôle de l'occurrence et de la progression de l'hypertrophie de ces derniers (Mackie et al., 2008), a été validé par plusieurs études. Cet effet est potentialisé par TGF $\beta$ .

Le TGF $\beta$ 2 est un médiateur essentiel de l'induction de la PTHrP, par la voie IHH (Alvarez et al., 2002). En induisant l'expression de PTHrP (Serra et al., 1999), il inhibe l'hypertrophie des chondrocytes (Ballock et al., 1993). De plus, en synergie avec FGF2, le TGF $\beta$  induit la prolifération et la maturation des chondrocytes (Frenz et al., 1994). Le TGF $\beta$ 1, quand à lui, est le facteur de croissance le plus abondant dans l'os humain (Kanaan and Kanaan, 2006). Il induit la différenciation précoce des cellules sombres et la mort physiologique de ces cellules par une voie non apoptotique (Ahmed et al., 2007).

### b. Voie de signalisation des FGF

La famille des FGFs comprend environ 22 membres, répartis en 6 sous-familles selon leurs séquences (Ornitz and Itoh, 2001). Ces facteurs peuvent se lier à des récepteurs membranaires FGFR (FGF Receptor), qui sont des récepteurs de type tyrosine kinase codés par 4 gènes différents (Johnson and Williams, 1993). Selon le contexte tissulaire, différents isoformes de récepteurs, chacun possédant une affinité spécifique à un ligand donné, sont générés par épissage alternatif (Ornitz and Marie, 2002). Ainsi, au niveau des cellules épithéliales, le récepteur FGF est du type c alors qu'au niveau des cellules mésenchymateuses, il est du type b (Miki et al., 1992; Orr-Urtreger et al., 1993). L'activité et la spécificité des FGFs sont régulés par les protéoglycanes de type héparane sulfate présents dans la MEC. En effet, l'héparane sulfate, un FGF et un récepteur FGFR, s'associent pour former un complexe trimoléculaire (Ornitz, 2000; Rapraeger et al., 1991; Yayon et al., 1991). Selon le type tissulaire, les chaînes d'héparane subissent des modifications spécifiques requises pour la régulation des interactions fonctionnelles du ligand avec son récepteur (Rapraeger, 1995). La voie de signalisation FGF est impliquée dans la régulation de l'ossification endochondrale (De Luca and Baron, 1999). Certains FGF contrôlent la balance entre les cellules squelettiques, leur différenciation et leur apoptose (Ornitz and Marie, 2002).

### c. Voie de signalisation de la PTHrP

Réglée par la voie IHH et agissant via un récepteur PPR (récepteur de l'hormone parathyroïdienne PTH/PTHrP), la PTHrP joue un rôle crucial dans la régulation de la plaque de croissance (Hirai et al., 2011). Elle est exprimée, au cours de la vie fœtale, par les chondrocytes du cartilage articulaire et par les cellules adjacentes du péri-chondre. Son récepteur est exprimé surtout par les chondrocytes qui transitent d'un stade prolifératif à un stade postprolifératif; en d'autres termes, par les chondrocytes préhypertrophiques et les premières couches de chondrocytes hypertrophiques, et, à un faible taux, par les chondrocytes prolifératifs (Kronenberg,

2003). PTHrP régule la longueur des colonnes de chondrocytes prolifératifs en favorisant la multiplication continue de ces derniers et inhibant leur différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques, au cours de la période périnatale (Hirai et al., 2011). Cet effet est en liaison directe avec IHH dont la synthèse est diminuée par la PTHrP. Ces deux voies de signalisation agissent donc en une boucle de rétroaction négative pour réguler la longueur des colonnes prolifératives de la plaque de croissance (Vortkamp et al., 1996).

#### d. Voie de signalisation IHH

IHH est le seul membre de la famille hedgehog qui intervient dans l'ossification endochondrale. Il est exprimé, au niveau de la plaque de croissance, par les chondrocytes préhypertrophiques et par les premières couches de chondrocytes hypertrophiques. Son interaction avec son récepteur Ptch-1 (Patched-1) provoque le mouvement et l'activation de smo (smoothened), une protéine transmembranaire ressemblant aux protéines de type G, et entraîne alors une cascade de signalisation intracellulaire (Karsenty et al., 2009; St-Jacques et al., 1999). En agissant directement sur les chondrocytes non hypertrophiques, IHH favorise la prolifération des chondrocytes (St-Jacques et al., 1999). En stimulant la production de la PTHrP, il reporte l'hypertrophie des chondrocytes. L'interaction entre les deux voies paracrines IHH et PTHrP régule la différenciation des chondrocytes prolifératifs en hypertrophiques et détermine donc la longueur des colonnes de cellules en multiplication au niveau de la plaque de croissance. Par ailleurs, IHH contrôle la différenciation des ostéoblastes au cours de l'ossification endochondrale (Kronenberg, 2003).

#### e. Voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt est connue pour le rôle fondamental qu'elle joue lors du développement embryonnaire. Cette voie intervient également dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte et la régulation de l'ossification

endochondrale. La liaison d'une protéine Wnt à un récepteur du type frizzled (Fz) et un co-récepteur Lrp active soit la voie canonique par laquelle les  $\beta$ -caténines, transloquées dans le noyau, s'associent à des membres de la famille LEF1/TCF pour réguler la transcription de différents gènes ; soit une voie non-canonique (Logan and Nusse, 2004).

L'intensité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine détermine la différenciation des cellules ostéoprogénitrice en chondrocytes ou en ostéoblastes. Ainsi, un signal fort, notamment de la part de WNT4 et WNT9a, est en faveur de la différenciation directe d'une cellule ostéoprogénitrice en un ostéoblaste (ossification membranaire), alors qu'un signal faible favorise la formation des chondrocytes (Bonaventure and Silve, 2005). Cependant, WNT5, qui agit selon une voie non-canonique dégradant les  $\beta$ -caténines, est capable d'inhiber la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes (Karsenty et al., 2009).

## **2.5. Le remodelage osseux**

Depuis la vie fœtale jusqu'à la mort, le tissu osseux est en renouvellement permanent, permettant au corps de maintenir une masse osseuse quasi constante et une homéostasie minérale. Le remodelage osseux est donc un processus physiologique, complexe et dynamique, faisant intervenir plusieurs types cellulaires et facteurs de régulation systémiques et locaux. Chez les femmes, l'insuffisance de la production d'hormones sexuelles durant la péri-ménopause est à l'origine d'une augmentation de l'incidence de ce mécanisme qui diminuera avec l'âge tout en restant plus important que chez les femmes en pré-ménopause. Chez les hommes, l'augmentation de l'incidence du remodelage avec l'âge est plus modérée. L'unité de remodelage osseux consiste en un assemblage extrêmement régulé d'ostéoclastes, assurant la résorption osseuse, et d'ostéoblastes, responsables de la formation de l'os. Le cycle de remodelage est constitué de 4 phases séquentielles : une phase d'activation, initiant le processus, suivie d'une phase de résorption par les

ostéoclastes puis d'une étape d'inversion qui précède l'étape finale correspondant à la formation osseuse par les ostéoblastes. Le mécanisme débute par la phase d'activation au cours de laquelle, les cellules mononucléées pré-ostéoclastiques, recrutées sous l'influence de divers facteurs hormonaux et mécaniques, migrent au site de remodelage. Au niveau de ce dernier, plusieurs cellules mononucléées fusionnent pour former des pré-ostéoclastes multinucléés. Cette phase se manifeste également par le retrait de l'endoste contenant les cellules bordantes protectrices de la masse osseuse. La liaison des pré-ostéoclastes multinucléés, via leurs récepteurs membranaires de type intégrine, à la matrice osseuse, notamment aux protéines matricielles contenant les résidus peptidiques RGD (pour arginine, glycine et asparagine), devient alors possible. Une zone annulaire (ou chambre de résorption) se forme autour des compartiments couverts par les ostéoclastes, préparant ainsi la matrice à la résorption osseuse. La deuxième phase du cycle de remodelage dure de 2 à 4 semaines, au cours desquelles, les ostéoclastes se forment, s'activent et dégradent la matrice osseuse. L'activation de ces cellules est régulée surtout par le rapport entre le RANKL (Receptor activator of NF- $\kappa$ B [Nuclear Factor Kappa B] Ligand) et l'ostéoprotégérine (OPG) qui sont produits par les ostéoblastes et leurs cellules progénitrices. D'autres facteurs locaux contribuent aussi à la régulation de cette phase, dont IL-1 (interleukine 1), IL-6, CSF (Colony Stimulating Factor), l'hormone parathyroïdienne et la 1,25-dihydroxyvitamine D. Dans le but de résorber la matrice, les ostéoclastes, adhérents à la surface osseuse, commencent à acidifier la zone de remodelage en sécrétant, à travers leurs pompes ATPase-H et leurs canaux chlorure, des ions d'hydrogène. Ces cellules sécrètent ensuite, depuis leurs vésicules lysosomales, la phosphatase acide tartrate-résistante, la cathépsine K, la métalloprotéinase matricielle 9 et la gélatinase qui dégradent la matrice osseuse, formant des lacunes de Howship à la surface de l'os trabéculaire et des canaux Harvesiens au niveau de l'os compact. La 3ème phase du cycle de remodelage consiste en une transition d'une phase de résorption à une phase de formation osseuse. Après la mort des ostéoclastes multinucléés par apoptose, les cellules mononucléées nettoient la surface résorbée, complétant ainsi la phase de résorption

et formant avec les préostéoblastes et les ostéocytes libérés de la MEC, des cavités de résorption. La dernière phase du remodelage ou phase de formation osseuse peut durer plusieurs mois, au cours desquels, les ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice osseuse organique riche en collagène et régulent la minéralisation en libérant des petites vésicules qui se lient à la matrice pour la concentrer en calcium et en phosphates, et détruire enzymatiquement les inhibiteurs de la minéralisation comme le pyrophosphate et les protéoglycanes. Certains ostéoblastes s'intègrent ensuite dans la matrice et deviennent des ostéocytes interconnectés entre eux et avec les cellules bordantes par des jonctions gap. A la fin de la formation osseuse, 50 à 70% des ostéoblastes subissent l'apoptose. Le tissu osseux est donc formé par les ostéocytes et les cellules bordantes. Un nouveau ostéon est constitué par chaque cycle de remodelage.

La balance osseuse est la résultante de la résorption de l'os ancien et de la formation du nouveau. La fonction essentielle du remodelage osseux est la préservation de la force mécanique de l'os et le maintien de l'homéostasie des ions calcium et phosphates. Ce processus, qui se déroule simultanément en différents sites aléatoires, est régulé par divers facteurs locaux, paracrines et/ou autocrines (Clarke, 2008; Cohen-Solal and de Vernejoul, 2003; Karsenty, 2000, 2001).

### **3. La consanguinité**

« Ceux qui se ressemblent s'assemblent »

Homère

### 3.1. Définition de la notion de consanguinité :

Le terme « consanguinité » provient du latin « consanguineus » désignant « du même sang ». En génétique clinique, la consanguinité est la conséquence de l'union de deux sujets apparentés, ayant au moins un ancêtre commun. Le lien de parenté entre ces deux géniteurs est en relation directe avec l'effet de la consanguinité qui devient presque négligeable quand on remonte à plus de trois à quatre générations (Der Kaloustian et al., 1980). Le taux de consanguinité, dans une population donnée, dépend de plusieurs facteurs géographiques, démographiques et socioculturels gouvernant le choix du conjoint (Varela et al., 2001). Une fréquence élevée de mariages entre apparentés peut donc être observée dans des petites populations isolées, où le nombre de conjoints éventuels est limité, mais également dans des grandes populations favorisant ce type d'unions pour des raisons sociologiques ou traditionnelles (Fleury; Varela et al., 2001).

Le mariage consanguin est considéré une forme d'endogamie où le sujet tend à choisir majoritairement son conjoint au sein de sa famille. Ce phénomène semble avoir une conséquence directe sur la circulation du flux génétique et l'évolution du patrimoine héréditaire de la population entière (Cavalli-Sforza et al., 1966; Chapman and Jacquard, 1971).

En se basant sur le concept de « l'homozygotie par descendance » ou « IBD pour Identity By Descent », un coefficient de consanguinité « F » peut être attribué à un sujet. Il désigne la probabilité pour que ce dernier reçoive, en un locus quelconque, deux allèles identiques par descendance (Fleury). Le principe de « l'homozygotie par descendance », a été introduit en 1902 par William Bateson suite à l'observation d'Archibald Garrod qui avait remarqué qu'une large proportion de patients atteints d'alcaptonurie, une maladie autosomique récessive, est issue de mariages entre apparentés. Bateson a expliqué que dans les familles issues de mariages consanguins, le gène muté rare, à l'origine de la maladie, est supposé être hérité d'un ancêtre commun aux deux parents, qui, à leur tour, le transmettent à leurs

descendants. Ces derniers seraient homozygotes par descendance et exprimeraient donc la maladie (Bateson, 1902; Garrod, 1996).

Le coefficient de consanguinité individuel peut être calculé à partir de la généalogie par la méthode des chemins de Wright (Wright, 1922). Cependant, dans certains cas où la généalogie n'est pas simple à établir,  $F$  peut être évalué grâce au modèle de Markov caché, à partir des marqueurs génomiques (en se référant sur leurs densités et leurs fréquences alléliques). Cette méthode permet non seulement l'estimation de «  $F$  » (représentant la proportion IBD du génome de l'individu) mais également celle de «  $a$  » qui désigne le taux de changement d'état IBD/cM (représentant la longueur des fragments IBD) (Leutenegger et al., 2003).

Sur le plan génétique, la consanguinité est un mécanisme qui modifie les fréquences génotypiques en les écartant du modèle panmictique de Hardy-Weinberg en faveur d'une perte d'hétérozygotie (Fleury). En effet, dans une population de grande taille où les accouplements sont réalisés d'une façon aléatoire (c'est-à-dire en conditions de panmixie), en l'absence de migrations, de sélection et de néomutations, la loi de Hardy-Weinberg permet de calculer, à partir de la fréquence de la maladie, la fréquence des différents génotypes pour un locus donné comme indiqué dans le tableau 1 (Stern, 1943). Dans le cas d'une population consanguine, ces fréquences génotypiques sont modifiées, de sorte à augmenter la proportion des homozygotes (Fleury).

**Tableau 1 : Les fréquences génotypiques selon le type de population.**

Génotypes Conditions	[AA]	[Aa]	[aa]
	Population panmictique (Equilibre de Hardy-Weinberg)	$p^2$	$2pq$
Population consanguine	$p^2 + Fpq$	$2pq - 2Fpq$	$q^2 + Fpq$

**P et q : Fréquences alléliques respectives des allèles A (normal) et a (délétère).  
F : coefficient de consanguinité.  $P+q=1$ .**

### **3.2. La consanguinité dans le monde:**

Dans l'histoire des peuples, le mariage était un acte essentiel qui jouait un rôle déterminant dans la vie sociale. Le choix matrimonial était régi par des règles définies et dépendait de plusieurs valeurs sociales, culturelles, religieuses, économiques et politiques (Reynolds, 1988).

Depuis les plus anciennes civilisations, les unions entre apparentés étaient favorisées. Cette tendance à l'endogamie était considérée par Tillion comme un penchant naturel de l'homme, envisageable en l'absence des différentes contraintes écologiques et vitales (Tillion, 1966). En se basant sur ce principe, une hypothèse sur l'origine et l'évolution des mariages endogames a été suggérée (Khlal, 1989; Tillion, 1966) : durant le Paléolithique supérieur, l'homme de Neandertal était incité à se déplacer pour subvenir à ses besoins alimentaires par le biais de la chasse. Le changement perpétuel du milieu de vie était en faveur de l'exogamie. A partir du Néolithique, les progrès techniques ont permis à l'homme d'assurer ses moyens d'existence grâce au troupeau et au champ. La détente démographique qui en résultait a autorisé à l'homme de « garder ses femmes pour soi ». D'où la « naissance de sociétés expansionnistes et endogames jusqu'à l'inceste ».

L'apparition du mariage avec la cousine patrilatérale remonte, selon Chelhod (Chelhod, 1965) à la Jahiliya pré-islamique. Cette époque était caractérisée par un système patriarcal où les bédouins refusaient de marier leurs filles en dehors du cercle de parenté agnatique pour la protéger de l'hostilité de la parenté féminine de son mari, mais également pour échapper au danger que peut entraîner l'exogamie du fait de la solidarité de la femme avec son groupe d'origine dans les querelles fréquentes entre tribus. Par la suite, des interdictions religieuses ont été établies pour interdire les formes d'inceste les plus extrêmes. Le développement social et l'immigration ont ensuite contribué à l'éclatement des isolats et à la diminution des mariages consanguins qui sont, cependant, restés largement répandus dans différentes régions du monde notamment au moyen Orient, en Afrique du Nord, en Asie Centrale et en Asie du Sud. Le taux le plus élevé des unions consanguines (50%)

est donc observé dans ces régions (Der Kaloustian et al., 1980; Khlata, 1988a). En Europe et en Amérique du Nord, le mariage entre cousins a subsisté jusqu'à la première moitié du dix-neuvième siècle (Bittles, 2003). Actuellement, ces unions sont devenues très rarement pratiquées et ne représentent que 1% à 5% du taux général de ces mariages dans le monde. La répartition globale des mariages consanguins dans le monde est représentée dans la figure 6 (Saggar and Bittles, 2008). Des études récentes ont montré que les mariages consanguins représentent 20% à 50% des mariages dans le monde arabe. Le taux de ces unions est de 51,25% - 58% en Jordanie (Hamamy et al., 2005; Khoury and Massad, 1992; Sueyoshi and Ohtsuka, 2003), 50% à 57,7% en Arabie Saoudite (el-Hazmi et al., 1995; Meyer, 2005), 54% au Koweït (Al-Awadi et al., 1985; Hijazi and Haider, 2001), 52% au Qatar (Bener and Alali, 2006), 50,5% aux Emirats Arabes Unis (al-Gazali et al., 1997), 29% à 50% en Egypte (Mokhtar and Abdel-Fattah, 2001) 35,4% en Syrie (Othman and Saadat, 2009) et 25% au Liban (Khlata, 1988b).

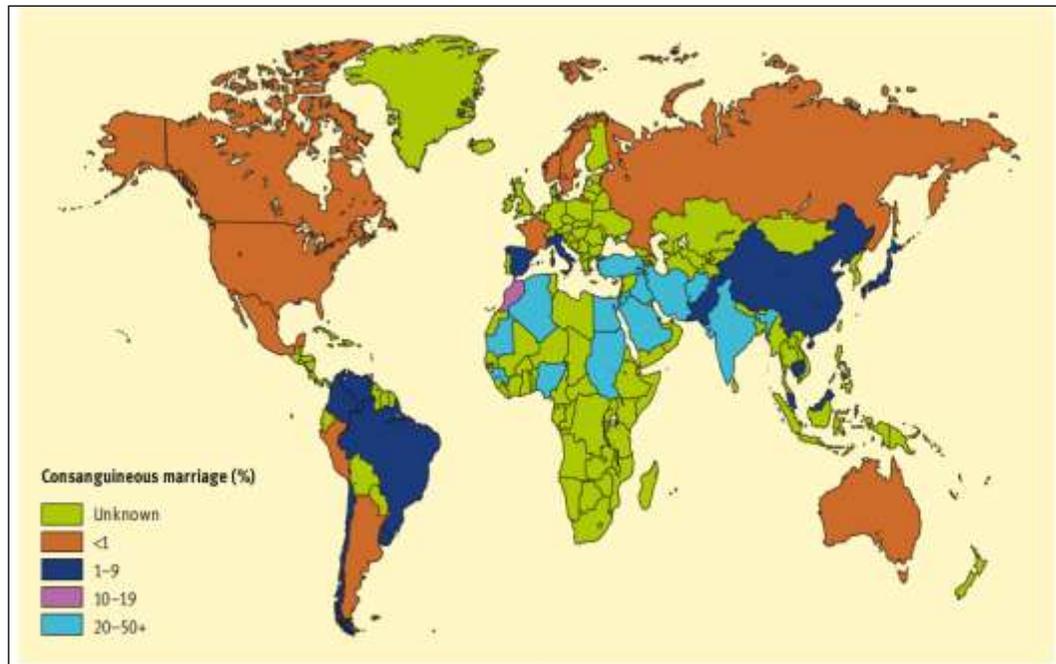


Figure 6: La répartition globale des mariages consanguins dans le monde. Les pourcentages représentent les estimations de la limite inférieure de la prévalence globale des mariages consanguins (Saggar et Bittles, 2008).

### 3.3. L'effet de la consanguinité sur la santé

L'impact de la consanguinité sur la santé a été rapporté pour la première fois en 1855 par le révérend Charles Brooks, lors de la 9<sup>ème</sup> réunion de l'Association Américaine pour l'Avancement de la Science (AAAS) (Brooks, 1856). Dans ce contexte, la première étude clinique portant sur les conséquences biologiques des mariages consanguins fut ensuite établie par Samuel Bemiss (Bemiss, 1858). Ce sujet, ayant attiré l'attention de plusieurs médecins, généticiens et biologistes, a soulevé beaucoup de controverses. Après la redécouverte des lois de Mendel en 1900 et l'établissement de la loi d'Hardy-Weinberg en 1908, les mécanismes des risques auxquels exposent de telles unions sont devenus plus compréhensibles (Bateson, 1902; Tabah and Sutter, 1951).

L'effet de la consanguinité sur la santé des descendants dépend, selon Briand, de deux catégories de facteurs : le lien de parenté entre les deux géniteurs et la

prédisposition de la famille à certaines maladies héréditaires autosomiques récessives ou multifactorielles (Mustapha, 1997; Talbi et al., 2007). En d'autres termes, c'est la transmission à travers des généalogies d'un ou de plusieurs traits, masqués chez les parents et provenant de leur ancêtre commun, qui est à l'origine du phénotype des descendants.

La consanguinité favorise donc l'apparition des maladies récessives en augmentant le taux d'homozygotie des sujets consanguins au cours des générations. En effet, pour qu'une maladie autosomique récessive s'exprime chez un individu, ce dernier doit porter deux allèles mutés du gène causal. Selon la fréquence de la maladie, la présence d'une copie mutée est plus ou moins probable. L'effet de la consanguinité sur l'incidence des maladies génétiques récessives est d'autant plus important en cas de maladies rares où la fréquence de l'allèle muté est très faible dans la population et donc sa transmission, à partir de l'ancêtre commun aux descendants du mariage consanguin est en faveur de l'expression de la maladie (Bittles, 2001). En général, le risque pour une famille, n'ayant pas de prédispositions génétiques connues, d'avoir un enfant qui présente une condition médicale sévère ou létale est estimé à 2%. Ce risque augmente à 5% – 6% dans le cas de familles issues d'un mariage entre des cousins germains (Saggar and Bittles, 2008). A ce jour, de nombreuses études ont confirmé la conséquence directe des mariages consanguins sur la récurrence des maladies rares à transmission Mendélienne (Bener et al., 2007; Bittles, 2001, 2005; Saggar and Bittles, 2008; Shawky et al., 2013) et son association avec un taux élevé de mortalité infantile (De Braekeleer; Charafeddine et al., 2012; Shah et al., 1998). De là, les familles consanguines ont constitué un modèle pour l'investigation des maladies autosomiques récessives (Bittles, 2011; Teebi and El-Shanti, 2006).

Par ailleurs, dans les populations présentant un taux élevé de consanguinité, une augmentation de l'incidence des maladies multifactorielles (à hérédité complexe) a aussi été observée chez les sujets consanguins (Bonaiti, 1978; Shawky et al., 2013).

### **3.4. La consanguinité et son impact sur l'apparition des maladies génétiques au Liban**

Un large spectre de maladies génétiques, communes et rares, est répandu au Liban. Plus de 164 entités, représentant au moins 12% des maladies héréditaires décrites dans le catalogue de McKusick « Hérité Mendélienne chez l'Homme » (Mc Kusick, 1978), ont été rapportées dans la population libanaise. La diversité de ces atteintes est probablement la conséquence de l'existence de différentes origines ethniques. Quant à l'incidence importante des maladies génétiques rares, elle est due au taux considérable de consanguinité dans cette population. En effet, le mariage consanguin, surtout entre cousins germains, est très fréquent dans toutes les communautés libanaises. Cependant, le degré de « perméabilité génétique » varie largement selon le groupe. Les mariages entre les différentes communautés sont, par exemple, courants chez les Chrétiens mais déconseillés chez les communautés musulmanes Sunnites ou Chiïtes qui favorisent les unions au sein de la même communauté. Par ailleurs, le groupe le plus isolé semble être celui de la communauté Druze. L'estimation du taux de consanguinité, dans les différentes communautés libanaises, a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques. La prévalence des mariages consanguins, à Beyrouth, a été estimée à 26% en 1981 (Klat and Khudr, 1986) et 25% en 1988 (Khlat, 1988b). En 1990, avec la fin de la guerre civile, l'attitude des individus était en faveur des mariages traditionnels consanguins dont la prévalence à Beyrouth a été estimée à 28,6% en 2009 (Barbour and Salameh, 2009).

Enfin, malgré la tendance à la modernisation, différents facteurs sociaux, religieux, géographiques mais aussi politiques ont contribué au phénomène d'isolat génétique de certains sous-groupes libanais et à la prévalence du mariage consanguin dans cette population (Der Kaloustian et al., 1980). De ce fait, une augmentation de la prévalence des maladies autosomiques récessives et une apparition de certaines

maladies rares ont été observées dans la population libanaise, qui est devenue aussi une population intéressante pour l'étude des maladies génétiques.

## **4. Les approches utilisées pour l'identification de gènes morbides**

« Qu'importe si le chemin est long, du moment qu'au  
bout il y a un puits »

Proverbe Touareg

## 4.1. La cartographie par homozygotie ou homozygotie par filiation

### 4.1.1. Généralités :

La stratégie de « cartographie par homozygotie » ou « homozygotie par filiation » est une approche d'analyse de liaison utilisée pour la localisation de gènes à transmission récessive dans des familles consanguines (Lander and Botstein, 1987). Basée sur le principe de « l'identité par descendance » IBD, cette approche consiste à rechercher des régions chromosomiques « homozygotes par descendance », partagées exclusivement par tous les malades issus d'un mariage consanguin, pouvant contenir le gène responsable de la maladie présentée par la famille (Figure 7).

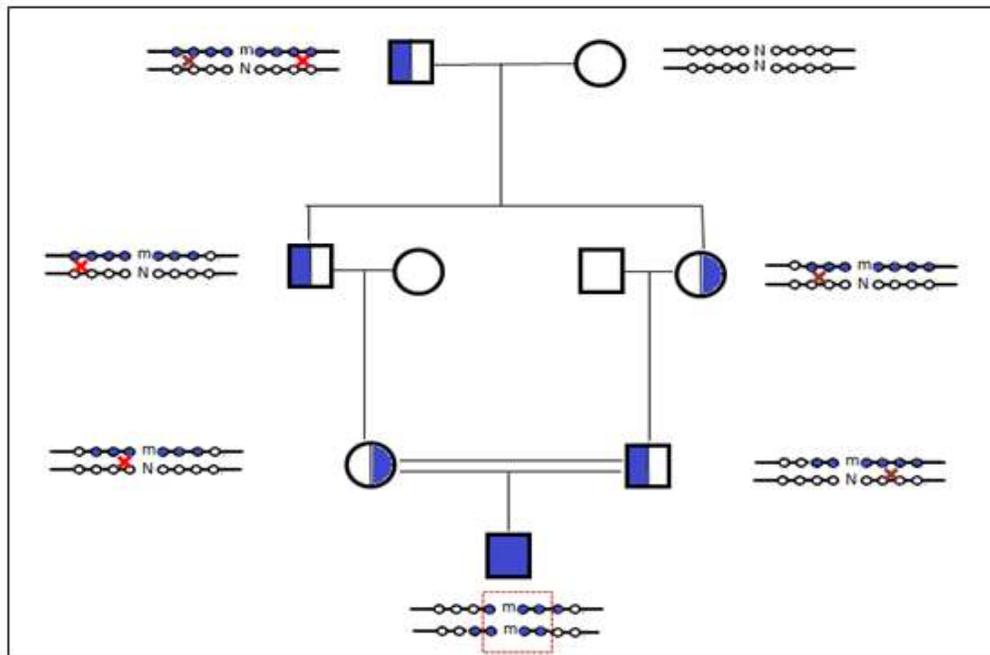
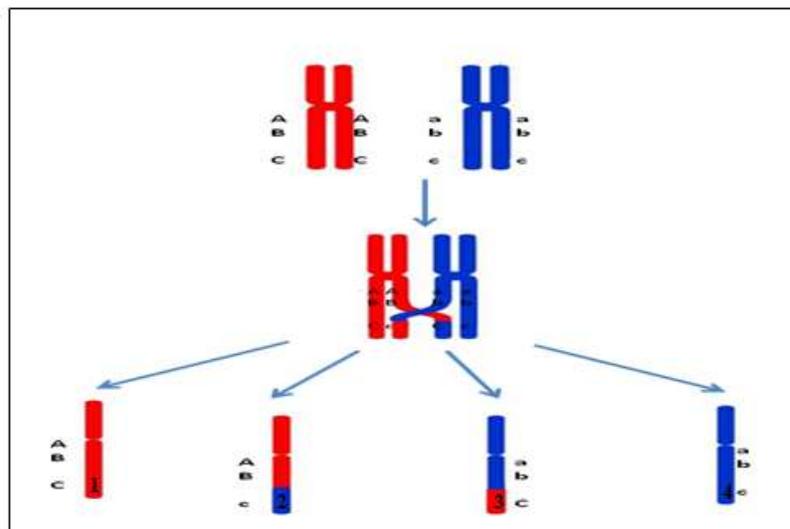


Figure 7: Le principe de la cartographie par homozygotie. Cet arbre généalogique montre l'exemple d'un sujet, issu d'un mariage entre deux cousins germains, et atteint d'une maladie autosomique récessive car il est porteur de l'allèle muté à l'état « homozygote par descendance ».

La notion de carte génétique remonte aux travaux de Morgan (1911) (Morgan, 1911a, 1911b) qui, en suivant la transmission de caractères génétiques à travers des générations de drosophiles, a remarqué que des gènes, localisés sur le même chromosome, ne s'assortissent pas indépendamment au cours de la méiose. Ils peuvent être génétiquement « étroitement liés » s'ils sont transmis presque toujours ensemble d'une génération à une autre. Cependant, plus la distance qui les sépare est importante, plus la liaison entre ces deux gènes peut être sujette à des « recombinaisons homologues » ou « crossing over » qui peuvent engendrer de nouvelles recombinaisons alléliques (Figure 8).

En se basant sur les données de Morgan, Sturtevant a ensuite proposé (en 1913), que la probabilité de crossing over entre deux loci pourrait être utilisée pour calculer la distance génétique qui les sépare (Sturtevant, 1913). Cette dernière est donc exprimée en unité de recombinaison ou centiMorgan (cM). Ainsi, 1 cM correspond à un taux de recombinaison «  $\Theta$  » entre deux loci égal à 1% et donc à une fréquence de 1 crossing over pour 100 méioses.



**Figure 8:** La recombinaison par « crossing over ». Ce mécanisme se produisant au cours de la prophase de la première division méiotique, permet de générer des gamètes ayant une composition allélique non parentale (Gamètes 2 et 3 en font des exemples). La probabilité de recombinaison entre deux loci étant proportionnelle à la distance qui les sépare; un crossing over entre les loci B/b et C/c est illustré dans la figure ci-dessus. D'après ce schéma, les loci B/b et A/a, qui sont à proximité l'un de l'autre, semblent être génétiquement liés.

#### **4.1.2. Applications :**

L'analyse de liaison génétique utilisée pour la localisation chromosomique de gènes humains a débuté avec les travaux de Fisher, Haldane et Penrose (1934-1935) qui furent complétés par Smith en 1953 (Thompson, 2007). En 1987, Lander et Botstein ont introduit la stratégie de « cartographie par homozygotie » qui vise à localiser des gènes responsables de maladies autosomiques récessives dans des familles consanguines. En se basant sur le principe de « l'identité par descendance », Lander et Botstein ont suggéré que le gène responsable d'une maladie héréditaire récessive, peut être localisé en recherchant, dans une famille consanguine, des marqueurs génétiques polymorphes exclusivement « homozygotes par descendance » chez tous les malades (Lander and Botstein, 1987).

#### **4.1.3. Le principe de la technique :**

L'analyse de liaison consiste à étudier la transmission, aux seins de généalogies, d'une série de marqueurs génomiques conjointement avec le locus de la maladie. Le gène morbide étant inconnu, le suivi de son locus est conçu grâce aux phénotypes sains ou atteints des sujets. Parallèlement, le génotypage des marqueurs moléculaires permet de déterminer les allèles portés par un individu pour ces loci polymorphes (Thompson, 2007).

#### **4.1.4. Les marqueurs génétiques**

Les marqueurs génétiques sont des séquences d'ADN, définissant chacune un loci précis et présentant, selon les individus, un polymorphisme aisément détectable. Les marqueurs utilisés dans les analyses de liaison doivent être suffisamment nombreux et espacés pour permettre une bonne couverture du génome entier; ils

doivent être très polymorphes pour conférer à l'étude de la ségrégation des loci une haute informativité. On distingue trois types de marqueurs génétiques :

#### **4.1.4.1. Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polymorphismes de longueur de fragments de restriction :**

Utilisés pour établir les premières études de liaison génétique, ces marqueurs ont été identifiés suite à la découverte des enzymes de restriction en 1973. Ces dernières, ayant la particularité de couper l'ADN en des sites spécifiques, permettent de générer des fragments de tailles variables d'un sujet à un autre (Botstein et al., 1980). Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis le remplacement des RFLP par des marqueurs plus spécifiques et plus facilement analysables.

#### **4.1.4.2. Les microsatellites**

Découverts en 1989, ce type de marqueurs polymorphes avait vite remplacé les RFLP. Il s'agit de séquences répétitives d'ADN, réparties uniformément sur l'ensemble du génome et permettant une bonne couverture de ce dernier. Ces marqueurs polymorphes sont constitués de motifs di, tri ou tétra nucléotidiques dont le nombre de répétitions est très variable d'un sujet à un autre (Weber and May, 1989).

Le typage d'un sujet pour un microsatellite ou STR (Short Tandem Repeat) donné consiste à déterminer l'allèle convenable, qui correspond au nombre de répétitions de ce motif chez ce sujetet donc à la taille du marqueur chez ce dernier. Il s'agit d'une amplification par des amorces fluorescentes, de la région génomique du marqueur STR, suivie d'une électrophorèse par capillaire pour séparer les variantes alléliques qui diffèrent par leurs tailles. Enfin, l'excitation, par une source laser, des bandes fluorescentes migrées permet leur détection.

#### 4.1.4.3. Les SNP ou Single Nucleotide Polymorphism

Les SNP sont des variations ponctuelles très fréquentes au niveau de l'ADN, permettant un "scanning" complet du génome entier en un temps minime. En effet, bien qu'ils soient bi-alléliques et donc moins informatifs que les STR, leur nombre important (plus de 20 millions de SNP répertoriés) permet de couvrir le génome en entier avec une densité très élevée et offre une grande flexibilité dans la sélection de ces derniers. De plus, les SNP sont génétiquement plus stables que les STR dont l'allèle (c'est-à-dire le nombre de répétitions) peut changer avec la réplication de l'ADN. Enfin, le génotypage des SNP nécessite une quantité d'ADN plus faible que celle exigée pour l'étude des STR, il est plus rapide et son analyse est facilement automatisée grâce à la mise en place des plateformes à « puces d'ADN ». Pour toutes ces raisons, les SNP sont devenus les marqueurs génomiques le plus souvent utilisés dans les analyses de liaison actuelles (Elahi et al., 2004; Wang et al., 1998).

#### 4.1.5. Paramètre statistique pour l'évaluation de la liaison : le

##### Lod score

Afin de tester la vraisemblance de liaison entre deux ou plusieurs loci, le paramètre statistique LOD (Logarithm Of the Odds) Score « Z » a été établi par Newton E. Morton (1955).

Il s'agit du logarithme décimal du rapport de vraisemblance entre l'hypothèse de liaison de deux loci (liaison à une fréquence de recombinaison «  $\Theta$  » donnée), et celle de non liaison (correspondant à  $\Theta = 0,5$ ) (Morton, 1955).

$$Z(\Theta) = \text{Log} \frac{\text{Probabilité de liaison } (\Theta)}{\text{Probabilité de non liaison } (\Theta=0,5)}$$

Les résultats du calcul du LOD score peuvent être classés en 3 catégories :

- Pour une valeur de « Z » supérieure ou égale à 3 correspond une probabilité de liaison 1000 fois plus importante que celle de non liaison. Dans ce cas, on peut conclure que la liaison entre les deux loci est significative.
- Si « Z » est inférieur à -2, l'hypothèse de liaison génétique est exclue.
- Si « Z » est compris entre -2 et 3, le résultat est statistiquement non significatif. Dans ce cas, il est conseillé d'augmenter le nombre de paramètres pour rendre la conclusion informative. Il est possible, par exemple, de suivre un nombre supplémentaire de loci présents au niveau de la région d'intérêt ou d'étudier, éventuellement, d'autres familles présentant la même maladie.

Différents logiciels informatiques permettent de réaliser le calcul du LOD score, en particulier, on cite : *easyLINKAGE*, *FASTLINK*, *LINKAGE*, *GENEHUNTER*, etc...

#### **4.1.6. Les facteurs dont dépend la puissance d'une analyse de liaison**

L'analyse de liaison concerne les maladies monogéniques, rares et à pénétrance complète. Le succès de cette stratégie dépend de plusieurs facteurs, dont :

- \* La densité des marqueurs utilisés.
- \* L'informativité de ces marqueurs.
- \* La taille de la famille étudiée. En effet, plus le nombre de sujets atteints et non atteints étudiés est grand, plus le nombre de méioses informatives analysées est suffisant pour atteindre un seuil statistiquement significatif.

#### **4.1.7. Conclusion**

Depuis son identification, la technique de cartographie par homozygotie a contribué à la localisation d'un nombre très important de gènes impliqués dans des

maladies génétiques récessives notamment l'atrophie musculaire, la mucoviscidose, la maladie de Huntington (Lefebvre et al., 1995; Rommens et al., 1989; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

L'identification de ces gènes a été réalisée par la stratégie du clonage positionnel qui consiste à localiser le gène en cause de la maladie grâce à une étude de liaison, puis à l'identifier par une approche de gènes candidats. Les régions d'intérêt sont alors investiguées afin de sélectionner des gènes considérés comme de « bons candidats » sur la base de leur fonction présumée par différentes bases de données. La séquence codante de ces gènes est ensuite étudiée jusqu'à ce qu'une variation de séquence, en lien avec la pathologie, ségrégeant dans le pedigree et absente chez des sujets témoins, soit trouvée chez les malades étudiés.

## **4.2. Le séquençage de l'exome**

### **4.2.1. Généralités**

Après l'élaboration des plateformes de séquençage à haut débit en 2005, le développement accru des technologies de capture de régions génomiques a permis l'établissement, en 2007, d'une nouvelle stratégie : le séquençage de l'exome. Il s'agit d'une technique qui consiste, principalement, à séquencer sélectivement toutes les régions codantes du génome humain afin de détecter les variations de séquence associées à des désordres génétiques rares ou extrêmement hétérogènes (Bamshad et al., 2011). Etant donné que les séquences génomiques codantes pour des protéines constituent environ 1,5% du génome humain, l'exome d'un individu couvre 33 Mégabases (Mb) de la séquence génomique comprenant près de 180 000 exons ainsi que 500 microARNs ayant un rôle de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de certains gènes (Hedges et al., 2009). La capture des exons inclut celle des jonctions exons/introns permettant ainsi d'étudier les sites accepteurs et donneurs d'épissage canonique.

L'exclusion de l'étude des variations non codantes est argumentée par le fait que la majorité des variations associées aux maladies Mendéliennes existent au niveau des exons des gènes (Botstein and Risch, 2003; Cooper et al., 1998; Stenson et al., 2003). Cette approche permet ainsi de contourner les limitations du séquençage du génome entier tant par ses données plus facilement analysables que son coût plus abordable.

#### 4.2.2. Applications

Le séquençage de l'exome permet la détection rapide des variations codantes pour des protéines y compris les mutations faux-sens, non-sens, les petites insertions et délétions ainsi que les variations modifiant les sites d'épissage canonique.

Depuis sa première application dans l'étude du syndrome de Miller [MIM 263750] en 2010 (Ng et al., 2010a), le séquençage de l'exome a directement prouvé son efficacité dans l'identification de nombreux gènes responsables de maladies génétiques rares et hétérogènes parmi lesquels le gène *MLL2* (Myeloid/Lymphoid or Mixes Lineage Leukemia 2) [MIM 602113] causant le syndrome de Kabuki [MIM 147920] (Ng et al., 2010b) et le gène *WDR62* (WD Repeat domain 62) [MIM 613583] qui est à la base de beaucoup de malformations cérébrales sévères (Bilgüvar et al., 2010). De plus, grâce à cette technique, les bases moléculaires de plusieurs pathologies osseuses ont été identifiées dont les mutations du gène *SMAD4* (mothers against decapentaplegic homolog 4, Drosophila) family member 4] [MIM 600993] à l'origine du syndrome de Myhre [MIM 139210] (Le Goff et al., 2012), les mutations du gène *FBNI* (fibrillin1) [MIM 134797] causant des dysplasies acromicriques [MIM 102370] ou géléophysiques (Le Goff et al., 2011), les mutations de *PDE4D* (phosphodiesterase 4D, cAMP-specific) [MIM 600129] responsables d'acrodysostoses [MIM 101800] (Michot et al., 2012) et les mutations de *INPPL1* (inositol polyphosphate phosphatase-like 1) [MIM 600829] à l'origine de l'opsismodysplasie [MIM 258480] (Huber et al., 2013).

Outre son application dans l'identification de gènes morbides, le séquençage de l'exome peut être également adopté comme outil de diagnostic moléculaire dans le

cas des maladies présentant une hétérogénéité phénotypique et dans le cas des larges spectres de syndromes caractérisés par des manifestations cliniques communes. Les maladies congénitales de glycosylation, par exemple, constituent un groupe de plus de 30 entités à transmission autosomiques récessives. Le séquençage de l'exome est avantageux dans le cas de maladies caractérisées par une hétérogénéité génétique où l'étude moléculaire des différents gènes qui peuvent être à l'origine du phénotype est laborieuse et coûteuse. C'est le cas, par exemple, de la maladie de Charcot-Marie-Tooth qui peut être due à des mutations de plus de 35 gènes différents; de même pour la rétinite pigmentaire qui implique un nombre de gènes supérieur à 50 (Ku et al., 2012).

Dans ce contexte, certains établissements ont conçu des protocoles de séquençage ciblé permettant une analyse moléculaire rapide et automatisée d'un nombre important de gènes susceptibles d'être responsables de certaines maladies investiguées. Un exemple en est la stratégie de « l'exome ciliaire » qui a été mise en place par Dr Sophie SAUNIER à l'unité INSERM 983 de l'hôpital Necker enfants-malades et qui vise à étudier les parties codantes d'environ 1666 gènes pouvant causer des ciliopathies.

### **4.2.3. Le principe de la technique**

Le séquençage de l'exome est une approche de séquençage à haut débit qui cible essentiellement les régions du génome codant pour des protéines. Dans ce contexte, environ 5% du génome humain entier est capturé et enrichi pour être ensuite séquencé; il s'agit des exons de tous les gènes identifiés et de quelques microARNs. La capture des exons inclut aussi les jonctions intron-exon, en d'autres termes, les sites accepteurs et donneurs d'épissage canonique mais exclut les régions 5' et 3' UTR (Untranslated Regions qui ne sont pas codantes).

#### 4.2.4. L'analyse du séquençage de l'exome

Le séquençage de l'exome permet de détecter un nombre très important de variations génomiques dont la majorité ne constitue que des polymorphismes bénins (Ng et al., 2008). L'identification des mutations morbides nécessite donc une analyse minutieuse des données générées et une interprétation adéquate des résultats selon le contexte clinique propre à chaque cas. En effet, l'exome d'un individu comporte environ 20000 à 24000 variations de séquence ponctuelles ou SNV (pour Single Nucleotide Variant) dont plus de 95% sont des polymorphismes déjà répertoriés dans des bases de données (Bamshad et al., 2011). Des milliers de rares variants existent aussi dans l'exome d'un individu et sont connus comme « des variants génétiques privés » (Cooper and Shendure, 2011).

Dans le but de sélectionner le (ou les) variant(s) potentiellement responsable(s) du phénotype des patients, plusieurs facteurs sont pris en considération notamment :

- Les polymorphismes répertoriés dans les différentes bases de données (SNP database « dbSNP », la base de données du projet 1000 Génomes, Exome Variant Server « EVS », etc...) ainsi que les variants détectés avec une fréquence supérieure ou égale à 1% chez des sujets contrôles. L'exclusion de ces polymorphismes doit être faite avec rigueur particulièrement dans le cas de maladies autosomiques récessives fréquentes (comme la mucoviscidose) où des sujets, porteurs à l'état hétérozygote de mutations et ne présentent aucune manifestation clinique, peuvent être considérés comme contrôles.
- Le type de la mutation; en effet, les variations qui n'affectent pas la structure de la protéine sont exclues. C'est le cas des variations synonymes à l'exception de celles qui modifient un site d'épissage primaire ou cryptique.
- Le degré de pathogénicité de la mutation estimé par différents logiciels de prédiction selon la structure de la protéine et la conservation, entre les espèces, de l'acide aminé affecté par la mutation. Dans ce cadre, plusieurs logiciels sont disponibles dont PolyPhen (POLYmorphism PHENotyping.),

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), mutation taster, etc... (Cooper and Shendure, 2011).

- Le mode de transmission de la maladie, la structure du pedigree et la ségrégation de la mutation avec la maladie au sein de la famille du patient. Ainsi, dans le cas de maladies autosomiques récessives, la recherche porte sur les mutations hétérozygotes composées et homozygotes (surtout quand il s'agit d'une famille consanguine où la mutation morbide semble provenir d'un ancêtre commun aux deux parents). D'autre part, les variants *de novo*, détectés grâce à l'analyse de l'exome de trios (parents non atteints et enfant atteint), sont pris en considération dans des cas sporadiques de maladies autosomiques dominantes.
- Les régions génomiques d'intérêt si une analyse de liaison est déjà réalisée. Dans ce cas, les variations présentes hors des régions d'intérêt sont exclues.

Différentes stratégies peuvent être adoptées lors du filtrage des variations (cf. partie méthodologie). En cas d'homogénéité clinique, les données du séquençage de l'exome de plusieurs patients peuvent être combinés afin d'identifier le gène muté en commun.

## **II- Objectif de la thèse**

« Quand la maladie n'est pas connue, il n'y a pas de remède »

Proverbe Birman

Les dysplasies osseuses constituent un groupe très hétérogène de maladies rares. Le suivi des patients qui en sont atteints consiste en une approche multidisciplinaire qui vise à établir un diagnostic adéquat permettant une meilleure prise en charge afin d'éviter, si cela est possible, les complications qui peuvent survenir.

Au cours de ces dernières décennies, le développement des outils de biologie moléculaire a permis l'identification de plus de 230 gènes responsables d'environ 400 maladies osseuses constitutionnelles. L'équipe de recherche « Bases moléculaires et physiopathologiques des chondrodysplasies », au sein de l'Unité INSERM 781 de l'hôpital Necker – enfants malades, a contribué à l'identification de plusieurs de ces gènes.

Par ailleurs, avec le taux élevé de consanguinité et le phénomène d'isolat communautaire observés au Liban, une augmentation de la prévalence des maladies autosomiques récessives et une apparition de certaines maladies orphelines sont constatées dans la population libanaise. Dans ce contexte, l'Unité de Génétique Médicale (UGM) de l'Université Saint-Joseph du Liban, reconnue comme Pôle d'Excellence régional de « Génétique médicale », s'est consacrée, depuis une dizaine d'années, à la localisation et l'identification de gènes impliqués dans les maladies génétiques récessives.

Mon projet de thèse, réalisé en cotutelle entre l'UGM et l'Unité INSERM 781, vise à identifier les gènes impliqués dans différentes dysplasies osseuses rares, de transmission héréditaire autosomique récessive, dans quatre familles libanaises consanguines examinées à l'UGM :

- i) Deux familles consanguines et non apparentées, avec quatre enfants atteints d'une dysplasie spondylo-dysplastique autosomique récessive sévère (Famille A et B).
- ii) Une famille consanguine avec 3 enfants atteints porteurs d'une dysplasie rhizomélique (Famille C).
- iii) Une famille consanguine avec deux enfants porteurs d'un syndrome caractérisé par une avance staturale et des malformations craniofaciales (Famille D).

En parallèle, nous avons réalisé, une étude moléculaire par séquençage direct du gène *ROR2* (Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 2), dans une famille consanguine avec deux enfants présentant une atteinte modérée de la forme récessive du syndrome de Robinow.

Le travail de recherche que j'ai effectué au sein de l'équipe « Bases moléculaires et physiopathologiques des chondrodysplasies » de l'unité INSERM 781, m'a également offert l'opportunité de participer à une étude moléculaire d'une cohorte de 8 patients atteints d'ostéolyse multicentrique carpotarsale, qui a fait l'objet d'une publication dans *American Journal of Medical Genetics* (cf annexe 1).

Vu la rareté des dysplasies osseuses, leur complexité et la variabilité des phénotypes présentés par les sujets qui en sont atteints, l'identification de leurs bases moléculaires contribuera à la compréhension des mécanismes d'ossification endochondrale, permettra l'affirmation d'un diagnostic postnatal, l'établissement de corrélations génotype-phénotype, et ouvrira peut-être de nouvelles perspectives thérapeutiques.

### **III- Matériel et Méthodes**

« Avec de la méthode et de la logique on peut arriver à tout aussi bien qu'à rien » Pierre Dac

## 1. La Méthodologie

L'identification des gènes impliqués dans des maladies génétiques présente un intérêt majeur tant sur le plan fondamental que clinique. C'est ainsi que la connaissance de la base moléculaire d'une maladie permet de comprendre son mécanisme physiopathologique, de confirmer un diagnostic établi et de mettre en place d'éventuelles perspectives thérapeutiques.

Depuis sa première application, la stratégie couplant la technique de cartographie par homozygotie à l'approche des gènes candidats a prouvé son efficacité dans l'identification des gènes responsables de maladies génétiques récessives. Cependant, cette stratégie semble être très laborieuse et coûteuse et ce d'autant plus quand l'analyse de liaison ne permet pas de réduire significativement le nombre de gènes à séquencer. Ainsi, dans le cas de petites familles où le nombre de méioses informatives analysées n'est pas suffisant pour atteindre un seuil statistiquement significatif, plusieurs régions à faibles Lod scores sont détectées. En parallèle, l'approche du gène candidat est délicate puisqu'elle exige une connaissance préalable de la fonction du gène muté responsable de la maladie investiguée. De plus, cette stratégie n'est pas adaptée à l'étude des maladies génétiques sporadiques qui sont dues à des mutations *de novo*.

Le développement accru des techniques de séquençage à haut débit et des technologies de capture de régions génomiques a permis l'établissement, en 2007, du séquençage de l'exome qui a rapidement remplacé l'approche classique du gène candidat. En effet, grâce au séquençage de l'exome, l'étude moléculaire massive et rapide de toutes les régions codantes des gènes est devenue possible. Toutefois, vu le nombre important de variations détectées par cette technique, l'identification de la mutation pathogène responsable du phénotype nécessite une analyse rigoureuse des données générées. Dans ce but, différentes stratégies peuvent être adoptées (Gilissen et al., 2012; Rabbani et al., 2012). Parmi lesquelles, on distingue :

- **La stratégie couplant une analyse de liaison au séquençage de l'exome,** applicable dans le cas d'une maladie monogénique qui ségrège dans une

famille constituée de plusieurs sujets atteints et non atteints. Dans ce cas, le séquençage vise à identifier une variation partagée par les sujets atteints et absente chez les non atteints. Dans le cas d'une famille consanguine présentant une maladie autosomique récessive, la cartographie par homozygotie est, tout d'abord, réalisée afin de localiser une ou plusieurs régions génomiques d'intérêt. En parallèle, le séquençage de l'exome d'un des patients de la famille est effectué, afin de détecter les variations codantes qui se trouvent au niveau du génome de ce dernier. Parmi les nombreuses variations de séquence identifiées, la mutation morbide qui est supposée être homozygote par descendance chez les patients, est recherchée au niveau des régions d'homozygotie.

- La stratégie « double-hit » utilisée pour l'identification du gène responsable de la maladie autosomique récessive d'un sujet issu d'un mariage non consanguin. Dans ce cas, outre les variations homozygotes, les variations hétérozygotes composites sont recherchées.
- **La stratégie d'intersection des variations détectées par le séquençage des exomes de deux sujets atteints de la même maladie.** Dans ce cas, l'homogénéité génétique, à laquelle on s'attend, oriente l'analyse vers la recherche d'un même gène muté chez les deux sujets.
- La stratégie des trios ou stratégie *de-novo*. Elle est adoptée surtout pour l'identification de mutations sporadiques grâce au séquençage des exomes d'un sujet et de ses parents. Cette stratégie peut être également adoptée dans le cas de maladies récessives ségrégeant dans des petites familles (cas où la cartographie par homozygotie ne permet pas d'obtenir des résultats significatifs).
- Enfin, la stratégie du gène candidat peut être combinée au séquençage de l'exome, s'il s'agit d'une maladie dominante présentée par un cas isolé (Gilissen et al., 2012; Rabbani et al., 2012).

Dans le cadre de ce projet de thèse visant à identifier des gènes responsables de dysplasies osseuses autosomiques récessives dans des familles libanaises consanguines, deux stratégies ont été adoptées. La première a consisté en une intersection des variations détectées par le séquençage des exomes de deux patients non apparentés, atteints de la même pathologie osseuse (cas des familles A et B), tandis que la deuxième a été une combinaison, au sein d'une même famille, d'une stratégie de cartographie par homozygotie et du séquençage de l'exome de l'un des patients (cas des familles C et D).

## 2. Les patients ayant participé à ce projet

Cinq familles libanaises consanguines et non apparentées, présentant différentes formes de dysplasies osseuses ont volontairement donné leur accord pour participer à ce travail. Le suivi de ces patients ainsi que leurs prélèvements sanguins ont été réalisés à l'UGM.

### 2.1. Familles A et B (Figure 9)

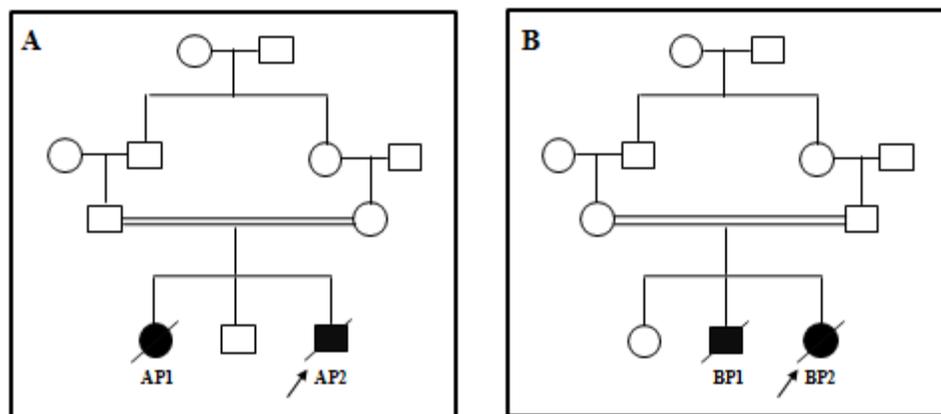


Figure 9: Les pedigrees des familles A et B

Les deux familles A (Mégarbané et al., 2008) (annexe 2) et B (Mégarbané et al., 2013) (annexe 3) présentent une dysplasie spondylo-dysplastique autosomique récessive sévère, caractérisée par un retard de croissance pré- et post-natal, une hypotonie axiale, un abdomen proéminent, des côtes courtes, des membres courts et une dysmorphie faciale incluant un front saillant, des oreilles bas implantées, un nez court et des narines antéversées.

Sur les radiographies du squelette, une platyspondylie sévère qui s'améliore avec le temps, des os trapus avec un élargissement métaphysaire et un retard de maturation épiphysaire, ont été notés (Figure 10).

Les patients de la famille A sont décédés suite à une insuffisance respiratoire (à l'âge de 9 mois pour le patient AP1 et 2 ans pour le patient AP2). Les patients de la famille B, BP1 et BP2, sont décédés, à l'âge de 2 ans suite à une insuffisance cardiaque.

### **2.1.1. La patiente AP1**

La patiente AP1 est née à terme de parents cousins issus de germains. A la naissance, elle pesait 1970 g (<3<sup>ème</sup> percentile) et avait une taille de 39 cm (3<sup>ème</sup> percentile) et un Périmètre Crânien (PC) de 32 cm (3<sup>ème</sup> percentile). L'examen clinique a révélé des oreilles bas implantées, une choane droite étroite, un abdomen proéminent, un petit thorax et des membres courts. Les radiographies ont montré un thorax en cloche, un raccourcissement des côtes avec élargissement des extrémités distales, une platyspondylie, un raccourcissement des os longs, des métaphyses fémorales distales élargies et un retard de maturation épiphysaire. L'ultrasonographie du cerveau et des reins, l'échocardiographie ainsi que les examens ophtalmologiques, étaient normaux. La patiente AP1 souffrait fréquemment de tachypnée et est décédée à l'âge de 9 mois suite à une insuffisance respiratoire.

### 2.1.2. Le patient AP2

Le patient AP2 a 3 ans de moins que sa sœur atteinte (AP1). A la naissance, il pesait 2270 g (3<sup>ème</sup> percentile) et avait une taille de 41 cm (3<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 34 cm (15<sup>ème</sup> percentile). Il présentait une hypotonie axiale, une fontanelle large, un front saillant, des oreilles bas implantées, un nez court avec des narines antéversées, un philtrum profond, un thorax étroit et des membres courts. Les radiographies ont montré un thorax en cloche, un raccourcissement des côtes avec élargissement des extrémités distales, une platyspondylie, un raccourcissement des os longs, des métaphyses fémorales distales légèrement élargies et une absence de maturation épiphysaire des genoux. Les résultats de l'examen ophtalmologique, de l'échocardiographie, du bilan sanguin et du caryotype étaient tous normaux. A l'âge de 2 semaines, il a développé une tachypnée transitoire n'ayant nécessité aucun traitement. A l'âge de 9 mois, son poids était de 6,2 Kg (<3<sup>ème</sup> percentile), sa taille de 60 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et son PC de 45 cm (50<sup>ème</sup> percentile). Les radiographies osseuses ont montré une platyspondylie moins sévère que celle observée à la naissance, des fémurs légèrement courbés, des tarses non minéralisées et un retard de maturation épiphysaire. A l'âge de 18 mois, il pesait 10 Kg (10<sup>ème</sup> percentile), sa taille était de 68 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et son PC de 46,4 cm (10<sup>ème</sup> percentile). Il était toujours hypotonique, présentait une hyperlaxité ligamentaire et souffrait de crises fréquentes de tachypnée et de bronchiolite. Son thorax était étroit avec un pectus carinatum. Ses examens radiologiques ont montré des côtes horizontales, une légère cyphose, une diminution de la distance interpédiculaire au niveau des vertèbres L4 et L5, un acétabulum horizontal et un léger élargissement des métaphyses fémorales distales.

### 2.1.3. Le patient BP1

Le patient BP1 est né à terme de parents cousins issus de germains. A la naissance, son poids était de 2,6 Kg (5<sup>ème</sup> percentile) et sa taille de 41 cm (<3<sup>ème</sup> percentile). La présence de membres courts était notée dès la naissance. L'analyse

de son dossier clinique rapporte un visage arrondi et un nez aplati. Les examens radiologiques réalisés à l'âge de 9 mois ont montré des côtes courtes, une platyspondylie, une diminution de la distance interpédiculaire au niveau des vertèbres lombaires, des ischions hypoplastiques, un raccourcissement des os longs qui présentaient également un modelage anormal, un retard de maturation épiphysaire et une cardiomégalie. A l'âge de 17 mois, il a eu une pneumonie sévère. L'échocardiographie a révélé une hypokinésie ventriculaire globale gauche sévère, une dilatation de l'atrium droit et une hypertension pulmonaire. A l'âge de 20 mois, les examens radiologiques ont montré des os wormiens, une platyspondylie modérée, des vertèbres légèrement ovoïdes, des fémurs légèrement courbés, une agénésie partielle du sacrum et un retard de l'âge osseux. Le patient BP1 est décédé à l'âge de 2 ans d'une insuffisance cardiaque.

#### **2.1.4. La patiente BP2**

Née à terme, la patiente BP2 pesait 1,9 Kg (<3<sup>ème</sup> percentile) et avait une taille de 40 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et des membres courts. A l'âge de 9 mois, lors de sa 1<sup>ère</sup> consultation à l'UGM, elle pesait 6,6 Kg (25<sup>ème</sup> percentile), avait une taille de 56 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 43 cm (35<sup>ème</sup> percentile). Elle était hypotonique et présentait une fontanelle antérieure géante, un front saillant, un nez aplati avec des narines anterversées, des oreilles bas implantées, un cou court, un thorax étroit, un abdomen proéminent et un raccourcissement rhizomélisque des membres. Les signes radiologiques étaient les mêmes que chez son frère. Le caryotype était normal (46,XX). A l'âge de 18 mois, une cardiomégalie sévère a été diagnostiquée après un épisode de cyanose. La patiente BP2 est décédée à l'âge de 2 ans d'une insuffisance cardiaque.



**Figure 10: Données radiologiques des patients BP2 à 9 mois (A,C,E) et AP2 à la naissance (B, F) et à 3 mois (D), montrant une platyspondylie et un retard d'ossification épiphysaire.**

## 2.2. Famille C

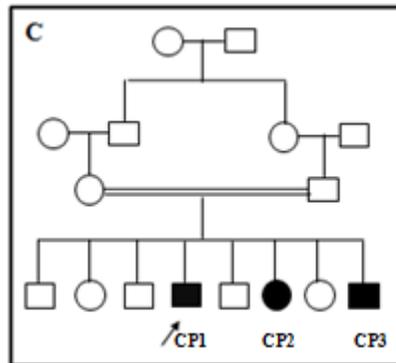
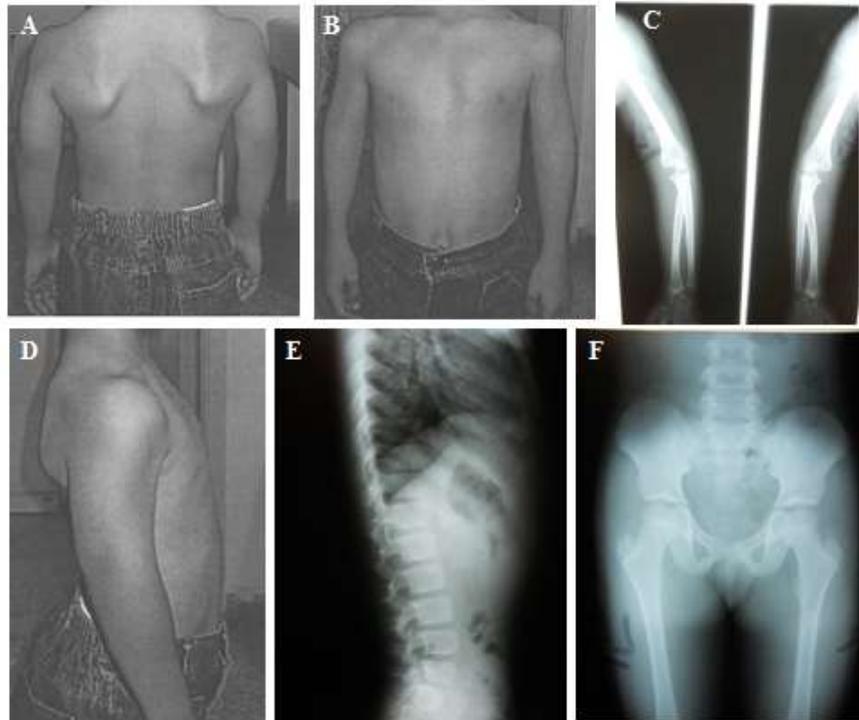


Figure 11: Le pedigree de la famille C

Les patients de la famille C (Figure 11) présentent une nouvelle forme de dysplasies rhizoméliques caractérisée par un retard statural disproportionné, un aspect trapu, un thorax plat, un canal vertébral étroit, de petites épiphyses fémorales et une brièveté des membres (Figure 12). Les données cliniques et radiologiques de ces patients évoquent une dysplasie rhizomélique qui n'entre pas dans un cadre connu. Cependant, la présence de certains critères d'hypochondroplasie nous a incités à rechercher, chez la patiente CP2, les mutations du gène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), gène majeur responsable de l'hypochondroplasie. Ce test a été réalisé, à l'hôpital Necker enfants-malades et n'a révélé aucune mutation. L'aspect général du pedigree suggérant une transmission autosomique récessive et le résultat normal de l'étude moléculaire du *FGFR3*, nous ont orientés vers la recherche d'un autre gène impliqué dans cette forme de dysplasies osseuses.



**Figure 12 : Photos et radiographies du patient CP3 à 9 ans. (A, B, D) photos montrant un aspect trapu, un thorax étroit et une rhizomélie franche au niveau des membres supérieurs. (C, E, F) : Radiographies montrant (C) une brièveté des membres, (D) un canal thoracique étroit (E) et de petites épiphyses fémorales**

## 2.3. Famille D (Figure 13)

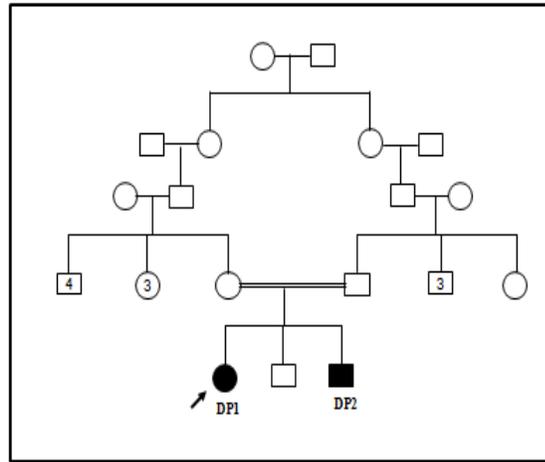


Figure 13: Le pedigree de la famille C.

Les patients de la famille D (Mégarbané et al., 2012) (cf. annexe 4) présentent une avance staturale, une hyperlaxité ligamentaire, une arachnodactylie, des pieds plats, une diminution de la force musculaire, une myopie, un astigmatisme, une hernie inguinale et une dysmorphie faciale caractérisée par un visage long et triangulaire, un front saillant, un télécanthus, un ptosis, des oreilles larges, un nez long, un palais ogival étroit, une longue et fine luette. Ces patients ne présentent pas de déficience intellectuelle.

### 2.3.1. La patiente DP1

La patiente DP1 (Figure 14) est née à terme de parents (cousins du second degré) normaux âgés de 28 ans (la mère) et 37 ans (le père). Sa taille, son poids et son PC à la naissance ne sont pas connus mais sont considérés comme normaux par les parents. Le résultat de l'échocardiographie était normal. Les examens radiologiques ont montré une déviation latérale de la 2<sup>ème</sup> phalange moyenne droite et un aspect anormal de la phalange distale du 5<sup>ème</sup> doigt de la main droite. De plus, un âge osseux avancé et un hallux vagus bilatéral, ont été constatés (Figure 15).



**Figure 14:** Photos de la patiente DP1 montrant (A) la dysmorphie faciale, (B) l'hallux vagus bilatéral et (C) l'arachnodactylie et l'absence de la redondance cutanée.

### 2.3.2. Le patient DP2

Le patient DP2 a 5 ans de moins que DP1. A la naissance, il présentait un pied droit en varus corrigé ensuite par une intervention chirurgicale. A l'âge de 3 ans, il a été opéré d'une hernie inguinale gauche. Ce patient a été examiné, pour la 1<sup>ère</sup> fois à l'UGM, à l'âge de 5 ans. Il avait une taille de 122,5 cm (>97<sup>ème</sup> percentile), un poids de 22 kg (90<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 53 cm (90<sup>ème</sup> percentile). Il présentait, outre les mêmes signes cliniques que sa sœur (DP1), des oreilles larges et un pectus excavatum important. A l'âge de 7 ans, son poids était de 30 kg (97<sup>ème</sup> percentile), sa taille de 135 cm (>97<sup>ème</sup> percentile) et son PC de 53,7 cm (90<sup>ème</sup> percentile). Il présentait une diminution de sa force musculaire et une hyperlaxité articulaire. L'examen ophtalmologique a révélé une acuité visuelle de 20/25 $\lambda$ OD ( $\_1,5\_35$ ) et 20/25 $\lambda$ OS ( $\_1,25$ ). Les examens neurologiques, cardiaques et abdominaux étaient normaux. L'âge osseux était avancé par rapport à l'âge chronologique

Les patients de cette famille ont été régulièrement suivis. Un caryotype, une échocardiographie, une série d'examen cliniques, radiologiques et sanguins ont été effectués, pour chacun de ces patients, et n'ont montré aucune anomalie. De plus, une Hybridation Génomique Comparative (CGH) à l'aide de puces à ADN a été réalisée pour la patiente DP1 et n'a révélé aucune Variation en Nombre de Copies (CNV) pathogénique. Par ailleurs, l'exclusion de l'implication des gènes *FBN1* (Fibrillin1) [MIM 134797], *FBN2* (Fibrillin 2) [MIM 612570], *TGFBR1* (Transforming Growth factor  $\beta$  Receptor 1) [MIM 190181], *TGFBR2* (Transforming Growth factor  $\beta$  Receptor 2) [MIM 190182], responsables d'avances staturales et du gène *CHST14* (Carbohydre (N-acetyl)galactosamine 4-0) Sulfotransferase 14 ) [MIM 608429] responsable du syndrome d'Ehlers-Danlos type musculocontracturale, a été réalisée par le séquençage direct de leurs séquences codantes et de leurs jonctions introns-exons ainsi que par MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).



**Figure 15** : Les radiographies de la patiente DP1 montrant à l'âge de 11 ans (A), une arachnodactylie, et à l'âge de 13 ans (B), un hallux valgus bilatéral.

## 2.4. Famille E (Figure 16)

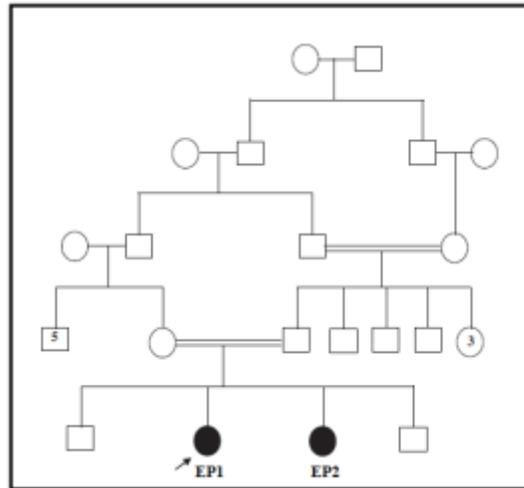


Figure 16: Le pedigree de la famille E

Les patients de la famille E sont atteints d'un syndrome caractérisé par une petite taille et des malformations squelettiques et craniofaciales diverses.



Figure 17: Photos de la patiente EP1 à l'âge de 4 ans (A), 8 ans (B) et 18 ans (C).

### 2.4.1. La Patiente EP1 :

La patiente EP1 (Figure 17) est née à terme de parents cousins issus de germains en bonne santé. Elle pesait 2,1 Kg (<3<sup>ème</sup> percentile) et avait une taille de 44 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 33 cm (10<sup>ème</sup> percentile). Son examen clinique a révélé un hypertélorisme, un nez aplati, des oreilles bas implantées et des extrémités courtes et un pli palmaire unique bilatéral.

Les principaux signes cliniques consistent en une macrocéphalie, un pli palmaire unique bilatéral, une brachydactylie, une clinodactylie du 5<sup>ème</sup> doigt, un cou court et une dysmorphie faciale définie par un hypertélorisme, des fentes palpébrales orientées en haut et en dehors, un nez court avec des narines antéversées et un palais ogival. Les signes radiologiques comportent un raccourcissement mésomélique des membres supérieurs, des cubitus plus courts que les radius; des phalanges, des métacarpiens et métatarsiens courts et larges, une clinodactylie de la phalange moyenne, des vertèbres légèrement ovoïdes et une vertèbre T5 en papillons (Figure..A-C). L'aspect du crâne, du sternum et des côtes est normal. Les organes génitaux sont normaux. Les résultats de l'échographie abdominale et de l'échocardiographie n'ont révélé aucune anomalie. Le caryotype de cette patiente est normal (46,XX). EP1 a été examinée, pour la 1<sup>ère</sup> fois, à l'âge de 4 ans, elle présentait un poids de 13,2 kg (10<sup>ème</sup> percentile), une taille de 88 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 48,4 cm (10<sup>ème</sup> percentile). A l'âge de 10 ans, des épiphyses en forme de cônes au niveau des phalanges moyennes des 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> doigts des deux mains ont été détectés (Figure..D). EP1 a atteint sa puberté à l'âge de 12 ans. A l'âge de 17 ans, la patiente EP1 avait une taille de 140 cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 51 cm (25<sup>ème</sup> percentile). Outre les critères cliniques déjà mentionnés, la patiente présentait une limitation de la supination et la pronation des avant bras. Les bilans sanguin et urinaire ainsi que les examens neurologiques et ophtalmologiques étaient normaux.

### 2.4.2. La patiente EP2

La patiente EP2 est née à terme. A la naissance, son poids était de 2,750 g (15<sup>ème</sup> percentile), sa taille de 47 cm (25<sup>ème</sup> percentile) et son PC de 36 cm (75<sup>ème</sup> percentile). Lors de sa 1<sup>ère</sup> consultation à l'âge de 5 mois, elle pesait 5,6 Kg (25<sup>ème</sup> percentile), elle avait une taille de 58cm (<3<sup>ème</sup> percentile) et un PC de 41,5 cm (50<sup>ème</sup> percentile). Outre les critères présentés par sa sœur (EP1), cette patiente avait des oreilles larges et des malformations au niveau de sa main droite qui se manifestent par une syndactylie combinée avec une polydactylie mésoaxiale des 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> doigts. A 2 ans, elle avait une taille de 77 cm et un PC de 49 cm. Son caryotype était normal (46,XX). A l'âge de 15 ans (lors de sa dernière consultation), sa taille était de 144 cm. Elle avait atteint sa puberté à l'âge de 13 ans.



**Figure 18 :** Les examens radiologiques de la patiente EP1 à l'âge de 4 ans. (A-C) montrant (A) des vertèbres légèrement ovoïdes et une vertèbre T5 en aile de papillon (indiquée par une flèche), (B, C) une mésomélie des membres supérieurs, des cubitus plus courts que les radius, des phalanges, métacarpes et métatarses courts et larges ainsi qu'une clinodactylie du 5<sup>ème</sup> doigt. A l'âge de 10 ans, ces radiographies ont montré des épiphyses en forme de cônes au niveau des phalanges moyennes des 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> doigts des deux mains (D)

### 3. Les méthodes

#### Etude moléculaire

#### 3.1. Extraction de l'ADN à partir du sang selon la méthode

##### saline

L'extraction de l'ADN selon la méthode saline repose sur le principe de la précipitation des protéines à l'aide d'une concentration élevée de sel (Miller et al., 1988). Le protocole de la technique est représenté ci-dessous, les réactifs sont disponibles en annexe (annexe 5).

##### *Le protocole*

Le sang, prélevé sur EDTA, est laissé 1 heure à température ambiante puis maintenu à 4°C pendant un jour pour faciliter la lyse des globules rouges.

L'extraction de l'ADN est réalisée par la méthode saline, selon le protocole suivant :

La lyse des globules rouges est, tout d'abord, effectuée par ajout du *Blood Lysis Buffer* BLB (1X), suivi d'une agitation mécanique et d'une incubation à froid pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 min à 2500 t/min, le culot est récupéré et soumis à plusieurs lavages par du BLB puis resuspendu et dissout dans 0,5 ml de BLB.

La lyse des globules blancs contenus dans le culot est ensuite réalisée par ajout d'un mix formé de 4 ml du *White Lysis Buffer* WLB (agent favorisant la lyse des membranes cellulaires des globules blancs), 200 µl de la Protéinase K (PK pour la dégradation des protéines) et 200 µl du Sodium Dodécyl Sulfate SDS (détergent toxique capable de détruire les membranes nucléaires), pour 10 ml de sang. Une incubation, dans un bain-marie à 37°C à 269 rotations par minutes (rpm), pour une nuit, est ensuite nécessaire pour faciliter cette lyse.

Dans un second temps, les protéines dégradées sont précipitées par ajout d'un volume de NaCl sursaturé (6M) (1.5 ml de NaCl pour chaque 10 ml de sang), suivi d'une agitation manuelle forte durant 15 sec jusqu'à la formation d'une mousse blanche. Une centrifugation de 15 min à 3500 rpm précipite les sels et les protéines. Le surnageant est ensuite transvasé dans un nouveau tube et l'ADN est précipité par ajout d'éthanol absolu (en volume égal au double de celui du surnageant). Une méduse d'ADN se forme et flotte à la surface du liquide. Cette dernière, pêchée à l'aide d'une pipette pasteur boullée et stérile puis lavée dans de l'éthanol à 70% deux fois à la suite, est transvasée dans un tube nouveau puis resuspendue dans un volume moyen de 500 µl de Tris-EDTA TE (ce volume n'est pas standard mais dépend de la taille de la méduse). Enfin, le tube est incubé dans un bain-marie à 65°C afin de détruire les nucléases puis mis en rotation pendant 48 heures pour dissoudre complètement la méduse.

### **3.2. Le dosage de l'ADN**

La concentration de l'ADN extrait est déterminée en mesurant, à l'aide d'un spectrophotomètre *Nanodrop ND-1000*, l'absorbance à 260 nm des solutions obtenues, sachant que 1 U DO correspond à 50 µg/ml d'ADN.

Sa pureté est évaluée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm et en effectuant le rapport DO 260 nm/DO 280 nm, tout en notant que les extraits protéiques, pouvant contaminer l'ADN, absorbent à 280 nm.

### **3.3. L'amplification de l'ADN par *Polymerase Chain Reaction***

#### **« PCR »**

Inventée par Kary Mullis en 1985, la PCR est une technique d'amplification de l'ADN. Elle repose sur une succession de réactions de réplication *in vitro* permettant de générer, à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN (ADN matriciel), de multiples copies d'un fragment d'ADN particulier (séquence ciblée) (Mullis et al.,

1986). La PCR est réalisée dans un mélange réactionnel comprenant l'extrait d'ADN (environ 100ng), la Taq polymérase (qui est une polymérase thermorésistante), des cations bivalents  $Mg^{2+}$  (cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase), les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) et les amorces oligonucléotidiques en excès dans une solution tampon. Les tubes, contenant le mélange réactionnel, sont soumis à une trentaine de cycles de température dans le bloc chauffant d'un thermocycleur qui permet la programmation de la durée et de la succession de ces cycles.

Trois différentes étapes constituent un cycle de PCR :

- a- La dénaturation de l'ADN permettant d'obtenir des matrices simple brins.
- b- L'hybridation des amorces oligonucléotidiques spécifiques.
- c- L'élongation ou la polymérisation de brins d'ADN complémentaires à l'ADN matrice, à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

### *Les amorces*

Les amorces sont deux oligonucléotides de synthèse, d'environ 20 à 25 pb, complémentaires aux bornes de la matrice à amplifier. Chaque amorce est caractérisée par une température de fusion ( $T_m$  pour melting temperature) qui représente la température à laquelle cette amorce s'hybride à sa cible. La  $T_m$  dépend de la composition de l'amorce en nucléotides, elle est égale à la somme  $[4(G+C) + 2(A+T)]$ . L'amplification, par PCR, d'une séquence donnée nécessite l'usage d'un couple d'amorces (sens et anti-sens) spécifiques, possédant des  $T_m$  voisines. Les amorces utilisées dans le cadre de ce projet figurent en annexe 6.

### *Le protocole*

La PCR est effectuée dans un mélange réactionnel de 50  $\mu$ L, contenant 100 ng d'ADN génomique, 100 ng de chaque amorce sens (F pour Forward) et anti-sens (R pour Reverse), 0.25 mM de dNTP, 1.5 mM du  $MgCl_2$ , du tampon 1X et 0.5 unités de Taq polymérase (Invitrogen). Dans certains cas, 5  $\mu$ L de DMSO (diméthyl

sulfoxyde) sont ajoutés au mélange pour faciliter l'amplification des amplicons riches en GC.

Un tube témoin négatif, constitué du mélange réactionnel, est préparé dans les mêmes conditions, sans ajout de la matrice initiale d'ADN. Il permet de s'assurer de l'absence de contaminations par de l'ADN exogène.

Les tubes contenant les mélanges réactionnels sont placés dans un thermocycleur. Un programme spécifique de cycles et de températures, présenté ci-dessous (Tableau 2), est lancé.

**Tableau 2 : Le programme utilisé pour la réaction de PCR. Min : minute. Sec : seconde.**

Etape	Nombre de cycles	Température (en °C)	Durée
<b>Activation de la Taq</b>	1 cycle	95	5 min
<b>Dénaturation</b>	30 cycles	95	30 sec
<b>Hybridation</b>		Tm	30 sec
<b>Elongation</b>		72	30 sec
<b>Extension</b>	1 cycle	72	10 min
<b>Hold</b>		4	∞

### 3.4. La vérification de la PCR

Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) puis détectés sous UV, grâce au *SYBR® Safe DNA Gel Stain*, qui est un agent intercalant de l'ADN. L'amplicon est représenté par une bande de taille précise qui dépend de la longueur de la séquence amplifiée. Un marqueur de taille est migré en parallèle avec les produits de PCR, pour permettre d'attribuer à chaque bande une taille approximative.

### 3.5. Le séquençage fluorescent direct

Le séquençage fluorescent direct, effectué selon la méthode décrite par Sanger, consiste à incorporer, lors de la polymérisation d'un brin d'ADN, des terminateurs de séquence marqués. Il s'agit des didésoxyribonucléotides fluorescents (ddNTP\*) qui sont des nucléotides différents des dNTP par l'absence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3' du ribose. Une fois un ddNTP\* est incorporé, la synthèse du brin d'ADN est interrompue. En parallèle, le fragment d'ADN néosynthétisé est marqué par une couleur qui dépend du type de ddNTP\* (ddATP\*, ddCTP\*, ddGTP\* ou ddTTP\*) et de la chimie utilisée. La méthode de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire, par l'ADN polymérase, des ddNTP\* parmi les nucléotides présents dans le milieu réactionnel. La réaction de séquences génère donc des fragments de tailles différentes qui sont marqués au niveau de leur extrémité 3'. L'excès d'amorces, de dNTP et de ddNTP\*, sont ensuite éliminés par purification. Les produits purifiés sont enfin séparés par électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes. L'induction par une source laser de ces fragments marqués permet de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice après enregistrement et analyse spectrale de la fluorescence émise.

#### *Le protocole*

Le protocole consiste à effectuer une réaction de séquence à partir d'un amplicon d'ADN purifié, suivie d'une réaction de séquence qui sera purifiée puis analysée après migration par électrophorèse sur capillaire.

#### **A- L'amplification par PCR d'une séquence d'ADN**

#### **B- La purification des amplicons (post-PCR)**

La purification des produits de PCR permet de se débarrasser de l'excès d'amorces et de dNTP. Elle est réalisée à l'aide du kit *EXOSAP IT* (Amersham) qui renferme une exonucléase I et une phosphatase. L'exonucléase I catalyse l'hydrolyse

séquentielle des nucléotides de l'ADN double brin dans le sens 5' → 3'. L'hydrolyse des nucléotides en nucléosides est ensuite complétée par l'action de la phosphatase alcaline.

Selon l'intensité de la bande obtenue sur le gel d'électrophorèse, 1 ou 1,5 µL d'*EXOSAP IT* sont ajoutés à 2 ou 4 µL de produits de PCR, respectivement. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur : 15 min à 37°C (température à laquelle les enzymes du kit sont actives) puis 15 min à 80°C (pour inactiver les enzymes).

### C- La réaction de séquence

La réaction de séquence est réalisée dans un mélange réactionnel de 10 µL contenant le produit de PCR purifié (3 à 5,5 µL), 1,6 µL de l'amorce sens ou anti-sens à 2 µM (selon le sens du séquençage), 1,5 µL de tampon et 1 µL de Big Dye (*Big Dye Terminator kit*, Applied Biosystems) contenant l'enzyme ADN polymérase, des dNTP et des ddNTP marqués.

Le mélange est ensuite incubé dans un thermocycleur selon le programme du tableau ci-dessous (Tableau 3).

**Tableau 3 : Le programme utilisé pour la réaction de séquence**

Etape	Nombre de cycles	Température (en °C)	Durée
<b>Activation de la Taq</b>	1 cycle	96	5 min
<b>Dénaturation</b>	30 cycles	96	10 sec
<b>Hybridation</b>		55	5 sec
<b>Elongation</b>		60	4 min
<b>Hold</b>		4	∞

### D- La purification de la réaction de séquence

La réaction de séquence est purifiée selon le principe de la chromatographie d'exclusion qui permet de séparer les différents constituants du produit en fonction

de leurs tailles. Ainsi, les dNTP, les ddNTP\* et les amorces non incorporés (qui ont une petite taille) s'infiltreront à l'intérieur des billes où ils seront retenus plus longtemps, tandis que les fragments d'ADN amplifiés et marqués sont élués en premier.

Le produit de la réaction de séquence est complété à 30  $\mu$ L par l'eau, puis déposé sur un puit de la plaque de séphadex hydratée (représentant une colonne de billes). Après une centrifugation à 2500 rpm pour 10 min, le produit purifié (l'éluat) est récupéré dans une nouvelle plaque.

### **E- Electrophorèse capillaire et analyse des résultats**

La plaque contenant les produits de la réaction de séquence purifiés est ensuite lancée sur un séquenceur automatique *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les données brutes générées sont analysées à l'aide du logiciel *DNA Sequencing Analysis Software*.

## **3.6. Le génotypage par microsatellites**

Le génotypage est la détermination des allèles portés par un individu pour un marqueur moléculaire étudié. Ce dernier, étant un « locus polymorphe », il est capable de nous renseigner sur le génotype de l'individu qui le porte et d'informer sur le génotype d'un ou de plusieurs locus voisins. Le polymorphisme d'un marqueur peut être de deux types : un polymorphisme de séquence ou un polymorphisme de nombre d'unités de répétition dans les régions répétées. Le typage d'un individu pour un microsatellite donné consiste à déterminer l'allèle convenable, qui correspond au nombre de répétitions d'un motif précis chez cet individu et donc à la taille du marqueur chez ce dernier.

Il s'agit d'une amplification par des amorces fluorescentes, de la région génomique du marqueur, suivie d'une électrophorèse capillaire pour séparer les variantes alléliques qui diffèrent par leurs tailles. Enfin, l'excitation, par une source laser, des bandes fluorescentes migrées permet leur détection.

***Le protocole***

La PCR est effectuée dans un volume final de 7,5 µl par échantillon, comprenant 1 µL d'ADN (à 40ng/µL), 0,25 µL d'une solution contenant les amorces sens et anti-sens (à 5 pmoles/µL), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,75 µL du tampon 10 X spécifique de la taq GOLD (Applied Biosystems) et 0,06 µL de la taq GOLD (5U/µL).

Les tubes contenant les mélanges réactionnels sont ensuite placés dans un thermocycleur. Un programme spécifique présenté ci-dessous (Tableau 4), est lancé.

**Tableau 4 : Le programme utilisé pour l'amplification par PCR de microsatellites lors de notre étude.**

<b>Étape</b>	<b>Nombre de cycles</b>	<b>Température (en °C)</b>	<b>Durée</b>
<b>Activation de la Taq Gold</b>	1 cycle	95	12 min
<b>Dénaturation</b>	10 cycles	94	15 sec
<b>Hybridation</b>		55	15 sec
<b>Elongation</b>		72	45 sec
<b>Dénaturation</b>	20 cycles	89	15 sec
<b>Hybridation</b>		55	15 sec
<b>Elongation</b>		72	45 sec
<b>Extension</b>	1 cycle	72	10 min
<b>Hold</b>		4	∞

Un mix de volume 12,5 µl, comprenant 12 µl de formamide et 0,5 µl de ROX400 (marqueur de taille), est distribué dans chaque puit de la plaque à génotyper. A ce mix est ajouté 1 µl de l'ADN amplifié. Une étape de dénaturation de l'ADN est ensuite réalisée par incubation à 95°C pendant 5 min, suivie d'un choc thermique de

5 min dans un bain de glace afin de figer l'ADN amplifié sous forme de monobrins. Enfin, le génotypage est effectué sur un séquenceur du type ABI PRISM 310. Il est suivi d'une analyse des résultats par les logiciels *310 GeneScan* et le *Genotyper*.

### **3.7. Etude de liaison par puces d'ADN à SNP**

L'étude de liaison consiste à suivre la transmission, au sein de généalogies, d'une série de marqueurs génomiques conjointement avec le locus de la maladie. Dans le cadre de notre projet, l'étude de liaison a été réalisée à l'aide du kit *Affymetrix GeneChip® Human Mapping NspI 250 K Array* qui permet de couvrir le génome avec une densité de près de 262 000 SNP par puce d'ADN. Un marqueur SNP étant bi-allélique; il est représenté sur la puce par deux sondes (séquences d'oligonucléotides de 25 pb) correspondant chacune à un allèle. Le génotypage est basée sur le principe d'hybridation spécifique d'allèles.

#### ***Le Protocole***

L'analyse de liaison par puces à SNP a été réalisée selon les instructions figurant dans le manuel du kit utilisé. L'ADN génomique (250 ng) est, tout d'abord, digéré en fragments de tailles différentes, par l'enzyme de restriction *Nsp I*. Aux bouts cohésifs des segments digérés, sont ensuite liés des adaptateurs universels permettant une amplification pangénomique de l'ADN. Dans ce but, une PCR, utilisant des amorces spécifiques aux adaptateurs, est réalisée. Ses conditions sont optimisées de sorte à amplifier uniquement les fragments de taille comprise entre 200 et 1100 pb, correspondant aux séquences contenant les SNP couverts par le kit. Après amplification, l'ADN est fragmenté, marqué à l'aide d'un anticorps biotinylé puis hybridé sur la puce. Des étapes de lavage sont ensuite réalisées dans la station fluide de la plateforme Affymetrix, pour se débarrasser de l'ADN non hybridé.

Enfin, la révélation des anticorps biotinylés est effectuée par ajout de la streptavidine phycoérythrine (Figure 19).

Les signaux détectés sont analysés; le génotypage des SNPs est effectué par le logiciel *GeneChip Genotyping Analysis Software GTYPE* qui est fourni par Affymetrix. L'analyse de liaison est effectuée par l'un des logiciels bioinformatiques disponibles, dont *easyLINKAGE* et *Homozygosity Mapper*.

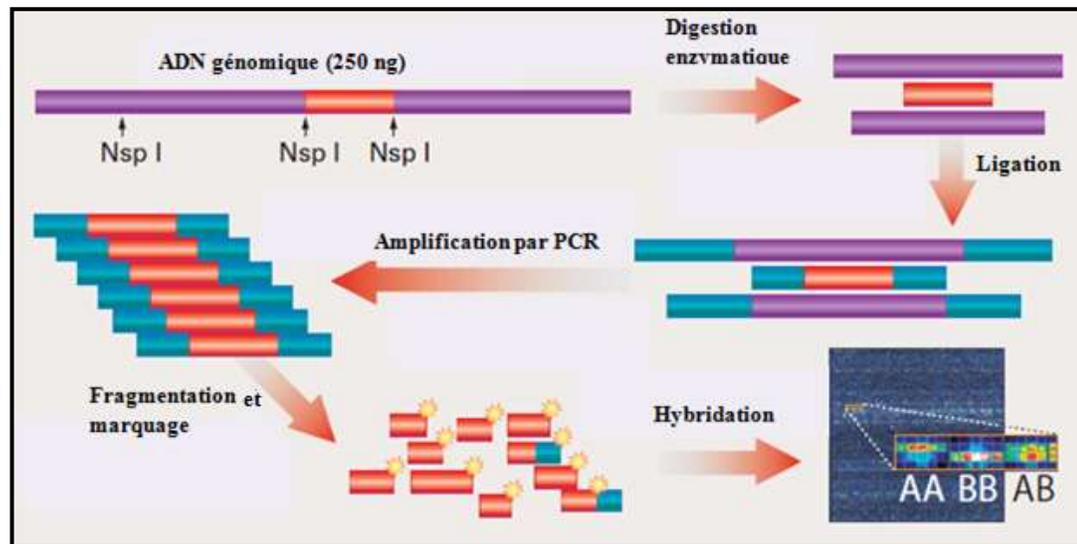


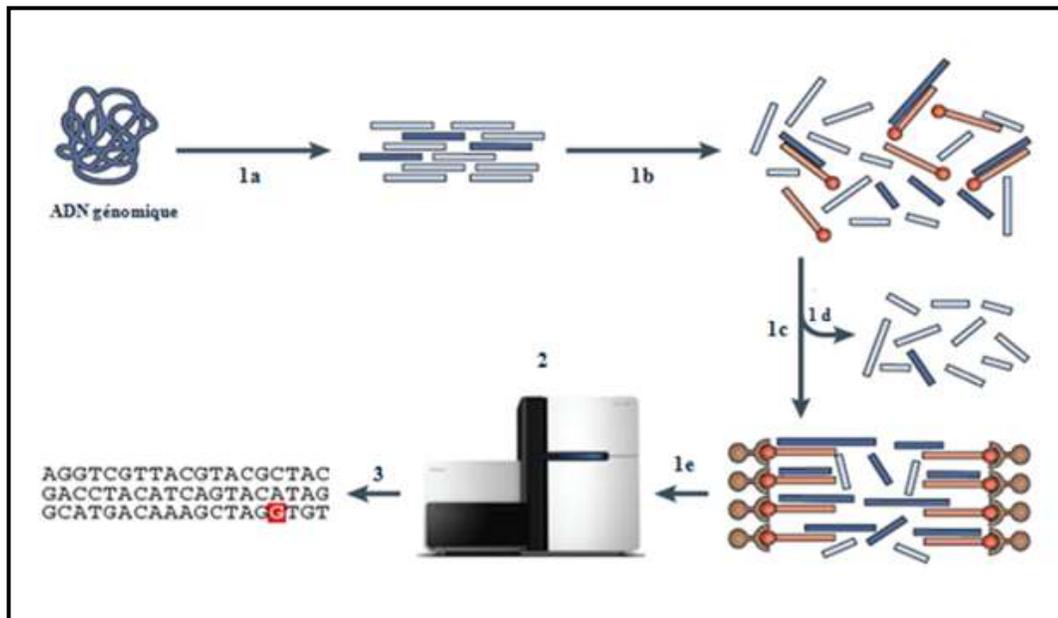
Figure 19: Le protocole de l'analyse de liaison par le kit Affymetrix GeneChip Human Mapping NspI 250K Array. Schéma extrait du manuel du kit.

### 3.8. Le séquençage de l'exome

Le séquençage de l'exome est une approche de séquençage à haut débit qui consiste à séquencer sélectivement tous les exons de tous les gènes humains connus ainsi que certaines régions qui codent pour des microARNs. L'exome permet également d'étudier les sites d'épissage canoniques qui sont localisés au niveau des jonctions introniques-exoniques.

### *Le protocole*

Le protocole comporte trois étapes essentielles : la préparation de la librairie d'ADN, le séquençage à haut débit et l'analyse des données générées. La combinaison spécifique des protocoles utilisés pour chacune de ces étapes distingue une plateforme d'une autre (Bamshad et al., 2011; Metzker, 2010) (Figure 20).



**Figure 20:** Schéma récapitulatif du protocole de séquençage de l'exome extrait et modifié du papier Bamshad et al., 2011 (Bamshad et al., 2011). (1) Les étapes de la construction de la librairie ; a : Fragmentation de l'ADN, b : Hybridation, c : Elution des fragments d'ADN capturés, d : lavage des fragments non hybridés, e : Enrichissement des fragments cibles et leur préparation à l'étape de séquençage. (2) Le séquençage à haut débit. (3) L'assemblage, l'alignement des séquences et la détection des variants.

#### **A- La préparation de la librairie d'ADN :**

L'ADN génomique extrait du sang périphérique est, tout d'abord, fragmenté en segments d'environ 200 pb, par sonication aux ultrasons ou par digestion enzymatique. Les extrémités des fragments d'ADN sont ensuite réparées puis liées à des adaptateurs universels, permettant l'amplification pangénomique de l'ADN.

L'utilisation d'adaptateurs contenant des codes-barres spécifiques à chaque échantillon permet le séquençage massif de plusieurs sujets en parallèle (Bamshad et al., 2011).

Les régions ciblées sont ensuite capturées pour être séquencées. La capture peut être réalisée par hybridation en phase solide ou liquide, selon le kit utilisé (Metzker, 2010). Dans le cas de notre projet, le kit « *Agilent Sureselect 50Mb* » a été utilisé (Figure 21).

Ce kit nécessite environ 3 µg d'ADN génomique de départ. Il comporte 635,250 sondes d'ARN et permet de capturer environ 51,6 Mb de séquences d'ADN génomique (Sulonen et al., 2011). Le protocole consiste à hybrider, en solution, les séquences génomiques d'intérêt à des sondes d'ARN biotinylées de taille égale à 120bp. Grâce au système biotine-streptavidine, les complexes ADN génomique/sondes d'ARN biotinylées sont capturés par des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Les séquences non hybridées sont ensuite éliminées par lavage alors que les régions hybridées aux billes sont éluées et enrichies par amplification pour être ensuite séquencées (Gnirke et al., 2009).

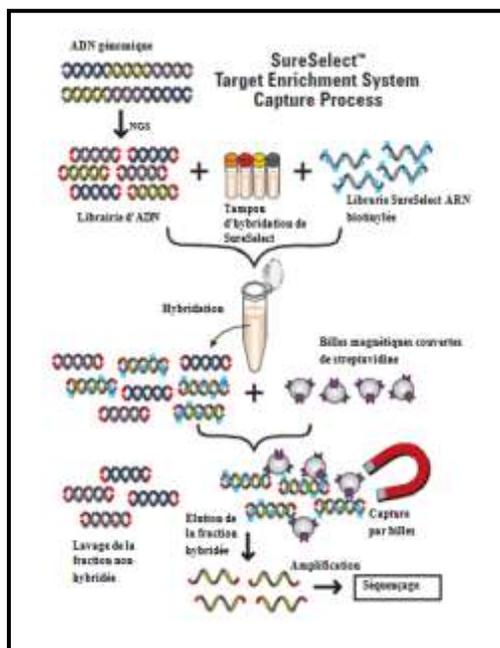


Figure 21: Le protocole de la capture par le kit «Agilent SureSelect 50Mb». Extrait du manuel Agilent SureSelect 50Mb.

### A- Le séquençage et la détection du signal :

Après la capture et l'enrichissement des séquences d'intérêt, leur séquençage massif est réalisé grâce à l'une des trois techniques de séquençage de nouvelle génération existantes. On distingue le séquençage avec des terminateurs réversibles (Illumina), le séquençage par ligation (Applied Biosystems) et le pyroséquençage (Roche) (Metzker, 2010). Dans le cas de notre projet, le séquençage a été réalisé sur la plateforme « *Illumina HiSeq2000* » qui consiste à utiliser, d'une façon cyclique, des terminateurs de séquence réversibles. Un cycle de séquençage comprend les trois phases suivantes : l'incorporation des nucléotides marqués, la détection du signal fluorescent et le clivage du groupement terminateur (Figure 22).

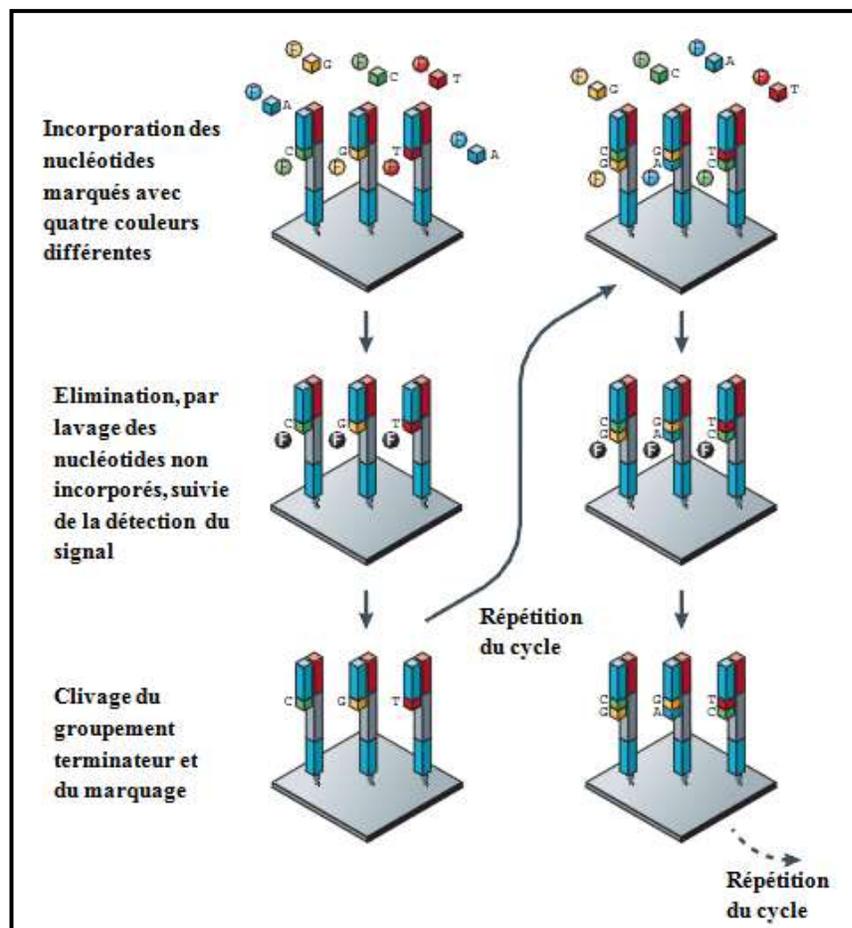


Figure 22: Le protocole du séquençage avec des terminateurs réversibles. Extrait et modifié de Metzker 2010 (Metzker, 2010).

**B- Le traitement des données générées par le séquençage de l'exome :**

Les images détectées par le séquençage à haut débit sont, tout d'abord, analysées avec le logiciel « *Illumina Data Analysis Pipeline Software 1.5* ». Les séquences générées sont ensuite filtrées selon leur score de qualité, puis alignées à la séquence de référence du génome humain « hg19 », par le logiciel *CLC Genomics Workbench 4*, afin de détecter les variants. L'annotation de ces derniers est ensuite réalisée à l'aide du logiciel *ANNOVAR*. Le taux de couverture minimal exigé est de 15X.

Les variants détectés sont enfin filtrés selon différents critères (cf. filtrage des résultats de l'exome), parmi lesquels le score de pathogénéicité qui est estimé par différents logiciels bioinformatiques dont *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org/>), *PolyPhen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), *phyloP* (<http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/>) et *Genomic Evolutionary Rate Profiling ++ (GERP++)* (<http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/>) (Cooper and Shendure, 2011).

**Etude de l'expression des gènes****3.9. L'extraction de l'ARN à partir du sang**

Après la lyse des globules rouges par le BLB, les ARN totaux sont extraits des lymphocytes à l'aide du kit TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), selon le protocole suivant :

Le culot de lymphocytes, isolé à partir du sang après la lyse des globules rouges, est tout d'abord resuspendu avec du BLB. Le comptage des globules blancs du culot est ensuite effectué sous microscope, sur une lame KOVA. En fonction du nombre total de cellules, un volume adéquat de trizol est ajouté et l'ensemble est incubé 10 min dans la glace, afin de lyser les membranes cellulaires et nucléaires, et de solubiliser les acides nucléiques. L'extraction de l'ARN est ensuite effectuée par le chloroforme qui crée un gradient de densité, permettant de fractionner le mélange en deux phases (organique et aqueuse) séparées par une mince couche de protéines et

d'ADN. Dans ce but, un volume de chloroforme, proportionnel à celui du trizol utilisé préalablement, est ajouté au mélange total qui est ensuite vortexé puis incubé 5 min dans la glace. La phase aqueuse est transvasée dans un nouveau tube et l'ARN est précipité par ajout d'isopropanol (volume à volume) suivi d'une incubation pendant 10 min à température ambiante et d'une congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit. Le culot d'ARN précipité est lavé à l'éthanol à 75 % puis resuspendu dans de l'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate) qui permet d'inactiver les ribonucléases. Enfin, 1  $\mu\text{L}$  d'une solution d'ARNs inhibitor est ajouté au volume total afin de mieux conserver l'ARN.

### **3.10. La synthèse de l'ADNc par *Reverse Transcriptase* (RT)**

La synthèse de l'ADNc (ADN complémentaire), à partir de l'ARN extrait d'un tissu, est réalisée à l'aide du kit *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La rétrotranscription de l'ARN, catalysée par la « transcriptase inverse », qui est une ADN polymérase ARN dépendante, est réalisée en présence d'amorces aléatoires capables de s'hybrider sur l'ensemble des ARN présents dans la matrice.

#### ***Le protocole***

Un volume correspondant à 1  $\mu\text{g}$  d'ARN est complété à 10  $\mu\text{L}$  avec de l'eau stérile. A cette solution, 10 mmol de dNTP et 250 ng d'amorces aléatoires sont ajoutés. La dénaturation de l'ARN est, tout d'abord, effectuée par incubation du mélange à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min, suivie d'un choc thermique dans la glace. Après dénaturation de l'ARN, 0,2  $\mu\text{mol}$  de dithiothreitol (DTT), 1  $\mu\text{L}$  de la RNAs inhibitor, 1  $\mu\text{L}$  de l'enzyme Mulv Reverse et 4  $\mu\text{L}$  de son tampon (5X) sont ajoutés au volume total.

L'ensemble est ensuite placé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 11 min à  $25^{\circ}\text{C}$ , suivies de 53 min à  $42^{\circ}\text{C}$  puis de 14 min à  $70^{\circ}\text{C}$ . Une fois la réaction terminée, le tube est placé dans la glace.

### **3.11. L'étude de l'expression des gènes *CORO7*, *PAM16* et *CORO7-PAM16* par RT-PCR**

Dans le but de détecter l'expression des gènes *CORO7*, *PAM16* et *CORO7-PAM16* au niveau des fibroblastes, chondrocytes et ostéoblastes, l'ARN de ces différentes cellules a été extrait. Une RT-PCR suivie d'une révélation sur gel d'électrophorèse ont été ensuite effectuées. Il s'agit d'une amplification par PCR des transcrits des gènes précis, à partir de l'ADNc. Dans ce but, des amorces spécifiques de chaque transcrit sont utilisées (Annexe7). Ces dernières sont complémentaires à deux séquences codantes qui sont séparées par un ou plusieurs introns, permettant ainsi d'éviter les amplifications de l'ADN génomique qui correspondent à des fragments de tailles très grandes. La PCR a été effectuée en conditions standards avec une  $T_m$  égale à 58 °C.

### **3.12. La PCR en temps réel**

La PCR en temps réel est une PCR qui permet de détecter et de quantifier, d'une façon fiable, un signal d'émission fluorescent qui est proportionnel à la quantité d'amplicons générés pendant la phase exponentielle de la réaction. Puisque la quantité du produit amplifié est en relation directe avec la quantité de la matrice de départ (ADN ou ADNc issu d'une RT), cette technique est largement utilisée pour la quantification d'une séquence d'ADN ou d'ADNc bien précise. La valeur du Cycle Threshold « Ct » correspondant au nombre de cycles de PCR nécessaires pour détecter un signal fluorescent significatif, est proportionnelle à la valeur initiale de la matrice.

On distingue deux principes différents pour la quantification des amplicons : les sondes fluorescentes spécifiques de la région amplifiée (cas de la chimie TaqMan) ou les agents fluorescents qui se lient à l'ADN double brin (cas du SYBR Green I) (Poitras and Houde, 2002).

Dans le cas de notre projet, l'étude quantitative de l'expression du gène *METTL21D* a été réalisée par qRT-PCR (RT-PCR quantitative) : A partir d'un échantillon d'ARN extrait du sang, l'ADNc est tout d'abord synthétisé par RT, dilué à 5 ng/ $\mu$ L puis amplifié en triplicat par PCR en temps réel, en utilisant le système SYBR Green PCR Master Mix Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pour la détection des amplicons.

Dans un mélange réactionnel de 20  $\mu$ L, 10 ng d'ADNc sont mélangés avec 10  $\mu$ L de Syber Green, et 4 ng de chacune des amorces sens (*METTL21D-RQ-F*) et anti-sens (*METTL21D-RQ-R*). Le volume est complété par de l'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate). Le programme utilisé consiste en une phase de dénaturation (10 min à 95°C) suivie de 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C, puis d'une phase de 20 min à 95°C. Le processus complet est réalisé dans ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et les données sont analysées par le logiciel ABI PRISM 7500 system SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

L'expression de *METTL21D* a été quantifiée relativement aux deux endogènes *ABL* et *ADORA*, qui sont deux gènes exprimés constitutivement par toutes les cellules.

## Etude Fonctionnelle

### 3.13. Le marquage immunohistochimique

L'immunohistochimie (IHC) est une technique de détection et de localisation, par le moyen d'anticorps (Ac) spécifiques, d'une ou de plusieurs protéines au niveau des cellules d'une coupe histologique.

#### *Le protocole*

Des coupes histologiques de fémurs de souris normales à différents stades embryonnaires (E16,5 – à la naissance – 2 semaines et 5 semaines) sont fixées avec du paraformaldéhyde (à 4%) puis incluses en paraffine.

Afin de les préparer au marquage, les coupes sont, tout d'abord, déparaffinées, en immergeant les lames dans 3 bains successifs d'histoclear (de 5 min chacun), puis hydratées dans des bains d'alcool de degré décroissant allant de 100% jusqu'à 30% (3 min par bain). Un bain de 5 min au PBS1X est ensuite réalisé pour assurer aux tissus des conditions proches de leur milieu physiologique.

Afin d'éviter le bruit de fond qui est dû à l'activité des peroxydases endogènes, 1 à 2 gouttes du réactif « Dual endo enzyme block » du kit Dako (ou de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3%) sont ajoutées par coupe et les lames sont ensuite incubées dans une chambre humide pour une durée de 30 min, puis lavées dans de l'eau distillée.

Après lavage, un bain au PBS-T (PBS-Tween 20) de 5 min est effectué et suivi d'une étape d'environ 1 heure de démasquage au BSA 2% (Bovine Serum Albumin), dans une chambre humide à température ambiante.

A ce stade, l'Ac primaire anti-Magmas (Abcam plc, UK), dilué extemporanément à 1/200 (dans une solution « Antibody Diluent » du kit Dako et 0.2% BSA), est ajouté aux coupes. Les lames sont ensuite incubées dans une chambre humide sombre, à 4°C pendant la nuit.

Le lendemain, les lames sont lavées dans trois bains de PBS-T (5 min par bain) puis incubées, 30 min en chambre humide et à température ambiante, après ajout de l'Ac secondaire anti-lapin qui est lié à la peroxydase de raifor (HRP : Horseradish peroxidase; Label Polymer HRP du kit Dako, K4002).

Trois lavages au PBS-T suivis d'un lavage au PBS1X, sont ensuite réalisés. Enfin, la révélation est effectuée par ajout d'une goutte de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) par coupe et incubation à l'obscurité pour 5 min (Figure 23). La DAB est préparée extemporanément par ajout d'une goutte pour 1mL de son substrat.

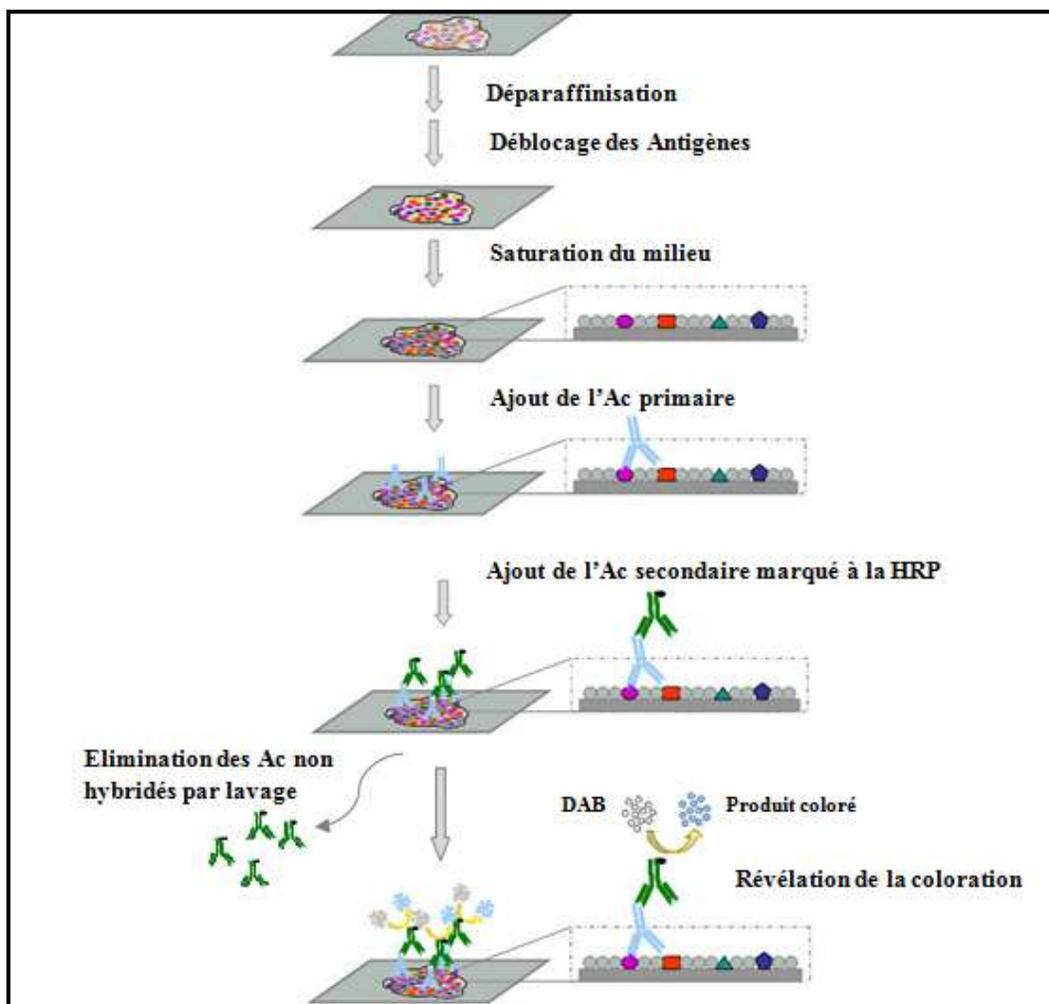


Figure 23: Le protocole de l'immunohistochimie. Extrait et modifié du site de ProteinTech.

### 3.14. La transformation des bactéries immunocompétentes par un vecteur

Le plasmide « *pRS415-WT-MAGMAS* », exprimant la protéine humaine MAGMAS normale sous le contrôle du promoteur TEF, a été fourni par D'Silva (Sinha et al., 2010). Ce plasmide code aussi pour un gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des colonies transformées, sur un milieu contenant cet antibiotique.

Dans le but de produire plusieurs copies de ce plasmide, les cellules de bactéries compétentes « NEB-5-alpha Competent E.Coli (C2987H; New England BioLabs) », ont été transformées et cultivées, selon les instructions suivantes :

Un aliquot de 50  $\mu$ L de cellules compétentes, décongelées sur la glace, est transformé par ajout d'un volume correspondant à environ 60 ng du plasmide, puis incubé dans la glace, pendant 30 min. Un choc thermique, à 42 °C pendant 30 sec est ensuite réalisé. Il est suivi d'un bain de glace brutal.

Le mélange est complété par environ 950  $\mu$ L du milieu LB (préchauffé à température ambiante) puis incubé sous agitation pendant 1 heure à 37 °C. Un volume de 100 à 200  $\mu$ L du milieu de cultureensemencé est ensuite étalé sur gélose contenant 10 mg/mL d'ampicilline, puis incubé à 37 °C pendant une nuit. Les colonies qui se forment sont ensuite repiquées en conditions stériles etensemencées dans un milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (à 10 mg/mL) puis incubées à 37 °C pendant 16 heures. L'utilisation de l'ampicilline dans les milieux de culture permet la sélection des cellules qui ont incorporé le plasmide *pRS415-WT-MAGMAS* contenant le gène de résistance à cet antibiotique.

### 3.15. L'extraction et la purification du plasmide amplifié

L'extraction et la purification des plasmides amplifiés sont effectuées à l'aide du kit Plasmid DNA purification, Nucleospin Plasmid/Plasmid (Nolid) (Macherey-NAGEL), en suivant les instructions fournies par le kit : le milieu de culture liquide préalablement ensemencé par les bactéries transformées, est centrifugé. Les cellules bactériennes culotées sont resuspendues puis lysées par ajout des tampons fournis par le kit. Le tampon A1 utilisé pour resuspendre le culot est complété, avant usage, par un volume d'ARNase permettant de dégrader les ARN extraits. Après centrifugation des lysats de cellules, le supernatant, contenant l'ADN, est récupéré puis transféré sur une colonne fournie par le kit. L'ADN est retenu sur la membrane qui sera lavée par un tampon spécial puis séchée par centrifugation. Après transfert de la membrane dans un nouveau tube de récupération, l'ADN plasmidique est élué par ajout du tampon hydrophile AE.

### 3.16. Mutagenèse dirigée

#### *Milieux (en annexe 8)*

#### *Protocole*

Afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de la mutation p.Asn76Asp du gène *MAGMAS*, le plasmide « *pRS415-Asn76Asp-MAGMAS* » exprimant la protéine mutée, a été généré à partir du plasmide « *pRS415-WT-MAGMAS* » par mutagenèse dirigée, réalisée à l'aide du kit *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, Agilent technologies). Cette technique consiste à introduire dans la séquence du plasmide parental, une mutation donnée, par le biais d'une PCR qui utilise des amorces spécifiques portant un (des) mésappariement(s) précis. Après avoir servi de matrice pour la synthèse des plasmides mutés, les brins du plasmide parental sont dégradés par digestion enzymatique. Des cellules ultracompétentes sont

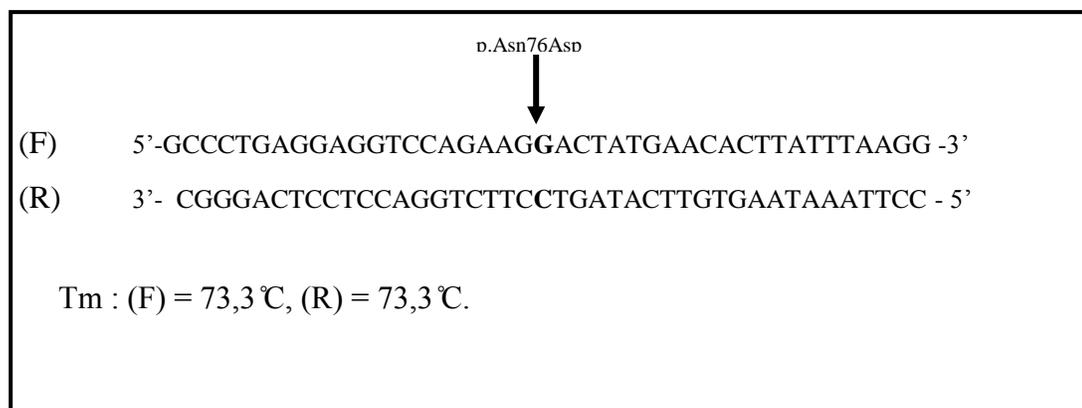
ensuite transformées par les plasmides mutés générés puis cultivées afin de produire un nombre important de ces derniers (Figure 24).

### A- Le choix des amorces

Les amorces, utilisées pour la PCR de la mutagenèse, doivent être choisies en respectant les normes suivantes :

- Les amorces choisies doivent être chevauchantes; elles doivent s'hybrider sur les brins complémentaires de la même séquence ciblée.
- La mutation à introduire doit être insérée au milieu de la séquence des amorces.
- La taille des amorces doit être comprise entre 25 et 45 pb.
- Les amorces doivent être riches en GC, avec un pourcentage supérieur ou égal à 40 % ; leurs séquences doivent se terminer par plusieurs bases G ou C.
- Leur température de fusion doit être supérieure ou égale à 78 °C.
- Ces amorces doivent être purifiées pour augmenter l'efficacité de la mutagenèse.

Les amorces utilisées pour la génération du plasmide « *pRS415-Asn76Asp-MAGMAS* », (exprimant la protéine *MAGMAS*<sub>Asn76Asp</sub> mutée), à partir du « *pRS415-WT-MAGMAS* », sont :



### B- La PCR de la mutagenèse

La PCR de la mutagenèse consiste à amplifier le plasmide parental en utilisant une paire d'amorces qui présente un mésappariement précis avec la séquence de ce dernier, permettant ainsi d'y introduire la mutation désirée.

La PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 50  $\mu\text{L}$  comprenant 25 ng du plasmide parental « *pRS415-WT-MAGMAS* », 5  $\mu\text{L}$  du tampon 10X de la réaction, 1  $\mu\text{L}$  du mix dNTP, 3  $\mu\text{L}$  « QuickSolution », 125 ng de chacune des amorces sens et anti-sens et 1  $\mu\text{L}$  de la Taq « *PfuUltra HF DNA polymerase* » (2,5 U/ $\mu\text{L}$ ).

Le programme spécifique de la PCR est présenté ci-dessous (Tableau 5).

**Tableau 5 : Le programme utilisé pour la PCR de la mutagenèse**

<b>Activation de la Taq</b>	1 cycle	95°C	1 min
<b>Dénaturation</b>	18 cycles	95°C	50 sec
<b>Hybridation</b>		60°C	50 sec
<b>Elongation</b>		68°C	8 min (correspondant à 1 min/Kb de la séquence plasmidique)
<b>Extension</b>	1 cycle	68°C	7 min
<b>Hold</b>		4°C	$\infty$

### C- La digestion du brin parental

Préalablement à la PCR de la mutagenèse, le plasmide parental est amplifié dans des souches d'*Escherichia Coli* (*dam*<sup>+</sup>). Ces dernières possèdent une ADN méthylase qui est codée par le gène *dam* et qui catalyse le transfert d'un groupement méthyle de la S-adénosyl-méthionine au résidu adénine des séquences génomiques GATC [Primrose S. 2004].

Afin de se débarrasser du brin parental non muté, une étape de digestion enzymatique du brin parental méthylée est réalisée, après la PCR de la mutagenèse, par ajout d'un volume de 1  $\mu\text{L}$  de l'enzyme de restriction *Dpn* I (10 U/  $\mu\text{L}$ ) au volume total de la réaction. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 37°C pendant une heure. La dégradation du plasmide parental est due à l'action de la *Dpn* I qui est spécifique des séquences GATC méthylées.

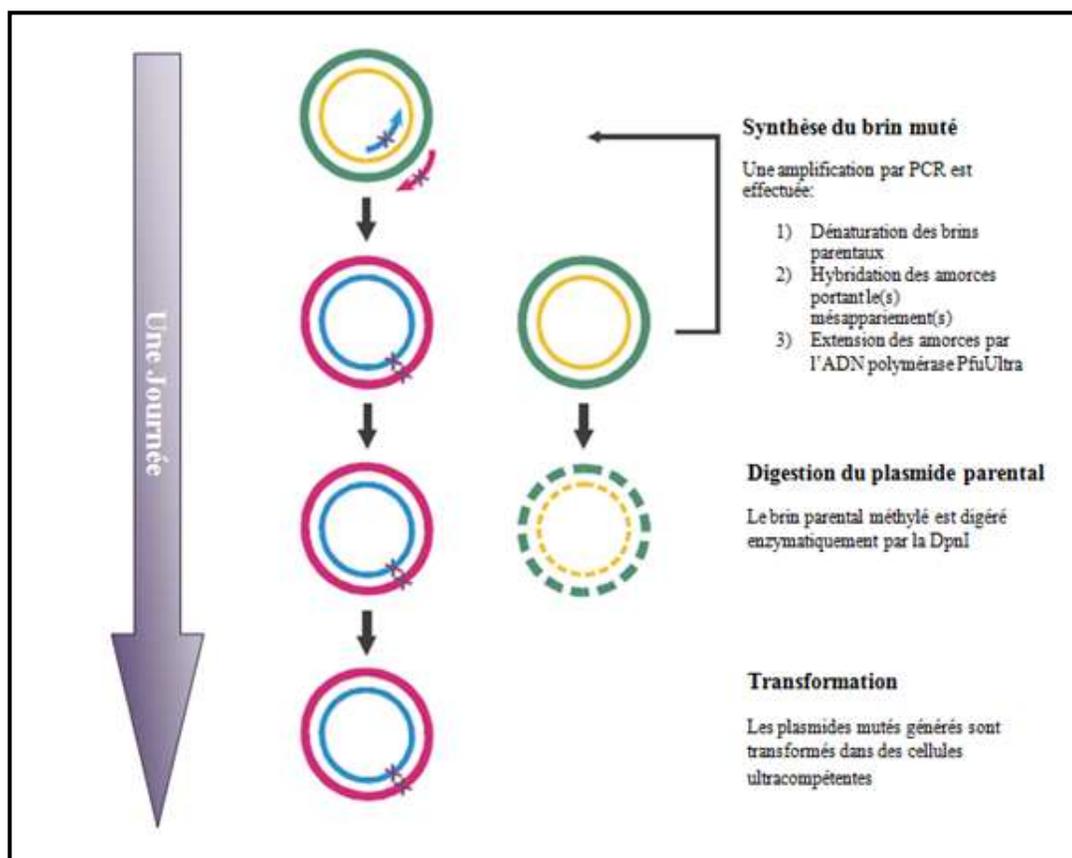


Figure 24 : Le protocole de la mutagenèse dirigée, selon le kit QuickChange II XL.

#### D- La transformation des bactéries ultracompétentes

Afin de produire plusieurs copies du plasmide exprimant la protéine mutée, des cellules ultracompétentes XL10-Gold sont transformées par « *pRS415-Asn76Asp-*

*MAGMAS* ». Dans ce but, 2  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ -ME) sont ajoutés à un aliquot de 45  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes préalablement décongelées sur la glace. Le mélange est ensuite remué puis incubé pendant 10 min sur la glace tout en secouant délicatement le tube toutes les 2 min.

Ces cellules compétentes traitées par le  $\beta$ -ME sont ensuite transformées par ajout de 2  $\mu\text{L}$  du produit de la digestion (étape précédente) suivi d'une incubation dans la glace pendant 30 min puis d'un choc thermique à 42 °C pendant 30 sec.

### **E- La culture**

Les tubes sont ensuite complétés par ajout d'un volume de 500  $\mu\text{L}$  du milieu NZY<sup>+</sup> broth préchauffé à 42 °C, puis incubés à 37 °C sous agitation (225 -250 rpm) pendant 1 heure. Afin de récupérer un maximum de colonies transformées, le milieu de culture ensemencé (de 500  $\mu\text{L}$ ) est centrifugé et le culot de cellules est resuspendu dans un volume de 100  $\mu\text{L}$  de NZY<sup>+</sup> qui sera étalé sur gélose contenant 10 mg/mL d'ampicilline. Les géloses sont ensuite incubées à 37 °C pendant 16 heures.

### **F- L'extraction et la purification des plasmides générés**

L'extraction et la purification des plasmides amplifiés sont effectuées à l'aide du kit Plasmid DNA purification, Nucleospin Plasmid/Plasmid (Nolid) fourni par Machercy-NAGEL.

### **G- La vérification de la mutagenèse**

Le succès de la mutagenèse est vérifié par séquençage direct des plasmides extraits, à l'aide des amorces T7-F, M13-R, MAG-F, MAG-R (Annexe 9).

La réaction de séquence est préparée dans un volume réactionnel de 10  $\mu\text{L}$  contenant 150 ng d'ADN plasmidique, 4 pmol de l'amorce utilisée, 1,5  $\mu\text{L}$  du tampon du Big Dye et 1  $\mu\text{L}$  du Big Dye.

Le programme de la réaction de séquence est présenté ci-dessous (Tableau 6).

**Tableau 6 : Le programme utilisé pour la réaction de séquence.**

<b>Étape</b>	<b>Nombre de cycles</b>	<b>Température (en °C)</b>	<b>Durée</b>
<b>Activation de la Taq</b>	1 cycle	94	5 min
<b>Dénaturation</b>	30 cycles	94	30 sec
<b>Hybridation</b>		55	30 sec
<b>Elongation</b>		60	30 sec
<b>Hold</b>		4	∞

### *Précautions*

- Il est recommandé d'utiliser les amorces en excès (125 ng par réaction). Pour la mise au point de la PCR de la mutagenèse, la quantité du plasmide utilisé comme matrice peut être modifiée.
- Eviter de vortexer les mélanges réactionnels après ajout de l'enzyme mais mélanger en pipétant.

### **3.17. La transformation des levures avec l'acétate de lithium**

La méthode de transformation des levures avec l'acétate de lithium (AcLi) consiste à décaper leur membrane puis à les soumettre à un choc thermique (Gietz et al., 1995).

Les souches de levures ainsi que les plasmides utilisés dans notre projet sont représentés dans le tableau 7.

## ***Les solutions utilisées (annexe10)***

### ***Les milieux de culture***

Les milieux de culture sélectifs sont préparés par ajout de 1 mL d'acide aminé pour 100 mL de milieu minimal (W0). Les milieux solides sont préparés par ajout de 2% de bacto agar (Difco).

- **Milieu minimal W0**

0,67% base nitrogène de levures (sans acides aminés)

2% glucose

- Pour la transformation de la souche BY4743*pam16Δ::kanMX6/PAM16* (souche diploïde) par les vecteurs *pRS415-WT-MAGMAS* (WT : Wild Type ou normal) ou *pRS415-Mut-MAGMAS*; le milieu sélectif est « W0 + histidine + uracile ».
- Pour la transformation de la souche YPH499*pam16Δ::ADE2-pPAM16* (souche haploïde) par les vecteurs *pRS415-WT-MAGMAS* ou *pRS415-Mut-MAGMAS*; le milieu sélectif est « W0 + histidine + tryptophane + lysine ».
- Pour la transformation des souches YPH-*pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>* et YPH-*pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>* par le vecteur *pYX232-mtGFP*, le milieu sélectif est « W0 + histidine + lysine + uracile ».
- Pour la transformation des souches BY-*pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>* et BY-*pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>* par *pUG34DsRed.SKL*; le milieu sélectif est « W0 + uracile + lysine + méthionine ».

Tableau 7 : Les souches de levures et les plasmides utilisés.

Souches de levures ou Plasmides	Génotype	Source
BY4743 <pam16δ::kanmx6 pam16<="" td=""> <td><i>leu2Δ/leu2Δ his3Δ/his3Δ ura3Δ/ura3Δ lys2Δ/LYS2 met15Δ/MET15 pam16Δ ::kanMX6/PAM16</i></td> <td>(Winzeler et al., 1999)</td> </pam16δ::kanmx6>	<i>leu2Δ/leu2Δ his3Δ/his3Δ ura3Δ/ura3Δ lys2Δ/LYS2 met15Δ/MET15 pam16Δ ::kanMX6/PAM16</i>	(Winzeler et al., 1999)
YPH499 <pam16δ::ade2-ppam16< td=""> <td><i>leu2Δ ade2Δ ura3Δ his3Δ trp1Δ lys2Δ pam16Δ ::ADE2 [pPAM16 URA3]</i></td> <td>Guiard, B.</td> </pam16δ::ade2-ppam16<>	<i>leu2Δ ade2Δ ura3Δ his3Δ trp1Δ lys2Δ pam16Δ ::ADE2 [pPAM16 URA3]</i>	Guiard, B.
BY- <i>pam16Δ</i> -MAG <sub>WT</sub>	<i>leu2Δ/leu2Δ his3Δ/his3Δ ura3Δ/ura3Δ lys2Δ/LYS2 met15Δ/MET15 pam16Δ::kanMX6[pRS415-WT-MAGMAS]</i>	Ce projet
BY- <i>pam16Δ</i> -MAG <sub>Asn76Asp</sub>	<i>leu2Δ/leu2Δ his3Δ/his3Δ ura3Δ/ura3Δ lys2Δ/LYS2 met15Δ/MET15 pam16Δ::kanMX6 [pRS415-Mut-MAGMAS]</i>	Ce projet
YPH- <i>pam16Δ</i> -MAG <sub>WT</sub>	<i>leu2Δ ade2Δ ura3Δ his3Δ trp1Δ lys2Δ pam16Δ::ADE2 [pRS415-WT-MAGMAS]</i>	Ce projet
YPH- <i>pam16Δ</i> -MAG <sub>Asn76Asp</sub>	<i>leu2Δ ade2Δ ura3Δ his3Δ trp1Δ lys2Δ pam16Δ::ADE2 [pRS415-Mut-MAGMAS]</i>	Ce projet
YPH- <i>pam16Δ</i> -pPAM16-MAG <sub>WT</sub>	<i>leu2Δ ade2Δ ura3Δ his3Δ trp1Δ lys2Δ pam16Δ::ADE2 [pPAM16 URA3] [pRS415-WT-MAGMAS]</i>	Ce projet
YPH- <i>pam16Δ</i> -pPAM16-MAG <sub>Asn76Asp</sub>	<i>leu2Δ ade2Δ ura3Δ his3Δ trp1Δ lys2Δ pam16Δ::ADE2 [pPAM16 URA3] [pRS415-Mut-MAGMAS]</i>	Ce projet
<i>pRS415-WT-MAGMAS</i>	Amp <sup>R</sup> <i>CEN LEU2 TEF MAGMAS<sub>WT</sub></i>	(Sinha et al., 2010).
<i>pRS415-Asn76Asp-MAGMAS</i>	Amp <sup>R</sup> <i>CEN LEU2 TEF MAGMAS<sub>Asn76Asp</sub></i>	Ce projet
<i>pYX232-mtGFP</i>	Amp <sup>R</sup> <i>2 micronTP1 preSu9 GFP TRP1</i>	(Westermann et Neupert, 2000)
<i>pUG34 DsRed.SKL</i>	Amp <sup>R</sup> <i>MET25DsRed.SKL HIS3</i>	(Kuravi et al., 2006)

## Le protocole

### A – Préparation de cellules compétentes

Les cellules de levures sont, tout d'abord, cultivées dans 10 mL de milieu riche en glucose, à une température optimale de 28°C avec agitation, de manière à obtenir une densité optique (DO) à 600 nm égale à environ 0,5. Une unité de DO correspond à  $1 \times 10^7$  cellules de levures par mL.

Après une centrifugation de 5 min à température ambiante, à 4000 rpm, les cellules sont recueillies dans 2 mL d'eau stérile puis centrifugées de nouveau à une vitesse maximale d'environ 13000 rpm, pour 5 min. Afin de perforer la membrane externe

rigide des levures et de la perméabiliser, 2 mL de la solution d'AcLi 0,1 M/TE 1X sont utilisés pour resuspendre le culot. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à vitesse maximale. Une 2<sup>ème</sup> lyse est effectuée par resuspension (à la pipette) du culot cellulaire dans 200 µL de la même solution.

### **B- La transformation des cellules compétentes**

Pour la transformation, un aliquot de 100 µL de cellules compétentes est incubé dans la glace. A ces cellules, on ajoute le volume nécessaire d'ADN plasmidique (correspondant à une quantité d'environ 1 µg d'ADN, tout en sachant que le volume maximal qui peut être ajouté est de 10 µL) et 5 µL d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé (5 min à 95 °C). L'ADN de sperme de saumon sert d'entraîneur qui protège l'ADN plasmidique de l'action des nucléases. Le mélange est incubé 20 min à température ambiante sans agitation.

600 µL de la solution AcLi 0,1 M / TE 1X / PEG<sub>4000</sub> 40% sont ensuite ajoutés. L'ensemble est mélangé (par pipetage) puis incubé 25 min à 45 °C (Choc thermique). Une dernière centrifugation, de 5 min à vitesse maximale, est ensuite réalisée. Le culot de cellule est resuspendu délicatement dans un volume d'eau (100 µL) qui sera étalé, au râteau ou avec des billes de verre, sur un milieu sélectif. Les milieux de culture sont enfin incubés à 28 °C (température optimale de croissance des levures).

### **3.18. Les tests de complémentation**

Les tests de complémentation des deux souches de levures (haploïde et diploïde), ont été réalisés en utilisant des approches génétiques déjà décrites par Sinha et ses collaborateurs (Sinha et al., 2010).

#### ***Les milieux***

- **YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)**

  - 1% bactopeptone

1% extraits de levures

2% glucose

- **YPG (Yeast extract Peptone Glycerol)**

1% bactopeptone

1% extraits de levures

2% glycérol

### *Le protocole*

#### **a. La souche diploïde BY4743*pam16Δ* : *:kanMX6/PAM16***

La souche BY4743*pam16Δ*::*kanMX6/PAM16*, portant la délétion du gène *yPAM16* (*pam16Δ* : *:kanMX6*) à l'état hétérozygote, a été transformée par le vecteur *pRS415-WT-MAGMAS* ou *pRS415-Mut-MAGMAS* puis induite à sporuler sur un milieu carencé en azote. Selon les méthodes standardes (Westermann and Neupert, 2000), les tétrades formées sont disséquées en spores qui sont cultivées à 28 °C sur un milieu riche YPD puis répliquées sur différents milieux de sélection. La réplique des spores d'un asque sur un milieu contenant la kanamycine G418 permet la sélection des spores qui ont l'allèle délété *pam16Δ*::*kanMX6*. Par ailleurs, la réplique sur un milieu sans leucine (ou leucine drop-out plate) permet la sélection des spores ayant le vecteur *pRS415MAGMAS* (WT ou muté). Ainsi ont été générées les souches BY-*pam16Δ*-MAG<sub>WT</sub> et BY-*pam16Δ*-MAG<sub>Asn76Asp</sub> qui furent cultivées sur les milieux fermentatif (YPD) et respiratoire (YPG) et incubées à différentes température pour les analyses de la complémentation.

#### **b. La souche haploïde YPH499*pam16Δ*::*ADE2-pPAM16***

La souche haploïde YPH499*pam16Δ*::*ADE2-pPAM16*, contenant le plasmide *pPAM16 URA3*, a été transformée par le vecteur *pRS415-WT-MAGMAS* ou *pRS415-Mut-MAGMAS* puis cultivées sur le milieu de culture sélection (ne contenant ni l'uracile ni la leucine). Les cellules transformées ont été ensuite répliquées sur un

milieu 5-FOA (5-Fluoroorotique) pour la sélection des souches ayant perdue le plasmide *pPAM16 URA3* qui code pour le gène normal de levure *yPAM16* (Sikorski and Boeke, 1991). Des gouttes diluées de l'ordre du  $1/10^{\text{ème}}$  des différentes souches générées ont été ensuite déposées sur des plaques YPD puis incubées à des températures différentes (28 °C, 34 °C et 36 °C) pour 3 jours.

### 3.19. Le Western Blot

Le « Western Blot » est une technique de biologie moléculaire qui permet la détection et l'identification de protéines dans un échantillon biologique donné. Elle consiste à repérer, à l'aide d'Ac spécifiques, des protéines séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane.

#### *Le protocole*

##### **A- La lyse cellulaire et l'extraction de protéines**

Les cellules de levures (YPH499*pam16Δ-PAM16*, YPH-*pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>* et YPH-*pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>*) sont, tout d'abord, cultivées en milieu riche, à une température optimale de 28 °C avec agitation, de manière à obtenir une  $DO_{600\text{nm}}$  égale à 1. Dans le but d'induire les conditions non permissives, ces cellules sont ensuite incubées à 37 °C pour 8 heures. Après une centrifugation de 5 min à température ambiante, à 4000 rpm, les culots de cellules sont stockés à – 80 °C jusqu'à leur manipulation ultérieure.

Les étapes de lyse cellulaire et d'extraction des protéines sont réalisées sur un la glace.

Les culots de cellules sont resuspendus dans 200 µL de tampon TCA glacé puis transvasés dans de nouveaux tubes, préalablement refroidis dans la glace. Afin de lyser les cellules, 250µL de billes de verre et 250 µL de TCA sont ajoutés aux cellules en suspension. Le mélange est mélangé vigoureusement au vortex pour une durée de 5 min (sachant que chaque min de vortex est suivie d'une minute

d'incubation dans la glace). Le surnageant est ensuite recueilli puis centrifugé à 4 °C pour une durée de 10 min, avec une vitesse de 13000 rpm. Les protéines globales, précipitées sous forme d'un culot, sont solubilisées dans 100 µL de tampon de Laemmli puis dénaturées (5 min à 100 °C suivi d'un choc thermique sur la glace).

### **B- L'électrophorèse (SDS-PAGE)**

Les protéines extraites des différentes souches de levures sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, sur gel polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE pour Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

La séparation des protéines a été réalisée en utilisant des gels précoulés NuPAGE, Novex, 4-12% (Invitrogen, Life Technologies).

### **C- Le transfert sur membrane**

Après leur migration et leur séparation sur gel, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose qui est ensuite bloquée et saturée dans un bain de la solution de blocage pendant une nuit à 4 °C.

### **D- L'immunodétection des protéines**

L'immunomarquage est effectué en incubant la membrane de nitrocellulose, pour 1 heure à température ambiante, dans un bain contenant l'anticorps spécifique dilué dans la solution de blocage.

L'évaluation de la fonction d'import mitochondrial a été réalisée en détectant, par Western Blot, les deux formes de la protéine Hsp60, à l'aide d'Ac anti-Hsp60 (fourni par Dujardin G.), utilisé à une dilution finale de 1/15000 dans la solution de blocage. Pour l'immunodétection de la protéine Magmas dans les différentes souches

de levures, l'anti-Magmas (Abcam plc., UK) est utilisé à une dilution finale de 1/1000 dans la solution de blocage.

Après plusieurs lavages de la membrane dans des bains de TBS1X de 5 min chacun, l'excès de l'anticorps primaire est éliminé. La membrane est ensuite immergée, pour 1 heure à température ambiante, dans un bain contenant l'Ac secondaire dilué à 2/15000 dans la solution de blocage. *Les Ac secondaires utilisés sont des anti-souris Immunoglobulines (Ig) (cas de Hsp60) et des anti-lapin Ig (cas de MAGMAS).* Trois lavages consécutifs au TBS1X (5 min/lavage) sont ensuite effectués avant la révélation. Les Ac secondaires, étant conjugués à la peroxidase (HRP), le signal est détecté par chimiluminescence en utilisant le kit *Thermo Scientific PierceECL 2 selon les instructions du fabricant.*

### **3.20. L'étude microscopique de l'aspect des mitochondries et des peroxysomes**

Dans le but d'examiner l'aspect des mitochondries, les souches de levures YPH-*pam16Δ*-MAG<sub>WT</sub> et YPH-*pam16Δ*-MAG<sub>Asn76Asp</sub> ont été, tout d'abord, transformées par le plasmide *pYX232-mtGFP*, exprimant la GFP (GFP : Green Fluorescent Protein) adressée à la mitochondrie; puis cultivées 2 jours à 28°C. Ensuite, dans le but d'induire le phénotype muté, les cellules transformées ont été incubées pendant une nuit à une température non-permissive de 37°C.

L'aspect des peroxysomes a été observé après transformation des souches BY-*pam16Δ*-MAG<sub>WT</sub> et BY-*pam16Δ*-MAG<sub>Asn76Asp</sub> par le vecteur *pUG34DsRed.SKL*. Ce dernier code pour la protéine fluorescente rouge (DsRed) fusionnée, au niveau de son extrémité C-terminale, à un signal d'adressage peroxisomal PTS1 (Peroxisomal Targeting Signal type 1). Les cellules transformées ont été cultivées 2 jours à 28°C dans un milieu minimum puis incubées 6 heures à 37°C.

Pour la visualisation des cellules, un microscope inversé DMIRE2 (Leica, Deerfield, IL) a été utilisé. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la

protéine GFP sont 450/490 nm et 500/550 nm, respectivement. Celles correspondant à la DsRed sont 542/582 nm (pour l'excitation) et 604/644 nm (pour l'émission). Les images ont été captées en utilisant une caméra CCD (Roper Scientific, Tucson, AZ); leur traitement a été effectué par le logiciel Metamorph (Universal Imaging, WestChester, PA).

### **3.21. L'étude du profil d'ARN<sub>r</sub> dans les différentes souches de levures**

#### *Le protocole*

##### **A- L'extraction des ARN des souches de levures**

Les cellules de levures (YPH499*pam16Δ-PAM16*, YPH-*pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>* et YPH-*pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>*) sont cultivées dans 10 mL du milieu riche YPD, à une température optimale de 28°C avec agitation, de manière à obtenir une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 2,5 et 5. Dans le but d'induire les conditions non permissives, ces cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit. Après une centrifugation de 4 min à 4000 rpm, à température ambiante, les culots de cellules sont resuspendus dans 2mL d'eau stérile, puis transférés dans de nouveaux tubes. Une deuxième centrifugation de 5 min à 13200 rpm, permet ensuite de récupérer un culot propre. L'extraction de l'ARN est ensuite réalisée selon le protocole décrit par Schmitt et ses collaborateurs (Schmitt et al., 1990) :

Les culots récupérés sont resuspendus dans 400 µL d'une solution de 50 mM de Na acétate (pH 5,3), 10mM EDTA. A ces cellules, 40 µL de SDS 10% sont ajoutés et la suspension est vortexée. Puis, un volume de phénol, égal à celui du mélange total (~ 400 µL), est ajouté et le mix est mélangé de nouveau. Après incubation des cellules au bain marie, à 65°C pour 5 min ; un choc thermique est effectué dans un bain de carboglace et d'éthanol. La centrifugation du mélange pour 2 min, à 13200 rpm, à

4 °C, permet ensuite la séparation du mélange en deux phases : une phase organique formée par le phénol, au-dessus de laquelle se trouve une phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Cette dernière est transférée dans un nouveau tube. Un volume d'environ 400 µL d'une solution de phénol/chloroforme est ajouté à la phase aqueuse. Le mélange est laissé 5 min à température ambiante puis vortexé et centrifugé de sorte à récupérer la phase aqueuse. A cette dernière est ensuite ajouté 40 µL d'une solution de 3M de Na acétate (pH 5,3), puis l'ARN est précipité par ajout de 2,5 volumes d'éthanol (égal à environ 1000 µL) suivi d'une centrifugation de 15 min à 4 °C, à 13,2 rpm. Après lavage par environ 80% d'éthanol, une deuxième centrifugation de 15 min avec les mêmes conditions, permet de récupérer le culot qui est ensuite resuspendu dans 20 µL d'eau stérile puis stocké à – 80 °C.

#### **B- La séparation des ARN totaux par migration sur gel d'acrylamide, en conditions dénaturantes**

Environ un volume de 4 µL de la solution contenant les ARN totaux de chaque souche est mélangé avec 6 µL du tampon de charge puis migré sur un gel d'acrylamide (de 6%), en conditions dénaturantes (gel contenant 7M d'urée). Après migration, un bain de BET permet de marquer et visualiser les ARN.

## **IV- Les Résultats**

« C'est avec la logique que nous prouvons et avec l'intuition que nous trouvons » Poincaré, (Jules) Henri

## 1. Familles A et B

### 1.1. Identification du gène responsable de la dysplasie osseuse des familles A et B

Dans le but d'identifier le gène responsable de la dysplasie spondylo-dysplastique sévère présente chez les patients appartenant aux familles A et B, le séquençage des exomes des sujets AP2 et BP2 a été effectué.

Parmi le nombre important de variations détectées, les filtres utilisés pour sélectionner la mutation responsable du phénotype des patients concernés ont été :

- Le type de la mutation : les mutations synonymes n'affectant pas la séquence de la protéine ont été exclues, sauf dans certains cas où la variation pouvait entraîner une modification d'un site d'épissage (création ou élimination).

- La fréquence de la variation : certaines variations, présentes dans la population générale normale avec une fréquence supérieure ou égale à 1%, sont considérées comme des polymorphismes qui n'affectent pas la fonction de la protéine. Dans ce cadre, les polymorphismes répertoriés dans la base de donnée des SNP (SNP database « dbSNP13 » qui correspond à la dbSNP132, à l'exception des SNP cliniques) ont été exclues. Il en est de même pour les variations présentes dans la base de données des SNP libanais (dbSNP Libanais) qui a été établie par le Dr Valérie DELAGUE, à Marseille, et qui regroupe tous les variants homozygotes retrouvés chez au moins 2 individus sains (apparentés à des patients étudiés par exome) et non apparentés entre eux.

- Le mode de transmission de la maladie : d'après les arbres généalogiques des deux familles A et B, une transmission autosomique récessive est retenue. Vu la rareté de la dysplasie squelettique présentée par ces patients et le degré élevé de consanguinité entre les parents, nous avons supposé que les patients devaient être homozygotes par descendance. Les variations homozygotes ont donc été sélectionnées.

Parmi la totalité des variations détectées chez le patient AP2, 21 ont été sélectionnées. En parallèle, chez le patient BP2, 7 variants ont été retenus (Tableau 8). En croisant les résultats des sujets AP2 et BP2, seul *MAGMAS* (Mitochondria-associated granulocyte macrophage CSF-

signaling molecule) présentait une mutation à l'état homozygote et commune aux deux patients. Cette variation (NM\_016069 : c.A226G; p.Asn76Asp), est décrite comme pathogène par différents logiciels de prédiction (dont PolyPhen, MutationTaster, PhyloP et GERP). Le séquençage fluorescent direct (selon la méthode de Sanger) a confirmé la présence de cette mutation à l'état homozygote chez AP2 et BP2, sa ségrégation avec la maladie dans les deux familles (présence de la mutation à l'état hétérozygote chez les deux parents) (Figure 25) et son absence chez une série de 225 sujets contrôles libanais (correspondant donc à 450 chromosomes contrôles).

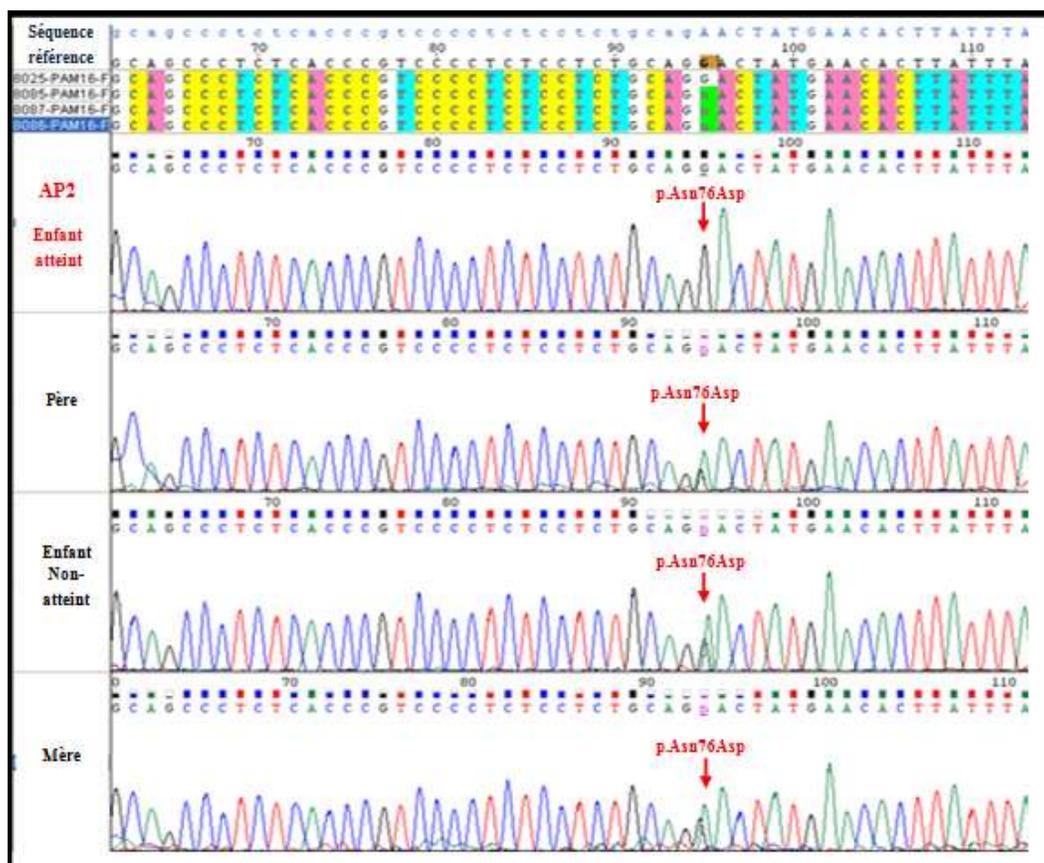


Figure 25: La ségrégation de p.Asn76Asp avec la dysplasie spondylo-dysplastique de la famille A.

Tableau 8 : Liste des variations génomiques homozygotes sélectionnées du séquençage des exomes des patients AP2 et BP2.

Patient	Gène	Chr.	Position génomique	Type de la Variation	Fonction de la variation	Variation	Réf.	Var.	Etat de la variation
BP2	<i>NUAK2</i>	chr1	205273456	SNP	Exonique	NM_030952 : c.C1009T : p.Arg337Trp	G	A	Homozygote
	<i>MERTK</i>	chr2	112760686	SNP	Exonique	NM_006343 : c.A1708G : p.Ser570Gly	A	G	Homozygote
	<i>EN1</i>	chr2	119600555	SNP	Exonique	NM_001426 : c.C1138G : p.His380Asp	G	C	Homozygote
	<i>VCAN</i>	chr5	82836537	SNP	Exonique	NM_001164097 : c.C4754T : p.Ser1585Leu	C	T	Homozygote
	<i>EZR</i>	chr6	159206423	SNP	Exonique	NM_003379 : c.G385A : p.Ala129Thr	C	T	Homozygote
	<i>PAM16; CORO7-PAM16</i>	chr16	4390986	SNP	Exonique/Epissage	NM_016069 : c.A226G : p.Asn76Asp	T	C	Homozygote
	<i>MYH9</i>	chr22	36685292	SNP	Exonique	NM_002473 : c.C4396T : p.Arg1466Trp	G	A	Homozygote
AP2	<i>KIAA1751</i>	chr1	1904452	SNP	Exonique	NM_001080484 : c.A709G : p.Arg237Gly	T	C	Homozygote
	<i>MTR</i>	chr1	237023193	SNP	Exonique	NM_000254 : c.G2014A : p.Glu672Lys	G	A	Homozygote
	<i>PVRL3</i>	chr3	110852718	SNP	Exonique	NM_015480 : c.G1306A : p.Val436Met	G	A	Homozygote
	<i>OTOP1</i>	chr4	4199302	SNP	Exonique	NM_177998 : c.G1259C : p.Arg420Pro	C	G	Homozygote
	<i>DMXL1</i>	chr5	118469561	SNP	Exonique	NM_005509 : c.G1942A : p.Val648Ile	G	A	Homozygote
	<i>SNX2</i>	chr5	122163345	SNP	Epissage	NM_003100 : c.1509+4A>C	A	C	Homozygote
	<i>TRIM35</i>	chr8	27168472	SNP	Exonique	NM_171982 : c.G281C : p.Ser94Thr	C	G	Homozygote
	<i>SCRIB/SCRIB</i>	chr8	144892774	SNP	Exonique Epissage	NM_015356 : c.G1405 : p.Gly469Ser	C	T	Homozygote
	<i>ZNF883</i>	chr9	115759599	SNP	Exonique	NM_001101338 : c.C941T : p.Thr314Met	G	A	Homozygote
	<i>DNLZ</i>	chr9	139258166	SNP	Exonique	NM_001080849 : c.A1T : p.Met1Leu	T	A	Homozygote
	<i>TACC2</i>	chr10	123843898	SNP	Exonique	NM_206862 : c.C1883T : p.Pro628Leu	C	T	Homozygote
	<i>HMX2</i>	chr10	124909372	SNP	Exonique	NM_005519 : c.C555G : p.Ser185Arg	C	G	Homozygote
	<i>ANP32D</i>	chr12	48866481	SNP	Exonique	NM_012404 : c.C34T : p.Arg12Trp	C	T	Homozygote
	<i>CCDC65</i>	chr12	49298192	SNP	Exonique	NM_033124 : c.T73A : p.Leu25Met	T	A	Homozygote
	<i>RCBTB1</i>	chr13	50118975	SNP	Exonique	NM_018191 : c.C1070T : p.Ala357Val	G	A	Homozygote
	<i>CKAP2</i>	chr13	53035217	SNP	Exonique	NM_001098525 : c.C259T : p.Pro87Ser	C	T	Homozygote
	<i>PAM16; CORO7-PAM16</i>	chr16	4390986	SNP	Exonique Epissage	NM_001201479 : c.A2995G : p.Asn999Asp	T	C	Homozygote
	<i>CDH8</i>	chr16	61689533	SNP	Exonique	NM_001796 : c.A1747G : p.Asn583Asp	T	C	Homozygote
	<i>VAV1</i>	chr19	6828478	SNP	Exonique	NM_005428 : c.C1072A : p.Leu358Met	C	A	Homozygote
	<i>SNAPC2</i>	chr19	7987125	SNP	Exonique	NM_003083 : c.C578G : p.Ser193Trp	C	G	Homozygote
<i>KIR2DL3</i>	chr19	55263902	Deletion	Exonique	NM_015868 : c.958_959del : p.320_320del	TC	T	Homozygote	

Le gène identifié, *MAGMAS*, également connu sous le nom de *PAM16* (Presequence translocase-Associated Motor 16), comprend 5 exons, est localisé au niveau du chromosome 16, en 16p13.3 et est exprimé par la majorité des cellules de mammifères. Ce gène code pour une sous unité essentielle du complexe mitochondrial PAM, complexe responsable de la régulation de l'import des pré-protéines vers la matrice (Frazier et al., 2004; Jubinsky et al., 2001).

Une protéine de fusion entre les gènes *PAM16* et *CORO7*, localisés en 16p13.3, est décrite dans *Genome UCSC Browser*. Afin de vérifier si *CORO7-PAM16* participe au mécanisme physiopathologique de la dysplasie osseuse de ces patients, une RT-PCR a été réalisée. Cette dernière nous a permis d'étudier l'expression des gènes *PAM16*, *CORO7* ainsi que de leur transcrite de fusion *CORO7-PAM16* au niveau de différents types de cellules humaines (chondrocytes, ostéoblastes et fibroblastes fœtaux). Parmi ces trois transcrits exprimés par les fibroblastes, seul *PAM16* est détecté aux niveaux des cellules chondrocytaires et osseuses (Figure 26).

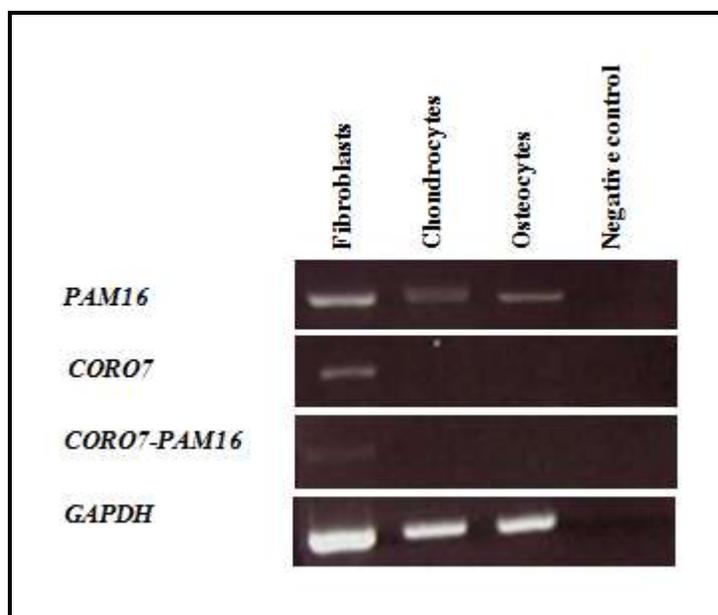
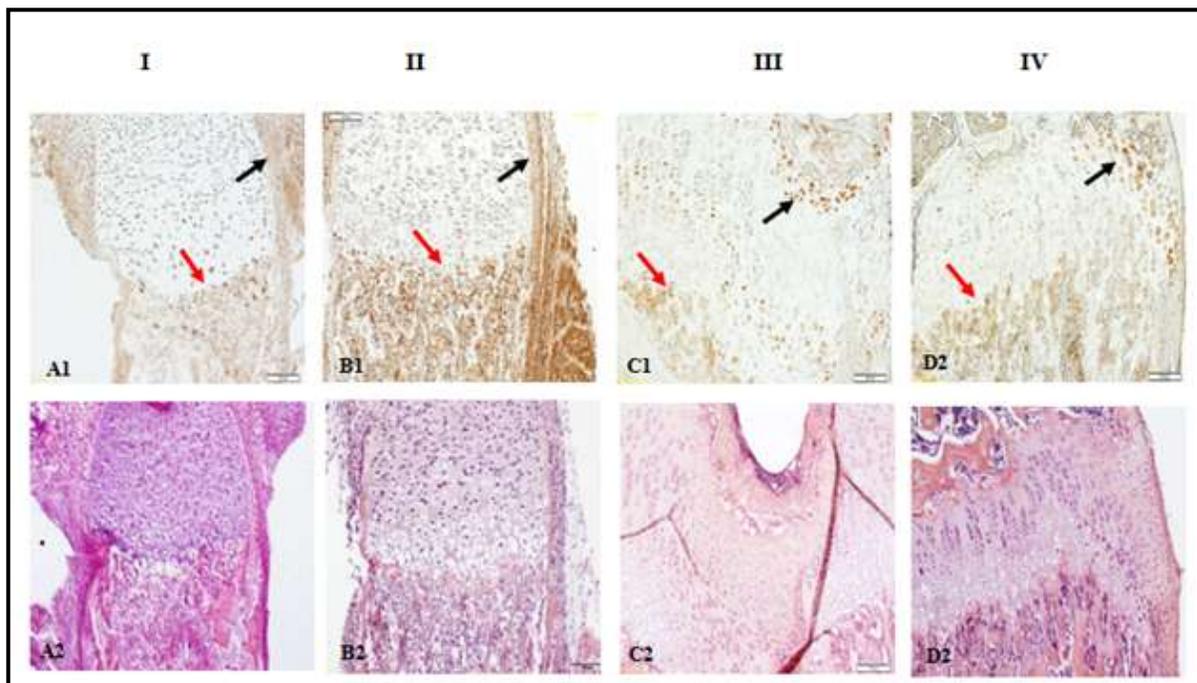


Figure 26: L'analyse de l'expression des transcrits *PAM16*, *CORO7*, *CORO7-PAM16* et *GAPDH* au niveau de fibroblastes, chondrocytes et ostéocytes contrôles, montrant que *CORO7* et *CORO7-PAM16* ne sont pas exprimés au niveau des cellules du tissu osseux.

## 1.2. Immunolocalisation de la protéine MAGMAS aux niveaux de plaques de croissance murines

Dans le but de confirmer l'implication de MAGMAS dans la squelettogenèse, nous avons effectué un marquage immunohistochimique de fémurs isolés de souris normales à différents stades de développement (à partir du jour embryonnaire E16.5 jusqu'à l'âge de 5 semaines). Nous avons montré que MAGMAS est exprimée au niveau de la plaque de croissance, exclusivement par l'os trabéculaire et la zone hypertrophique du cartilage (Figure 27).



**Figure 27: Immunolocalisation de MAGMAS au niveau de la plaque de croissance. Les fémurs distaux de souris normales à différents stades embryonnaires, A : Jour Embryonnaire 16,5; B : Nouveau-né, C : 2 semaines; D : 5 semaines; ont été fixés puis marqués à l'aide d'anticorps anti-MAGMAS (A1-D1). Une coloration HES a été également réalisée pour ces coupes (A2-D2). L'expression de MAGMAS est révélée par la coloration brune qui résulte de la réaction de la peroxidase couplée aux anticorps secondaires. MAGMAS est détectée au niveau des ostéocytes (flèches rouges) et des chondrocytes hypertrophiques (flèches noires) des plaques de croissance à différents stades embryonnaires.**

### 1.3. Test de complémentation

*MAGMAS* est très conservé entre les espèces (Jubinsky et al., 2001; Peng et al., 2005) et est essentiel au développement et à la survie (Becker et al., 2001; Winzeler et al., 1999). La grande similitude entre la protéine humaine et celle des levures permet une complémentation parfaite, par le gène humain, du phénotype létal de la délétion de *ypam16*, l'orthologue de *MAGMAS* chez la levure (Sinha et al., 2010). Afin de confirmer la pathogénicité de la mutation p.Asn76Asp, nous avons réalisé un test de complémentation de deux souches de levures (deux contextes génétiques : haploïde et diploïde), en utilisant des approches génétiques déjà décrites (cf. partie matériel et méthodes de la thèse) (Sinha et al., 2010). Ces expériences ont montré qu'à 28°C, les deux formes, normale (ou Wild type WT) et mutée (p.Asn76Asp), du gène humain *MAGMAS*, complètent le défaut de croissance des cellules de levures BY4743*pam16Δ*. La sélection, sur un milieu G418, des spores *pam16Δ* exprimant *MAGMAS<sub>WT</sub>* ou *MAGMAS<sub>p.Asn76Asp</sub>* montre la viabilité de ces cellules en l'absence du gène *yPAM16* (Figure 28A, 28B). Afin de vérifier si la mutation confère aux souches un phénotype thermo-sensible, des gouttes diluées (de l'ordre du 1/10<sup>ème</sup>) des spores *pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>* ou *pam16Δ-MAG<sub>p.Asn76Asp</sub>* ont été déposées sur des milieux fermentaires (YPD) ou respiratoires (YPG) qui ont ensuite été incubés, pendant 3 jours, à différentes températures. Nous avons observé que les souches de levures *pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>*, exprimant la protéine mutée, poussent à un rythme plus lent que *pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>*, en milieu YPD, aux températures non-permissives 34°C et 36°C (Figure 28C). Le phénotype délétère de ces souches est plus sévère en milieu respiratoire YPG où il se manifeste par une croissance très lente à 34°C et une non-viabilité à 36°C. Afin de valider nos résultats, nous avons testé la capacité du gène *MAGMAS<sub>Asn76Asp</sub>* à rétablir le phénotype létal de la délétion de *pam16* par un brassage de plasmides, en utilisant la souche haploïde YPH499*pam16Δ* (souche transformée par un plasmide exprimant *yPAM16*). Contrairement aux souches exprimant *MAGMAS* normal, les mutants *pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>* présentent un retard de croissance remarquable à 34°C et une non-viabilité à 36°C, en milieu YPD (Figure 28D). Par ailleurs, une croissance normale, aux différentes températures, a été observée chez les souches *pam16Δ-PAM16-MAG<sub>Asn76Asp</sub>* exprimant *yPAM16* et *MAGMAS<sub>Asn76Asp</sub>*.

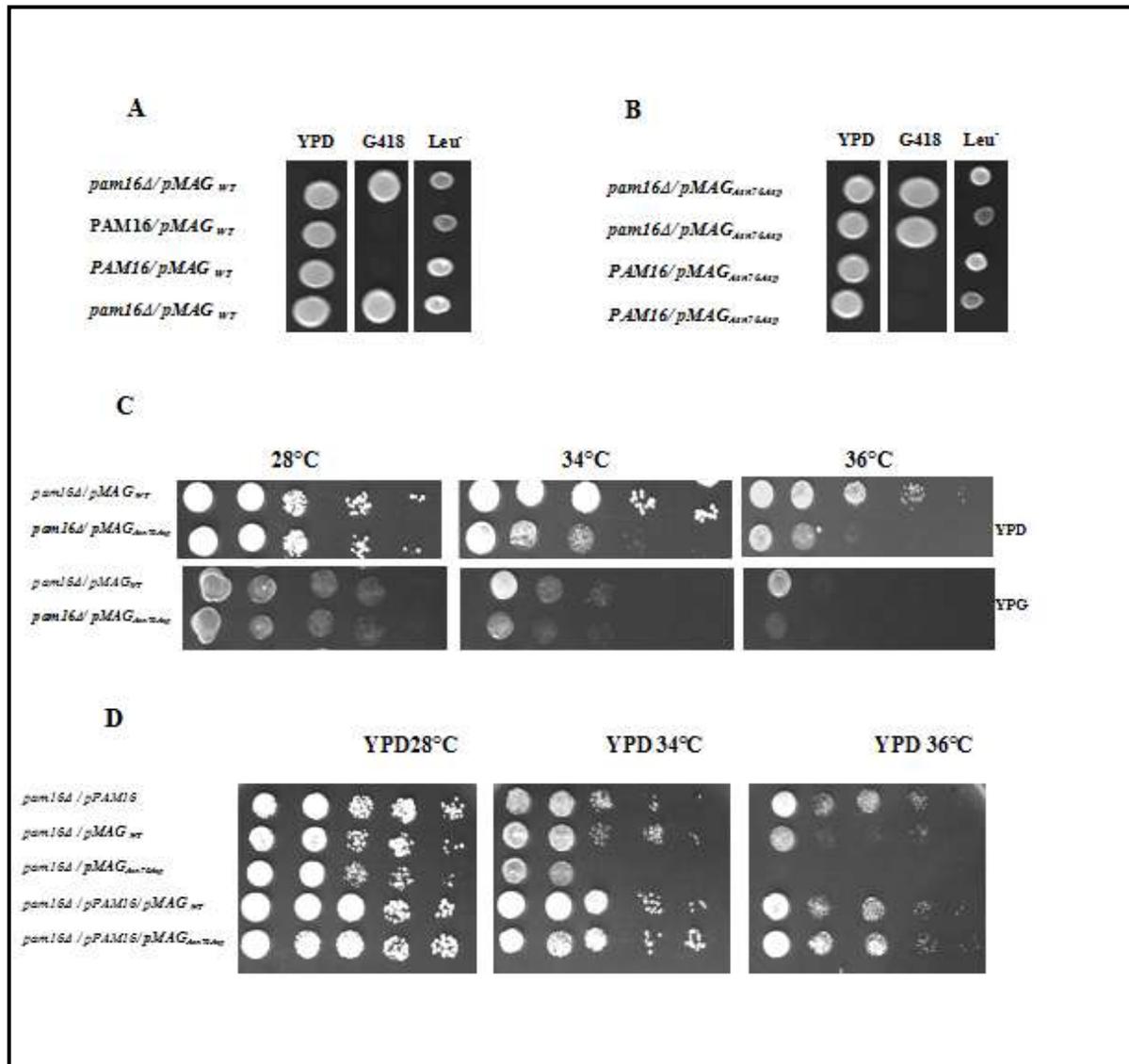


Figure 28: Analyse de croissance in vivo. (A-C) Les cellules diploïdes BY4743  $\Delta lip3/+$  ont été transformées par (A) *pRS415-WT-MAGMAS* et (B) *pRS415-Asn76Asp-MAGMAS*, et soumises à la sporulation puis à la dissection. Les spores issues d'un même asque, cultivées sur un milieu riche, ont été tout d'abord ensemencées sur un milieu G418, permettant la sélection des spores portant l'allèle, puis sur un milieu carencé en Leucine pour la sélection des spores portant le plasmide *pRS415-MAGMAS*. (C) Les tests de complémentation ont montré que les souches mutées BY-*pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>*, ont un caractère thermosensible qui se manifeste par une faible croissance à 34°C et 36°C, sur les deux milieux fermentatif (YPD) et respiratoire (YPG). (D) Les cellules haploïdes YPH499-*pam16Δ/pPAM16*, transformées par *pRS415-WT-MAGMAS* et *pRS415-Asn76Asp-MAGMAS*, ont été testées pour leur habilité de restituer la non-viabilité des souches *pam16Δ*, par un brassage de plasmides à différentes températures.

## 1.4. L'évaluation de la fonction de MAGMAS

MAGMAS fait partie du complexe PAM, qui est associé à la membrane interne mitochondriale. Elle est impliquée dans la régulation du transport actif des protéines vers la matrice mitochondriale : Une protéine mitochondriale, codée par le génome nucléaire, comporte normalement une pré-séquence d'environ 20 acides aminés (aa) qui, localisée au niveau du côté amino-terminal, dirige la protéine vers les différents compartiments de la mitochondrie. Une pré-protéine dirigée vers la matrice est ensuite repliée en sa forme active après le clivage de la pré-séquence par la peptidase matricielle « MPP » (Mitochondrial Processing Peptidase) (Frazier et al., 2004; Schatz and Dobberstein, 1996) (Figure 29).

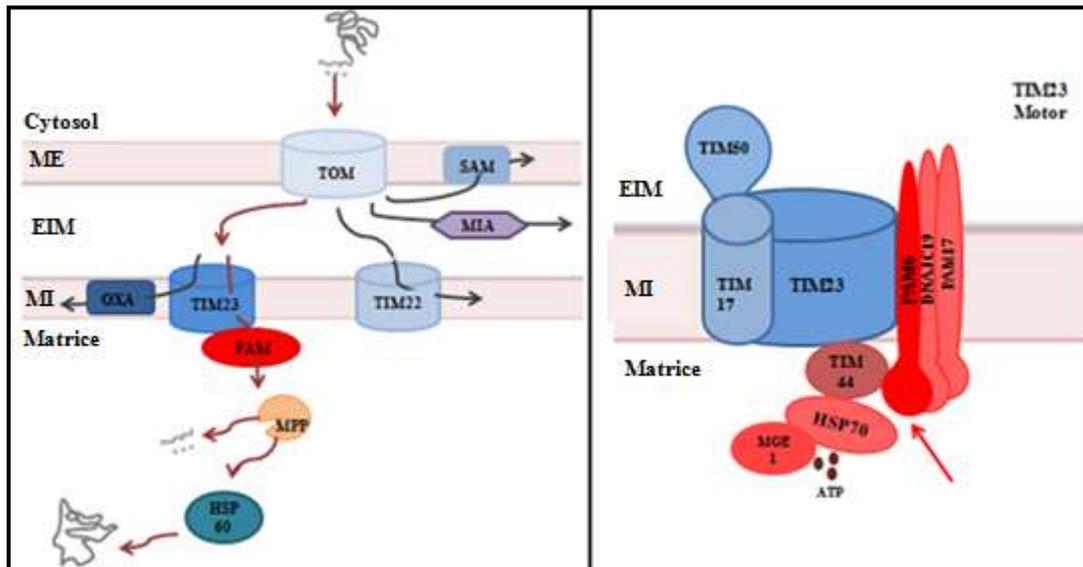
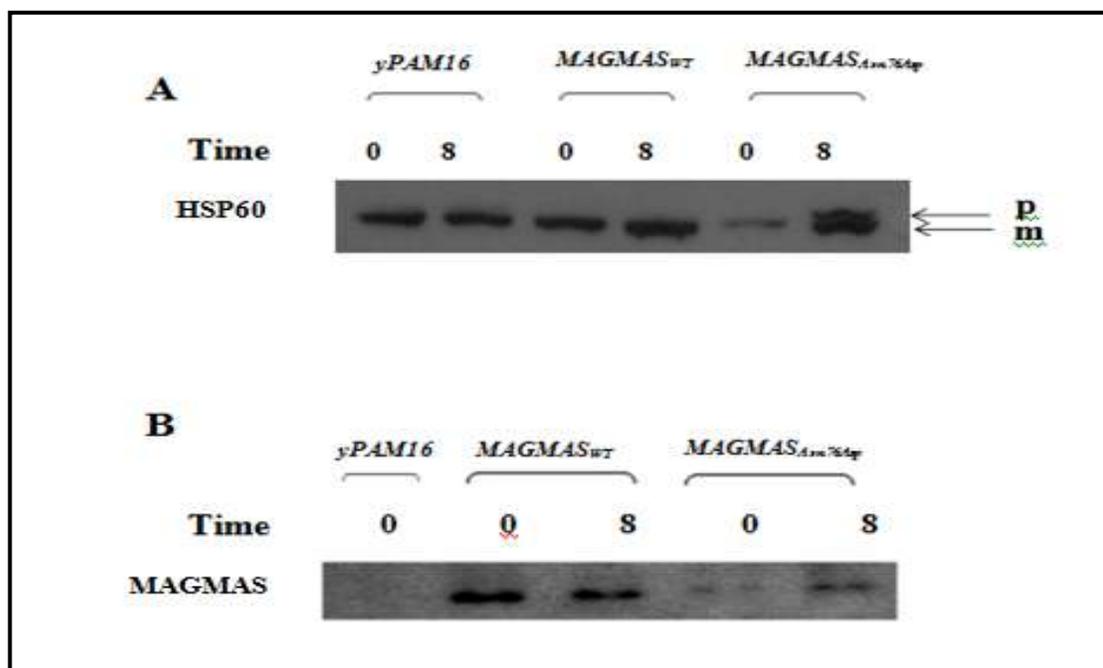


Figure 29: Les voies d'import des protéines vers la mitochondrie. (A) Des machineries sophistiquées interviennent dans la reconnaissance, l'import, l'adressage et l'assemblage des pré-protéines vers un compartiment spécifique de la mitochondrie. Les pré-protéines dirigées vers la matrice traversent la membrane externe mitochondriale par le complexe TOM puis la membrane interne mitochondriale par le complexe TIM23<sup>MOTEUR</sup>. Au niveau de la matrice, ces protéines prennent leur forme active après le clivage de leur pré-séquence par la peptidase mitochondriale (MPP : Mitochondrial Processing Peptidase). HSP60 intervient dans l'assemblage et le repliement des protéines importées en leur conformation finale. (B) TIM23<sup>MOTEUR</sup> : La translocase impliquée dans l'import des protéines vers la matrice mitochondriale. Elle est formée de la translocase TIM23 associée au complexe PAM (en rouge). MI : membrane interne; EIM, espace inter-membranaire; ME : membrane externe.

Afin d'évaluer la fonction de  $MAGMAS_{p.Asn76Asp}$ , l'activité d'import des pré-protéines vers la matrice mitochondriale a été estimée en détectant la protéine matricielle HSP60. Comme toute autre protéine de la matrice mitochondriale, HSP60 possède deux formes : la forme du précurseur et la forme mature qui correspond à la protéine active après le clivage de sa pré-séquence. Par Western blot, nous avons observé une accumulation significative de la forme du précurseur, exclusivement dans les souches  $pam16\Delta$ - $MAG_{Asn76Asp}$  quand leur phénotype muté a été induit (en d'autres termes, quand ces cellules ont été cultivées à une température non-permissive égale à 37 °C). Dans les souches normales  $pam16\Delta$ - $yPAM16$  et  $pam16\Delta$ - $MAGMAS$ , aux différentes températures, seule la forme mature de la protéine HSP60 a été détectée (Figure 30A).



**Figure 30:** La translocation des pré-protéines et l'analyse de l'expression de MAGMAS dans les souches de levures. Les souches YPH499- $pam16\Delta$ - $MAG_{WT}$  et YPH499- $pam16\Delta$ - $MAG_{Asn76Asp}$ , exprimant *MAGMAS* normal et muté, ont été construites par un brassage de plasmides (cf. Matériel et Méthodes). Les souches ont été cultivées à 28°C puis incubées à 37°C pendant 8 heures pour induire le phénotype muté. (A) Analyse de la translocation de protéines dans les souches de levures : la forme du précurseur de HSP60 ainsi que sa forme mature ont été détectées par Western blot, en utilisant les anticorps anti-HSP60. La forme du précurseur de HSP60 (non importé dans la matrice) a été accumulée uniquement chez les cellules mutées après induction de leur phénotype. p : Forme du précurseur de HSP60, m : forme mature de Hsp60. (B) L'immunomarquage de MAGMAS a permis de détecter un taux de la protéine plus faible chez les cellules mutées induites à température non-permissive que celui observé chez les souches exprimant *MAGMAS* normal. Les souches YPH499 - $pam16\Delta$ , exprimant le gène *Ypam16* ont servis de contrôle négatif.

## 1.5. L'évaluation de l'expression de la protéine MAGMAS

Le taux d'expression de la protéine MAGMAS (normale ou mutée) chez les différentes souches de levures, a été détecté par la technique de Western Blot réalisé à l'aide d'anticorps spécifiques à la forme humaine. Les souches YPH499*pam16Δ*, transformées par le vecteur *pPAM16 URA3* et exprimant yPam16, étaient donc considérées comme un contrôle négatif.

Par immunomarquage de MAGMAS, nous avons observé qu'à des conditions de température non-permissives, le taux de la protéine mutée détecté chez les souches YPH499-*pam16Δ*-MAG<sub>Asn76Asp</sub> est inférieur à celui de la protéine normale observé chez les souches YPH499-*pam16Δ*-MAG<sub>WT</sub> (Figure 30B).

## 1.6. Analyses morphologiques

Le rôle crucial de *MAGMAS* et de ses homologues dans la biogenèse des mitochondries et le maintien de leurs morphologies a bien été démontré (Frazier et al., 2004; Roy et al., 2012; Short et al., 2012; Sinha et al., 2010). Ceci nous a amené à examiner l'aspect des mitochondries dans les différentes souches de levures. Nous avons observé en microscopie électronique un aspect anormal et fragmenté des mitochondries dans les souches mutées induites à une température non permissive, différant du réseau mitochondrial observé dans les souches normales (Figure 31A).

Un trouble de la biogenèse des peroxysomes a également été rapporté chez certaines souches de levures portant des mutations dans le gène *pam16* (Short et al., 2012). Nous avons examiné la morphologie des peroxysomes chez les souches BY-*pam16Δ*-MAG<sub>WT</sub> et BY-*pam16Δ*-MAG<sub>Asn76Asp</sub> après les avoir transformées par le vecteur pUG34DsRed.SKL. Nous avons observé une grande vacuole rouge, témoignant d'un mécanisme de pexophagie, chez les souches mutées cultivées dans des conditions de température non-permissives (Figure 31B).

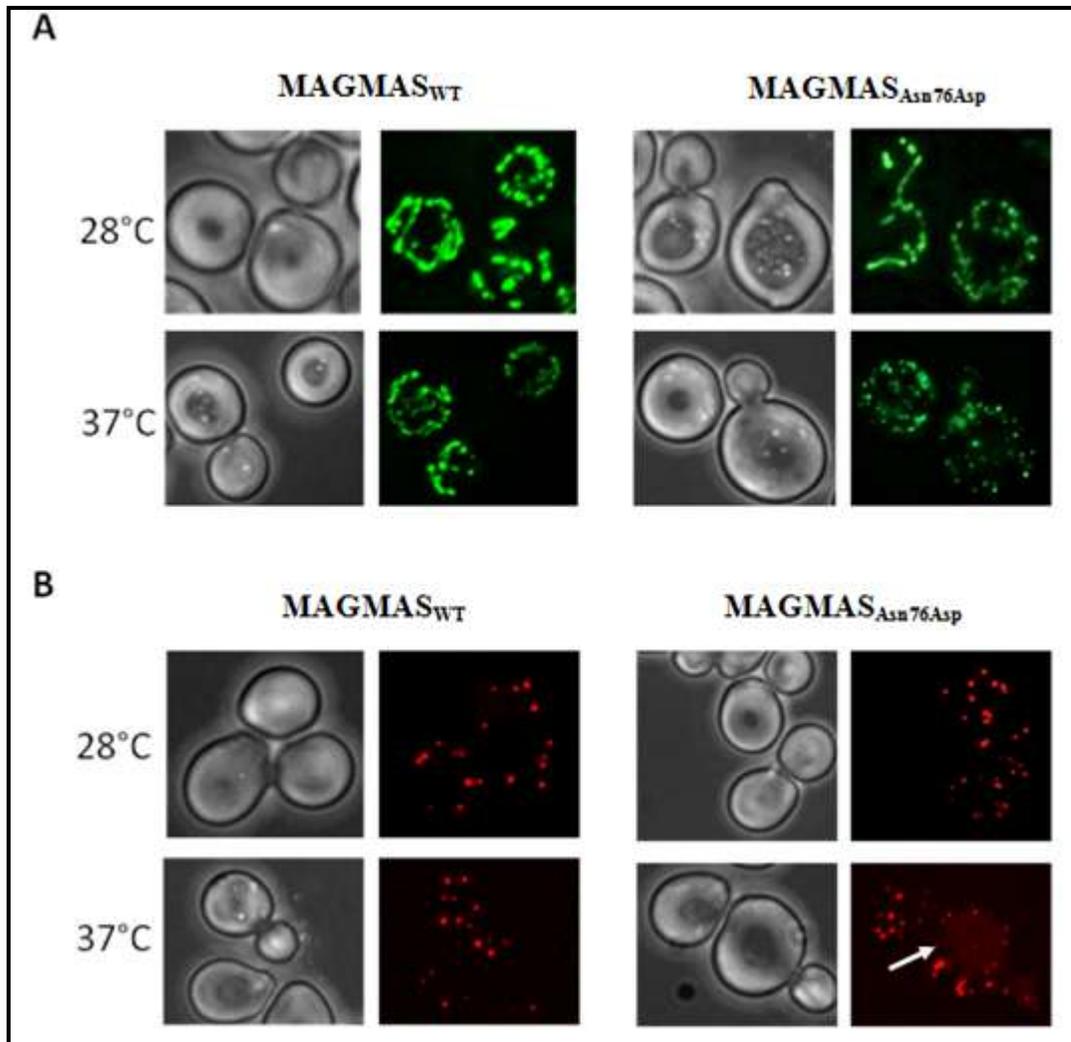


Figure 31: Analyse morphologique par Microscopie Electronique des différentes souches de levures. (A) Aspect anormal et fragmenté des mitochondries dans les souches mutées induites à température non permissive. (B) Peroxysomes : halot rouge (flèche blanche) témoignant de la pexophagie des cellules mutées induites à température non permissive.

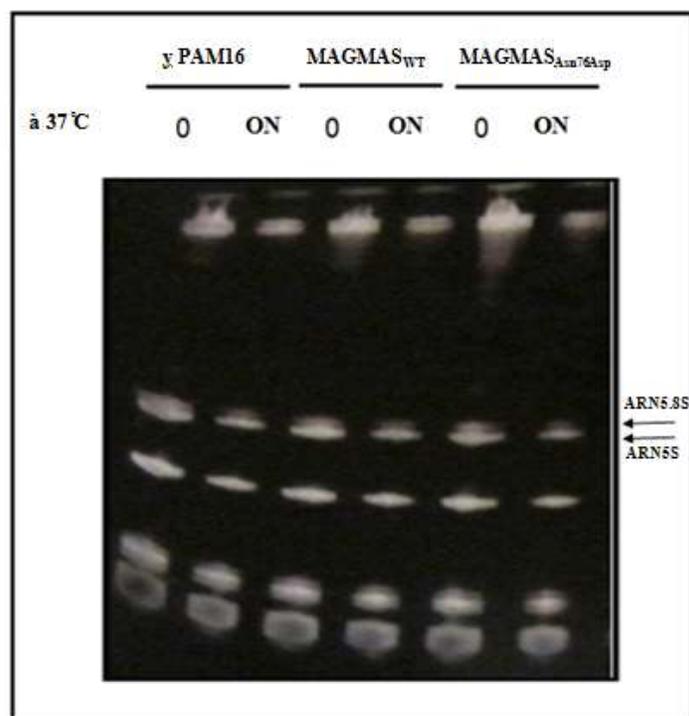
### 1.7. L'analyse du profil d'ARNr dans les différentes souches de levures

Bien que le spectre clinique des maladies mitochondriales soit extrêmement large en raison de la présence de mitochondries dans tous les organes, à ce jour, des dysplasies

squelettiques en rapport avec un dysfonctionnement mitochondrial n'ont pas été décrites. Seules des mutations du gène *RMRP* (RNA component of the mitochondrial RNA processing endoribonuclease) ont été rapportées dans un spectre clinique allant du cartilage hair hypoplasia, dysplasie métaphysaire avec déficit immunitaire à la dysplasie anauxétique, forme la plus sévère. *RMRP* code pour un ARN qui fait partie des deux complexes endoribonucléotidiques mitochondrial (mtMRP) et nucléaire (NuMRP) (Bonafé et al., 2002; Glazov et al., 2011). Un lien entre la fonction des complexes ribonucléotiques étudiée par le profil des ARN ribosomiaux (ARN<sub>5.8S</sub> et ARN<sub>5S</sub>) et les manifestations osseuses a été suggéré (Thiel et al., 2007). Nous avons ainsi étudié ce profil dans les différentes souches de levures construites.

Après extraction de l'ARN total des souches de levures, leur séparation sur gel polyacrylamide a montré le même profil chez les 3 souches YPH499-*pam16Δ-pPAM16*, YPH499-*pam16Δ-MAG<sub>WT</sub>* et YPH499-*pam16Δ-MAG<sub>Asn76Asp</sub>* induites ou non à une température non permissive.

Ces travaux ont fait l'objet d'un manuscrit (annexe 11) qui est soumis au *American Journal of Human Genetics* (septembre 2013).



**Figure 32:** Profil normal des ARN ribosomiaux des différentes souches de levures. Ces dernières ont été cultivées à 28°C (temps 0) puis induites à une température non permissive (égale à 37°C) pour une nuit (ON : OverNight).

## 2. Famille C

### 2.1. Etude de liaison par puces d'ADN

Les ADNs des sujets appartenant à la famille C ont été génotypés à l'aide de puces à ADN couvrant le génome avec une densité d'environ 262 000 SNP/puce (*Affymetrix GeneChip® Human Mapping NspI 250 K Array*). Les résultats sont générés sous forme d'un tableau qui est disponible sur demande.

L'analyse de ces données par le logiciel *EasyLinkage* nous a permis d'identifier trois régions d'homozygotie d'intérêt dont l'une est supposée contenir le gène responsable de la maladie autosomale récessive étudiée. Ces résultats ont été confirmés par le logiciel *HomozygosityMapper* (Figure 33).

Les trois régions identifiées sont localisées au niveau des chromosomes 2, 7 et 19, comme suit :

- **Au niveau du chromosome 2**, en 2p22.1-p16.3, une région d'homozygotie d'environ 7,3Mb a été détectée avec un Lod Score de 2,9 (légèrement inférieur à la valeur significative qui est égale à 3).
- **Au niveau du chromosome 7**, en 7q36.2-q36.3, une région d'homozygotie d'environ 3Mb a été détectée avec un Lod Score de 2,9.
- **Au niveau du chromosome 19**, en particulier 19p13.12-q11, une région d'homozygotie d'environ 9,5Mb a été détectée avec un Lod Score de 2,9. (A noter que cette région était séparée, par une petite région non homozygote chez les atteints, mais nous l'avons prise en considération, dans sa totalité).

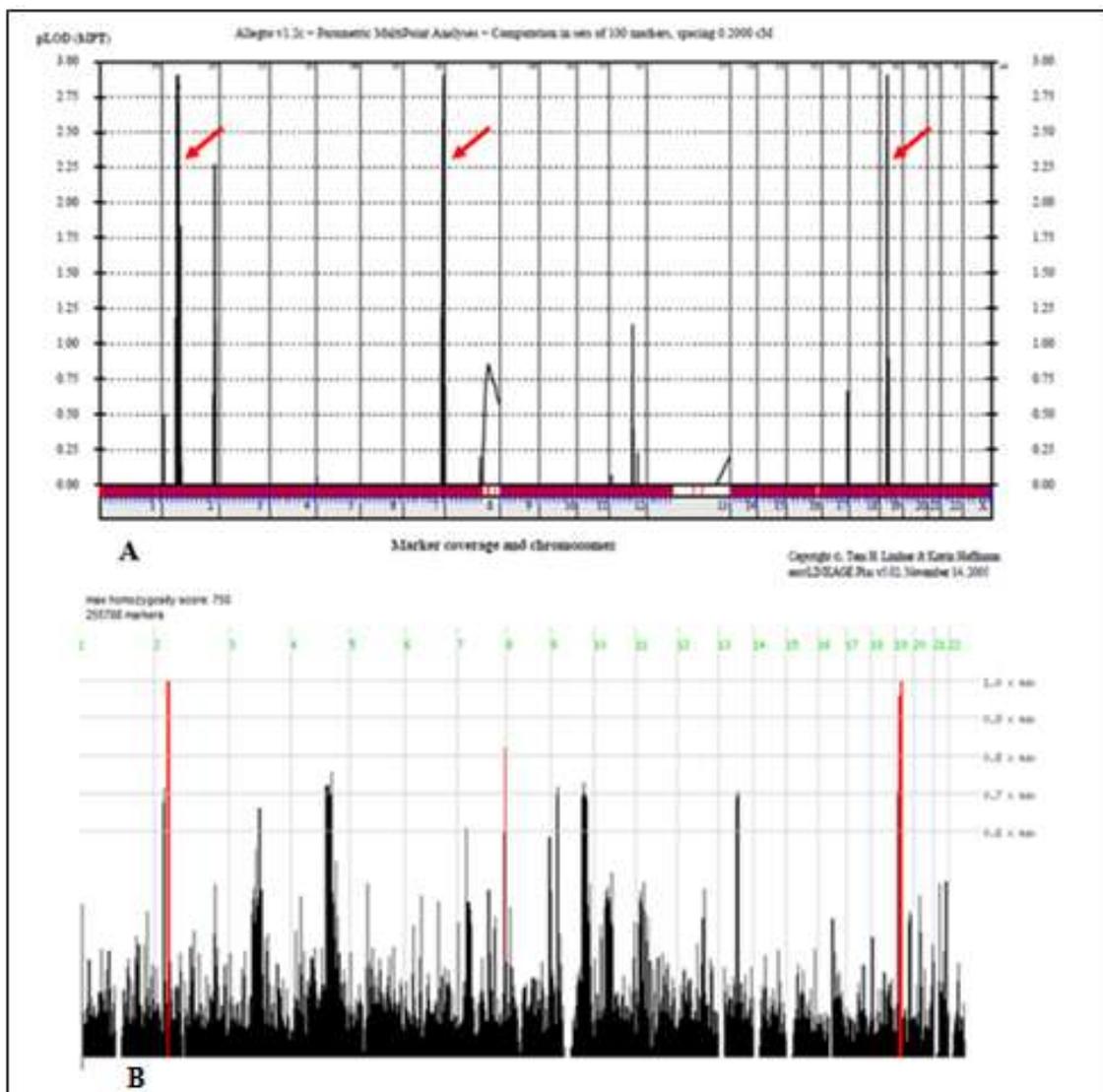


Figure 33: Résultats de l'étude de liaison de la famille C, réalisée à l'aide du kit d'Affymetrix 250K NspI et analysée (A) le logiciel EasyLinkage, (B) HomozygosityMapper.

## 2.2. Construction des haplotypes par marqueurs microsatellites

Dans le but de confirmer les résultats de l'étude de liaison par puces à SNP et de raffiner nos régions d'homozygotie, nous avons établi, les haplotypes des membres de la famille C aux loci d'intérêt, en utilisant des marqueurs microsatellites.

- 1) Six marqueurs situés en 2p22.1–2p16.3 ont été utilisés; notamment, D2S235E, D2S2328, D2S2305, D2S391, D2S2153 et D2S378. Nous avons confirmé cette première région d'homozygotie (Figure 34).
- 2) Cinq marqueurs microsatellites, localisés au niveau de la région 7q36.2-7q36.3 (D7S2462, D7S2546, D7S2465, D7S2423 et D7S98), ont également été étudiés, confirmant cette deuxième région d'homozygotie (Figure 35).
- 3) Au niveau du chromosome 19, nous avons étudié les marqueurs microsatellites suivants : D19S914, D19S892, D19S917, D19S410, D19S911, D19S925, D19S875 et D19S225. Ces derniers nous ont permis de délimiter la région d'intérêt par les marqueurs D19S892 -D19S911 (définissant une région d'environ 6,4 Mb, en 19p13.12-19p12) (Figure 36).

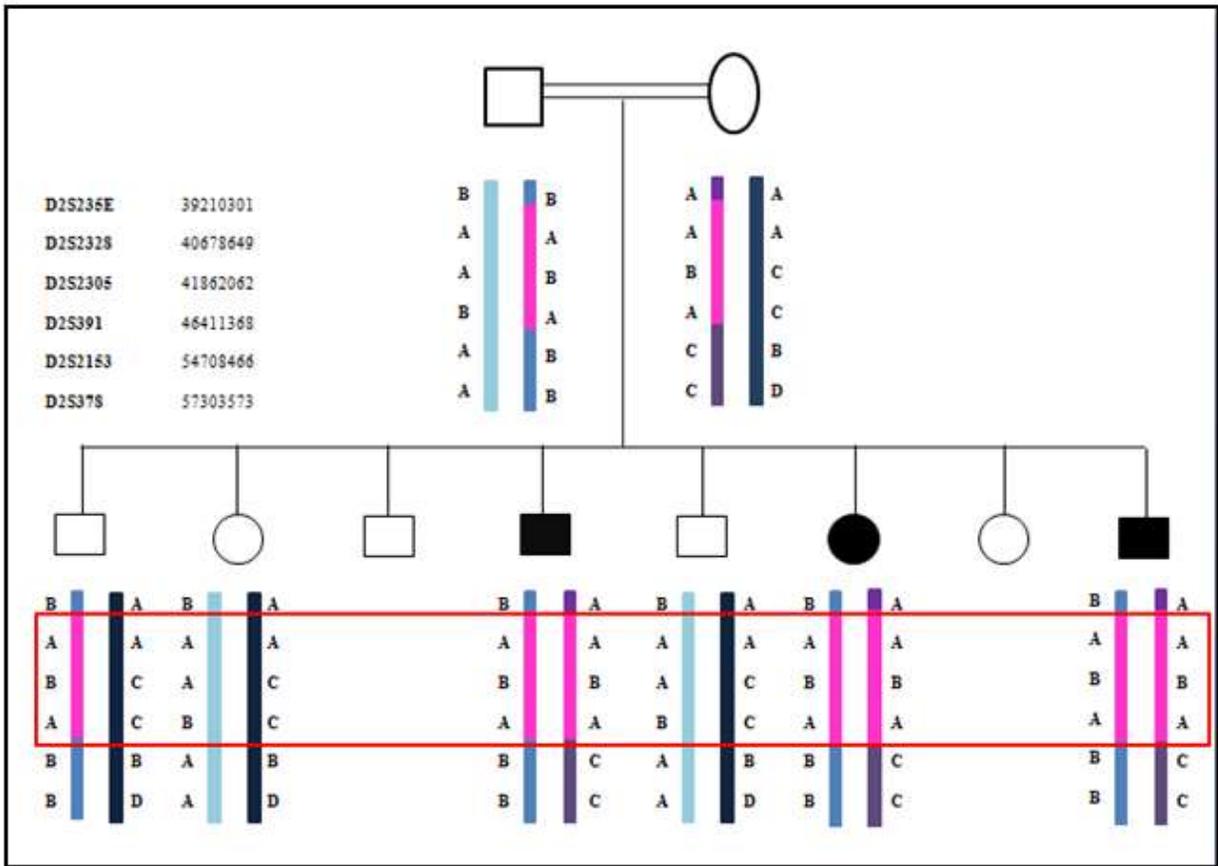


Figure 34: Haplotype de la région d'intérêt de la famille C localisée sur le chromosome 2, d'environ 15,5 Mb.

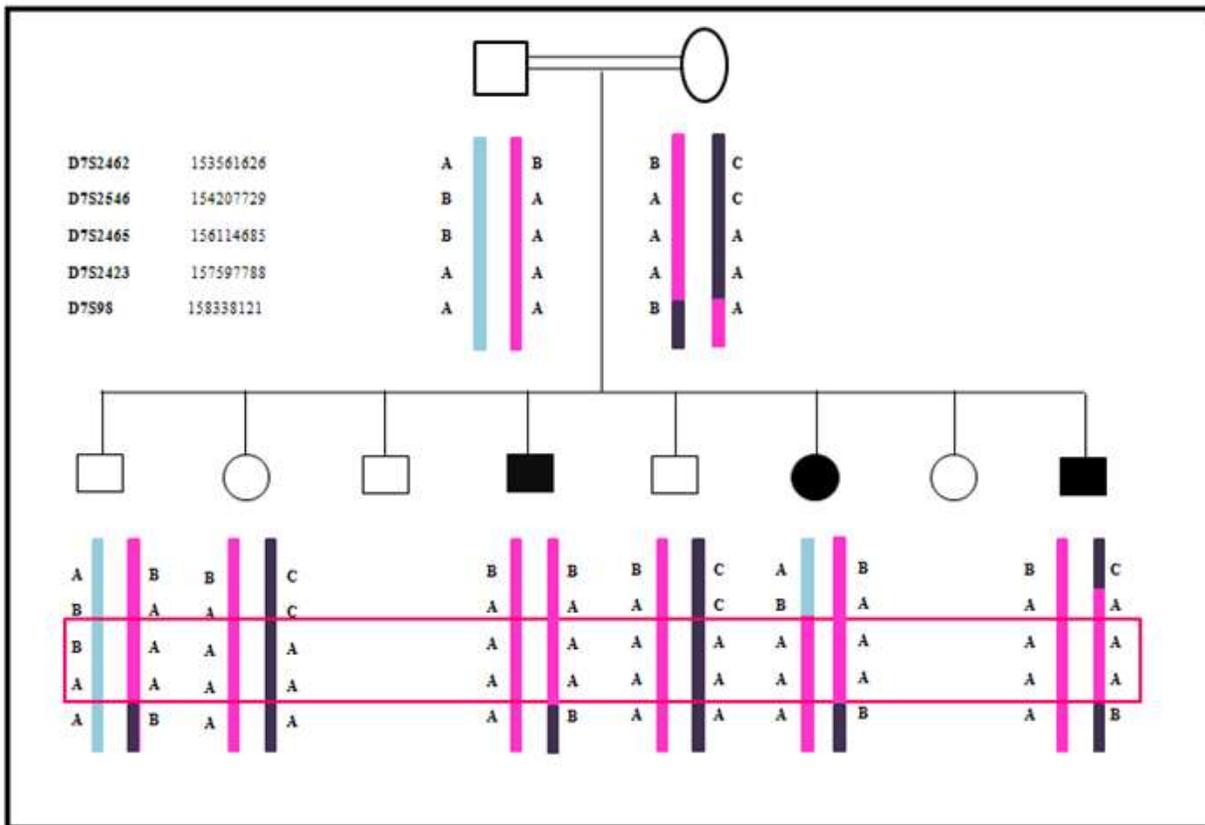


Figure 35: Haplotype de la région d'intérêt de la famille C localisée sur le chromosome 7, d'environ 4,1 Mb

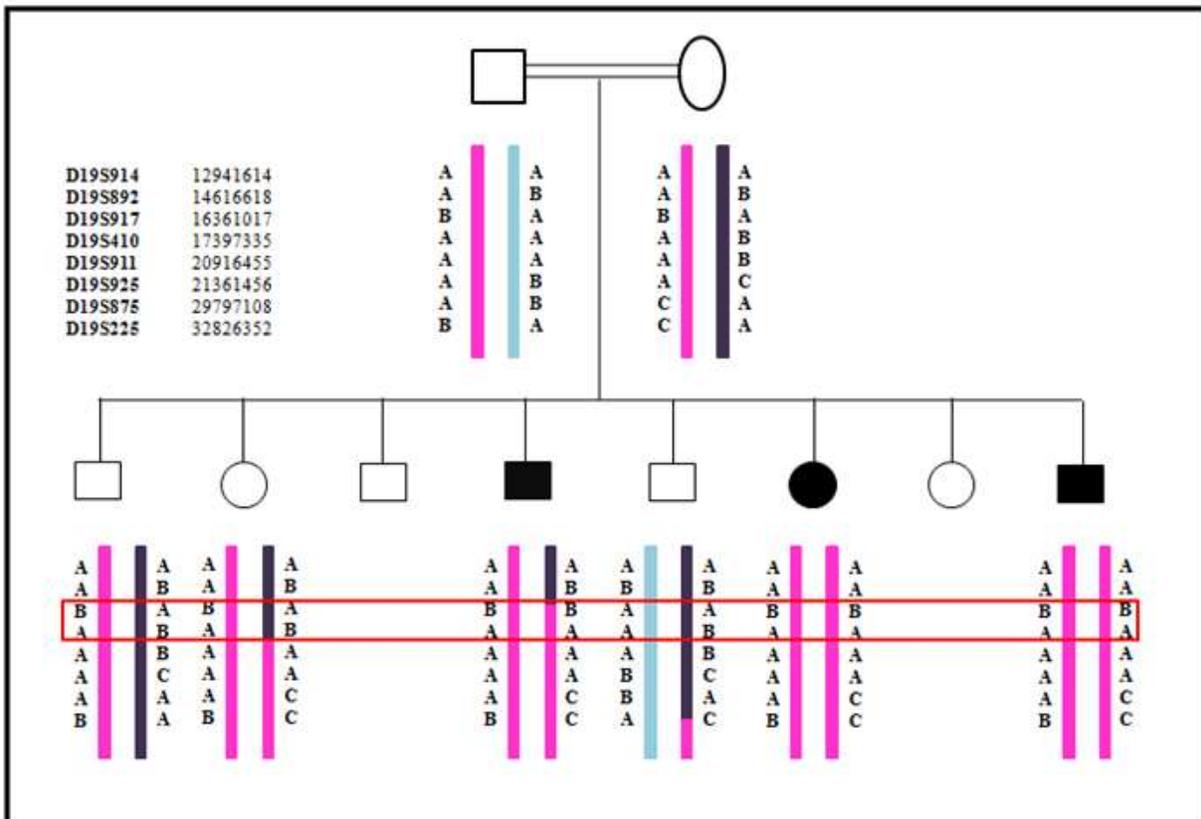


Figure 36: Haplotype de la région d'intérêt de la famille C localisée sur le chromosome 19, d'environ 6,3 Mb.

### 2.3. Le séquençage de l'exome

Après avoir défini trois régions d'homozygotie pour cette famille, le séquençage de l'exome d'un patient, CP1, a été réalisé.

Plusieurs critères ont été pris en considération pour la sélection de la mutation pathogène. Ainsi, les polymorphismes répertoriés dans les bases de données (dbSNP13 et dbSNP Liban) et les variations synonymes (à l'exception de celles affectant un site d'épissage) ont été exclus. Ensuite, en se basant sur le mode autosomique récessif de la dysplasie étudiée et en prenant en considération que les enfants sont issus de mariages consanguins, seules les variations homozygotes ont été considérées.

Parmi ces dernières, seules celles localisées au niveau des régions d'homozygotie ont été retenues (Figure 37).

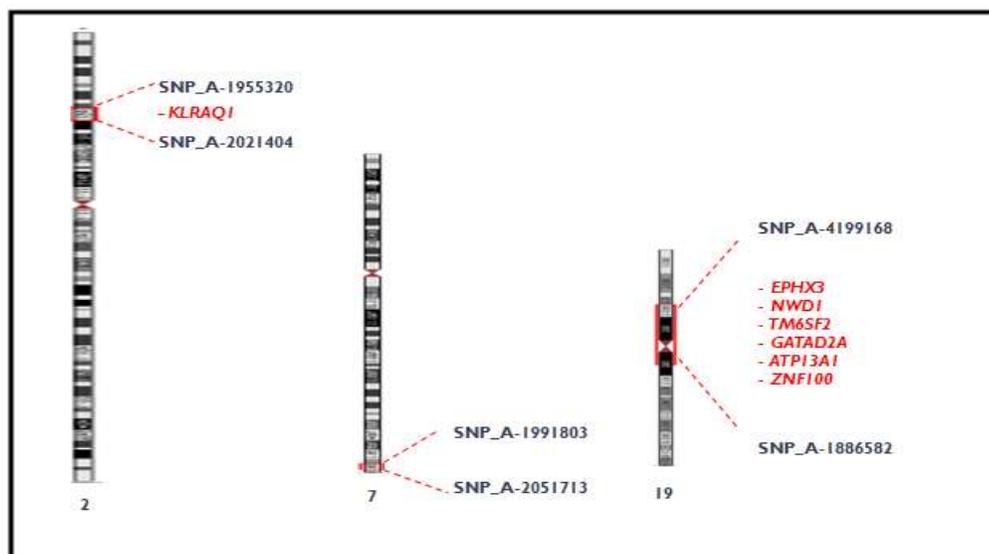


Figure 37: Variations sélectionnées au niveau des régions d'homozygotie.

Nous avons ainsi sélectionné :

- Une variation du gène *KLRAQ1*, localisé au niveau de la région du chromosome 2 (Tableau 9).
- Aucune variation n'a été identifiée au niveau de la région du chromosome 7.
- Six variations ont été détectées au niveau de la région d'homozygotie du chromosome 19 (Tableau 9).

**Tableau 9: Variations homozygotes sélectionnées du séquençage de l'exome de CPI.**

Chr.	Gène	Position génomique	Type de la Variation	Fonction de la variation	Variation	Réf.	Var.	Etat de la variation
2	<i>KLRAQ1</i>	48725795	SNP	Exonique	NM_152994 : c.A1856G : p.Asn619Ser	A	G	Homozygote
19	<i>EPHX3</i>	15341800	SNP	Exonique	NM_024794 : c.A589G : p.Ser197Gly	A	G	Homozygote
19	<i>NWD1</i>	16918787	SNP	Exonique	NM_001007525 : c.G4127A : p.Cys1376Tyr	G	A	Homozygote
19	<i>TM6SF2</i>	19375661	SNP	Exonique	NM_001001524 : c.G946A : p.Ala316Thr	G	A	Homozygote
19	<i>GATAD2A</i>	19576377	SNP	Exonique	NM_017660 : c.G223A : p.Glu75Lys	G	A	Homozygote
19	<i>ATP13A1</i>	19756787	SNP	Exonique	NM_020410 : c.C3256G : p.Gln1086Glu	C	G	Homozygote
19	<i>ZNF100</i>	21926903	SNP	Exonique	NM_173531 : c.A238T : p.Thr80Ser	A	T	Homozygote

La confirmation de ces variations ainsi que leur ségrégation avec la maladie dans la famille a été ensuite réalisée par séquençage direct chez tous les membres de la famille C. Nous avons ainsi exclu les gènes *TM6SF2*, *GATAD2A* et *ATP13A1* dont les variations ont été détectées à l'état homozygote chez un des enfants non atteints de la famille.

Enfin, parmi les 4 gènes restants (*KLRAQ1*, *EPHX3*, *NWD1* et *ZNF100*), la sélection de la variation causale s'est basée sur les scores de pathogénicité attribués par les logiciels de prédiction à chacune de ces variations. Ces scores dépendent de différents critères dont la nature de la mutation, la conservation entre les espèces de l'aa muté et le changement induit par la mutation, sur la structure de la protéine. *EPHX3*, *ZNF100* et *KLRAQ1* ont été exclus avec des scores compris entre 0 et 0,021. Par contre, la mutation p.Cys1376Tyr du gène *NWD1*, considérée délétère avec un score de pathogénicité égal à 0,928, a été sélectionnée comme mutation causale. Par séquençage, nous avons vérifié l'absence de p.Cys1376Tyr chez une série de 150 contrôles libanais.

Afin de confirmer notre choix et d'écartier la possibilité de présence de mutations supplémentaires, localisées au niveau des régions d'homozygotie mais non détectées par l'exome (en d'autres termes, l'occurrence des faux-négatifs), nous avons exploré la couverture, par le séquençage de l'exome, des régions d'intérêt, en alignant les fichiers de format BED générés par l'exome à la séquence de référence du génome humain « hg19 ».

Parmi les quelques gènes non entièrement couverts, seuls trois semblaient être intéressants à investiguer : *EN2* (Engrailed Homeobox 2), *EPS15L1* (Epidermal Growth factor receptor Substrate 15-Like 1 isoform 1) et *LMBR1* (Limb region 1 protein homolog). Le séquençage direct des exons non couverts de ces gènes a montré un résultat normal, permettant d'exclure l'implication de ces gènes et de valider notre sélection du gène « *NWD1* » (Homo sapiens NACHT and WD repeat domain containing 1) comme gène responsable de la dysplasie rhizomélique de la famille C.

Ce gène, localisé au niveau du chromosome 19 en 19p13.11, code pour une protéine ayant des domaines WD répétés qui lui confèrent un rôle dans divers mécanismes comme la transduction

de signal, la régulation de la transcription, le transport vésiculaire et le contrôle du cycle cellulaire.

### 3. Famille D

#### 3.1. L'étude de liaison par puces d'ADN à SNP

La famille D, présentant un phénotype caractérisé par une avance staturale et une dysmorphie faciale, a fait l'objet d'une étude de liaison par puces d'ADN à SNP. Les résultats obtenus, générés sous forme d'un tableau, sont disponibles sur demande.

L'analyse de ces données par le logiciel *EasyLinkage* nous a permis d'identifier, essentiellement, sept régions d'homozygotie de Lod score maximal égal à 2,5 (et 4 autres de Lod égal à 2,25 près). Le logiciel *HomozygosityMapper* a identifié quatre régions d'homozygotie. Pour la suite de nos analyses, nous avons combiné les résultats des deux logiciels et avons donc pris en considérations toutes les régions détectées ayant le Lod score le plus élevé (~2,5) (Figure 38) :

- **Région d'homozygotie sur le chromosome 1**, en 1p21.3-p21.2, de taille égale à environ 1,2 Mb.
- **Région d'homozygotie sur le chromosome 2**, en 2p16.3-p16.1, de taille égale à environ 8,2 Mb.
- **Région d'homozygotie sur le chromosome 5**, en 5p15.33, de taille égale à environ 1,1 Mb.
- **Région d'homozygotie sur le chromosome 11**, en 11p15.1, de taille égale à environ 1,8 Mb.
- **Région d'homozygotie sur le chromosome 14**, en 14q21.2-q22.1 de taille égale à environ 7 Mb.
- **Région d'homozygotie sur le chromosome 15**, en 15q14-q22.1, de taille égale à environ 23,7 Mb.

- **Région d'homozygotie sur le chromosome 18**, en 18p11.31-p11.23, de taille égale à environ 1 Mb.
- **Région d'homozygotie sur le chromosome 22**, en 22q12.3-q13.32 de taille égale à environ 12,8 Mb.

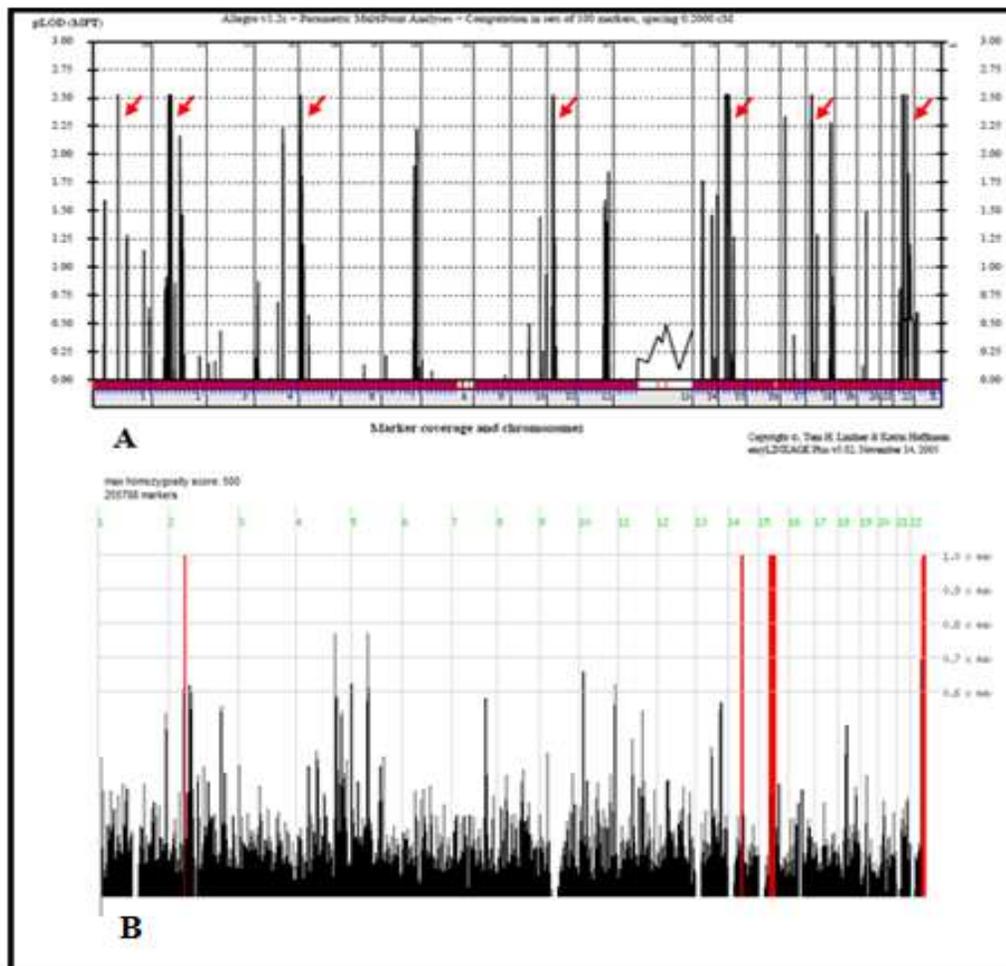


Figure 38: Résultats de l'étude de liaison de la famille D, réalisée à l'aide du kit d'Affymetrix 250K NspI et analysée (A) le logiciel EasyLinkage, (B) HomozygosityMapper.

### 3.2. Le séquençage de l'exome

Le séquençage de l'exome de la patiente DP1 a été réalisé. Un nombre très important de variations génomiques a été alors détecté. Afin de sélectionner la mutation causale, les données générées par l'exome ont été filtrées en éliminant, tout d'abord, les variations synonymes (sauf celles affectant un site d'épissage) ainsi que celles répertoriées dans les bases des données des polymorphismes. Les variations homozygotes ont ensuite été sélectionnées. Parmi ces dernières, seules celles localisées au niveau d'une des régions d'homozygotie (définies par l'étude de liaison), ont été retenues (Tableau 10).

**Tableau 10: Liste des variations homozygotes sélectionnées après le filtrage des résultats du séquençage de l'exome de DP1.**

Chr.	Gène	Position génomique	Type de la Variation	Fonction de la variation	Variation	Réf.	Var.	Etat de la variation
2	<i>CHAC2</i>	54001442	SNP	Exonique	NM_001008708 : c.C335T : p.Thr112Ile	C	T	Homozygote
14	<i>METTL21D</i>	50583172	SNP	Exonique	NM_001040662 : c.T99G : p.Tyr33X	A	C	Homozygote
15	<i>BAHD1</i>	40752020	SNP	Exonique	NM_014952 : c.G1357A : p.Gly453Arg	G	A	Homozygote
15	<i>TTBK2</i>	43045234	SNP	Exonique	NM_173500 : c.T2210C : p.Ile737Thr	A	G	Homozygote
15	<i>PATL2</i>	44962224	SNP	Exonique	NM_001145112 : c.G719A : p.Arg240GlnQ	C	T	Homozygote

Parmi les gènes sélectionnés, *BAHD1*, *TTBK2* et *PATL2*, ont été exclus par PolyPhen avec des scores de pathogénicité de leurs variations compris entre 0 et 0,035. Le logiciel *Alamut*, nous a ensuite permis d'exclure le gène *CHAC2* dont le variant est décrit comme polymorphisme validé par le projet du 1000 Génomes (le polymorphisme « rs143366196 »). Les résultats de toutes nos analyses nous ont guidés vers la sélection du gène *METTL21D* comme gène responsable du phénotype de la famille D. Par un séquençage de type Sanger, nous avons vérifié la ségrégation de la mutation non-sens du gène *METTL21D* (p.Tyr33X) avec la maladie dans la famille D; p.Tyr33X a été détectée à l'état homozygote chez les deux patients

DP1 et DP2 et hétérozygote chez leurs parents ainsi que chez leur frère sain. Enfin, cette mutation n'a pas été trouvée dans une série de 170 contrôles libanais.

*METTL21D* (Homo sapiens methyltransferase like 21D), localisé en 14q21.3, est un gène à 6 exons, qui code pour une protéine appartenant à la famille des lysines méthyltransférases. Son implication dans la dysplasie osseuse de cette famille lui confère un rôle de régulation du mécanisme complexe d'ossification endochondrale.

### **3.3. Analyse de l'expression du gène *METTL21D* par qRT-PCR**

L'identification d'une mutation non-sens dans le gène *METTL21D* nous a conduit à vérifier les conséquences sur l'expression des ARNm, pour envisager ou non un mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (ou Nonsense mediated decay ou NMD). Cette étude a été réalisée à partir d'ARNm extraits de cellules sanguines, chez tous les membres de la famille D ainsi que chez trois sujets contrôles. La qRT-PCR n'a montré aucune différence significative entre les patients, leurs parents et les contrôles sains.

## 4. Famille E

Les données cliniques et radiologiques des deux patientes EP1 et EP2 évoquent une forme modérée du syndrome de Robinow, qui est caractérisé par un retard statural, un raccourcissement mésomélique des membres, des anomalies vertébrales et un faciès typique d'apparence fœtale. Le pedigree suggère un mode de transmission autosomique récessif.

Le diagnostique étant posé, le séquençage de la région codante du gène *ROR2* (Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 2) [MIM 602337], responsable de la forme récessive du syndrome de Robinow (RRS; Recessive Robinow Syndrome), a été réalisé chez la patiente EP1.

Quatre variations ont été identifiées. Parmi elles, deux sont des polymorphismes déjà répertoriées dans les bases de données : « IVS4+23G>A (rs12683181) » et « IVS6-33C>T (rs10992070) ». La troisième est une variation synonyme « c.762C>T ; p.Asp254Asp », qui, d'après le logiciel *Alamut*, ne semble affecter aucun site d'épissage. La quatrième est une mutation faux-sens « c.814C>T; p.Arg272Cys », identifiée à l'état homozygote chez la patiente EP1. Le séquençage direct, chez tous les membres de la famille C a confirmé la ségrégation de cette mutation avec la maladie dans cette famille (Figure 39). p.Arg272Cys est présente à l'état homozygote chez les patientes EP1 et EP2 et à l'état hétérozygote chez leurs parents ainsi que chez l'un de leurs frères sains. Cette mutation n'a pas été identifiée dans une série de 100 sujets contrôles libanais.

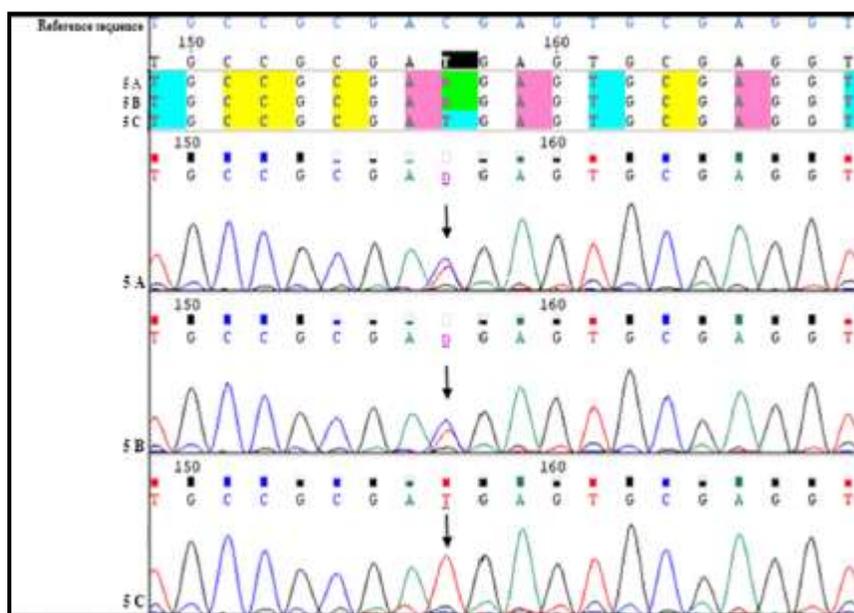


Figure 39: Ségrégation de la mutation p.Arg272Cys avec la mutation dans la famille E.

Enfin, un score de pathogénicité égal à 0,998 a été attribué, par le logiciel *Polyphen*, à cette mutation p.Arg272Cys, qui est localisée au niveau du domaine extracellulaire « CRD » (Cysteine rich domain) du ROR2. D'autres patients portant des mutations au niveau du même domaine, ont été déjà décrits. La comparaison des critères cliniques et radiologiques de ces sujets avec ceux des patients EP1, EP2, est représentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

(Ces résultats ont été publiés dans *European Journal of Medical Genetics*. Une nouvelle mutation du gène *ROR2* a été identifiée chez deux patientes présentant une forme clinique très modérée du syndrome de Robinow et une malformation inhabituelle au niveau de la main droite de l'une d'entre elles – cf l'annexe 12).

**Tableau 11 : Comparaison clinique entre les patients portant une mutation du domaine CRD. (\*) p.Arg184ysC est localisée au niveau du CRD. P.Arg119X au niveau du domaine Ig. NR : Not Reported. Extrait de Mehawej *et al.*, 2012.**

Patients	Present report (Case 1)	Present report (Case 2)	Ali et al. 2007 (Case 1)	Ali et al. 2007 (Case 2)	Tufan et al. 2005
Origin	Lebanon	Lebanon	Egypt	United Kingdom	Germany
Gender	Female	Female	Male	Female	Male
Consanguinity	+	+	+	-	-
Mutation	p.[R272C]+[=]	p.[R272C]+[=]	p.[Y192D]+[=]	p.[R244W]+[=] and p.[A245T]+[=]	p.[R119X]+[R184C] *
Short stature	+	+	+	+	+
Macrocephaly	+	+	+	+	+
Fetal facies	+	+	+	+	+
Prominent forehead	+	+	+	+	+
Hypertelorism	+	+	+	+	+
Upslanting palpebral fissures	+	+	+	NR	NR
Prominent eyes	+	+	NR	NR	NR
Short nose	+	+	+	NR	+
Short/depressed nasal bridge	+	+	+	+	+
Crowded teeth	+	+	+	+	+
Mesomelic shortening of the upper limbs	+	+	+	NR	+
Limitation of supination and pronation of the forearms	+	-	NR	NR	+
Brachydactyly	+	+	+	+	+
Syndactyly		+	NR	NR	-
Short and broad phalanges	+	+	NR	+	+
Abnormal vertebrae	+	-	NR	-	+
Normal ribs	+	+	NR	NR	-
Cardial defects	-	-	+	NR	-
Genital abnormalities	-	-	+	NR	+

## **V- Interprétation des résultats**

« Treasure your exceptions ! »

William Bateson

## 1. Familles A et B

Le séquençage de l'exome de deux patients libanais consanguins et non apparentés, présentant une dysplasie spondylo-métaphysaire sévère, nous a permis d'identifier une mutation dans le gène *MAGMAS* comme étant à l'origine de cette entité récemment décrite par Mégarbané et ses collaborateurs (Mégarbané et al., 2008, 2013).

*MAGMAS*, également connue sous le nom de PAM16, a été décrite pour la première fois par Jubinsky et ses collaborateurs comme une protéine associée à la mitochondrie, exprimée par la majorité des cellules de mammifères et impliquée dans la signalisation du facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages « GM-CSF » (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (Jubinsky et al., 2001). Nos travaux ont montré l'implication de *MAGMAS* dans une dysplasie osseuse sévère, attribuant ainsi à cette protéine un rôle spécifique dans le processus complexe d'ossification endochondrale. *MAGMAS* est exprimée dans la notochorde, les somites et le cartilage (Jubinsky et al., 2003). Cependant, aucun lien entre ce gène et la squelettogénèse n'a été décrit à ce jour. Grâce à un marquage immunohistochimique, nous avons détecté une expression de *MAGMAS* dans la plaque de croissance, notamment au niveau des ostéoblastes et des chondrocytes différenciés hypertrophiques, confirmant le rôle de ce gène dans la squelettogénèse. En parallèle, l'absence de l'expression de la protéine de fusion CORO7-PAM16 par les cellules osseuses et chondrocytaires nous a permis d'exclure son implication dans la pathogenèse de cette dysplasie osseuse.

Une insuffisance respiratoire et une insuffisance cardiaque sont à l'origine du décès à un âge précoce des patients des familles A et B. Des études précédentes ont montré que le taux d'expression de *MAGMAS* est élevé dans le cœur et les poumons (Jubinsky et al., 2003). Ces observations peuvent évoquer l'hypothèse d'une probable contribution de *MAGMAS* aux bons fonctionnements cardiaque et pulmonaire.

*MAGMAS* fait partie du complexe PAM impliqué dans l'import actif des protéines vers la matrice mitochondriale. La grande majorité des protéines mitochondriales (~98%) est synthétisée dans le noyau ; l'existence de machineries complexes assurant le transport de ces protéines vers leurs destinations finales est donc cruciale pour le maintien de l'intégrité et du fonctionnement physiologique des mitochondries (Pfanner and Chacinska, 2002).

L'établissement des mécanismes d'assemblage et de transport des protéines vers ces organites résulte surtout des travaux de recherche portant sur les levures (Elsner et al., 2009; Jubinsky et al., 2003). Ces travaux ont montré que les protéines matricielles traversent la membrane externe mitochondriale via le complexe TOM (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane), puis, franchissent l'espace intermembranaire pour atteindre la matrice, à travers le complexe TIM23<sup>MOTEUR</sup>. Ce dernier est constitué de la translocase TIM23 (Translocase of the Inner mitochondrial Membrane) associée au complexe PAM qui, à son tour, est composé de différentes sous-unités contrôlant l'import actif des protéines vers la matrice. Le dépliement et la translocation des protéines est assuré par le centre ATP-dépendant du complexe PAM qui est la protéine chaperonne mtHSP70 (mitochondrial Heat Shock Protein 70). La fonction et la position de cette dernière sont régulées par 5 autres sous-unités de PAM, dont un facteur d'échange nucléotidique « MGE1 » et quatre protéines liées à la membrane, notamment TIM44, DNAJC19, MAGMAS et PAM17. MGE1 facilite la libération de l'ADP et la liaison de l'ATP. TIM44 est une protéine adaptatrice liant mtHSP70 à la translocase, d'une part, et à Magmas d'une autre part. DNAJC19 est une protéine qui stimule l'activité ATPasique de la mtHSP70. MAGMAS est une protéine ayant un domaine J-like, qui, en interagissant avec le domaine J de la DNAJC19, régule l'activité de cette dernière et sa liaison à la translocase. PAM17, quant à elle, est une protéine requise pour l'organisation correcte du complexe hétérodimérique stable MAGMAS/DNAJC19 (Figure 4) (D'Silva et al., 2007; Davey et al., 2006; Jubinsky et al., 2003; Sparkes et al., 2007).

MAGMAS est constituée d'un domaine amino-terminal hydrophobe, comportant un domaine d'association à la membrane (M) et un signal d'adressage à la mitochondrie (ou mitochondria Targeting region T), et d'un domaine carboxy-terminal J-like (J) caractérisé par trois hélices  $\alpha$  (D'Silva et al., 2005; Frazier et al., 2004). La mutation p.Asn76Asp, identifiée chez les patients des deux familles A et B, est localisée au niveau de l'hélice II du domaine J-like de la protéine MAGMAS (Figure 40). Vue l'implication de ce domaine dans l'interaction directe avec le domaine J de la DNAJC19 (Chacinska et al., 2009; Elsner et al., 2009; Wagner et al., 2009), la stabilité de l'hétérodimère formé par ces deux protéines semble être affectée par p.Asn76Asp. Des mutations de *DNAJC19*, altérant le complexe MAGMAS/DNAJC19, ont été déjà identifiées chez des patients présentant une cardiomyopathie dilatée avec une ataxie (CMDA). Un phénotype similaire était donc envisagé chez les patients des familles A et B. L'ataxie n'a pas pu être évaluée chez ces patients à cause de leur décès précoce. Par ailleurs,

seuls les sujets BP1 et BP2 présentait une cardiomyopathie. L'absence de CMDA chez les patients peut être expliquée par la redondance de la fonction du complexe MAGMAS/DNAJC19 au niveau de certains tissus.

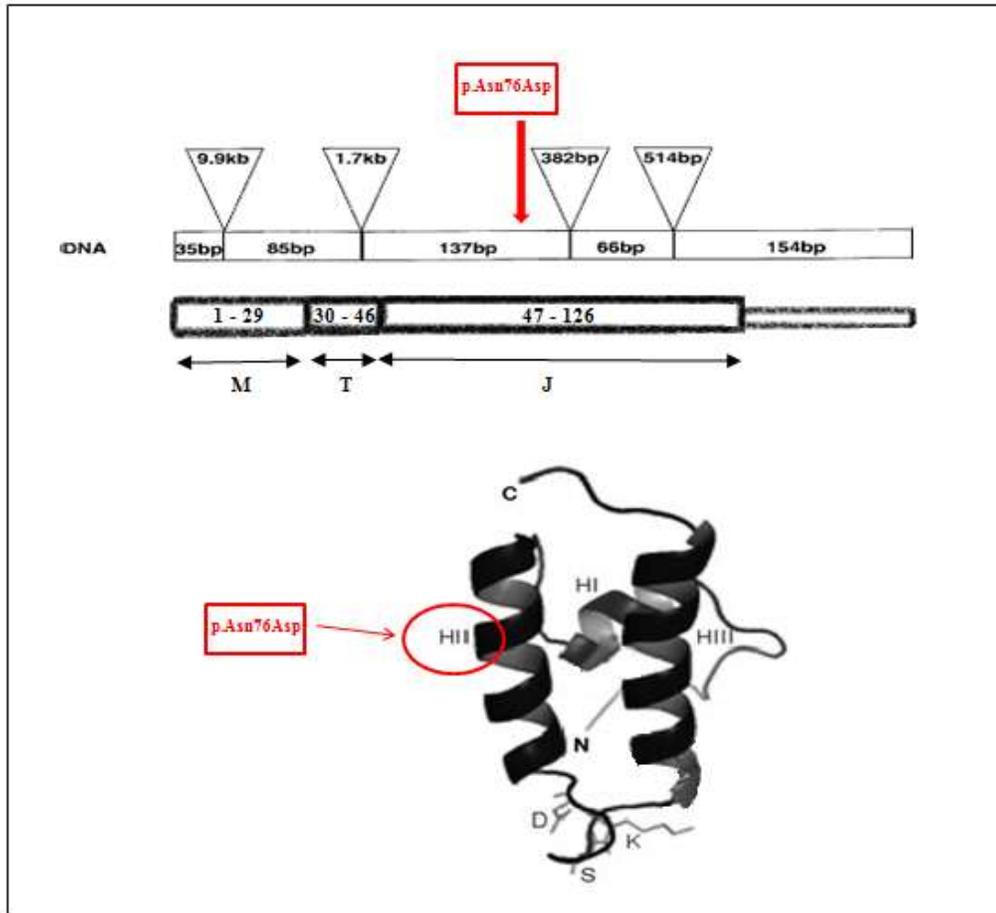


Figure 40: L'organisation structurale de MAGMAS. **(M)** Domaine d'association à la membrane, **(T)** Mitochondria Targeting region et **(J)** J-like domain. Les flèches indiquent la localisation de la mutation p.Asn76Asp. Schéma extrait et modifié de (Jubinsky et al., 2001; Sinha et al., 2010).

Les études fonctionnelles que nous avons réalisées chez la levure ont permis de valider l'effet pathogène de la mutation p.Asn76Asp sur la croissance des levures, la fonction de la protéine MAGMAS et la stabilité de cette dernière. Ainsi, le caractère thermosensible, observé chez les souches portant le gène humain muté à l'état homozygote, témoigne de l'effet délétère de la mutation sur la croissance des levures. Ce phénotype, observé uniquement dans les souches

homozygotes, est en corrélation avec le mode de transmission récessif de la dysplasie spondylo-métaphysaire étudiée. Dans les souches de levure construites, nous avons également démontré qu'à des températures non-permissives, p.Asn76Asp altère la fonction d'import des protéines vers la matrice mitochondriale. L'immunomarquage de MAGMAS, dans les différentes souches de levures, a montré que le taux de la protéine mutée est inférieur à celui de la protéine normale. L'expression de *MAGMAS* (normal ou muté) dans la levure étant sous le contrôle du promoteur fort TEF (du plasmide pRS415), le résultat de ce marquage suggère que la forme mutée de la protéine est moins stable que la forme normale.

L'association entre une protéine mitochondriale et une dysplasie osseuse décrite ici semble être surprenante du fait de la rareté des manifestations squelettiques dans les maladies mitochondriales. A ce jour, la seule dysplasie osseuse sévère pouvant être associée à un dysfonctionnement mitochondrial est la dysplasie anauxétique [MIM 607095]. Cette dernière est allélique à la dysplasie métaphysaire de type Mc Kusick [MIM 250250] et à la dysplasie métaphysaire sans hypotrichose [MIM 250460], qui sont des entités moins sévères. Le gène responsable de ces entités est le gène *RMRP* (RNA component of the Mitochondrial RNA Processing endoribonuclease) qui code pour un ARN du complexe endoribonucléotidique mitochondrial (MRP) (Bonafé et al., 2002; Ridanpää et al., 2001; Thiel et al., 2007). Or, ce complexe ne se trouve pas exclusivement dans la mitochondrie mais également dans le noyau. Les deux complexes, nucléaire et mitochondrial, semblent avoir le même ARN qui est associé à des protéines différentes, définissant deux fonctions diverses (Lu et al., 2010). L'implication de la protéine mitochondriale MAGMAS dans le contrôle de la fonction du complexe MRP a été exclue par l'observation du même profil d'ARNr dans les souches mutées et normales. De plus, la mutation du *POPI* (Processing of Precursor 1) [MIM 602486] codant pour une protéine du complexe ribonucléotidique nucléaire, identifiée récemment chez deux patients présentant une dysplasie anauxétique (Glazov et al., 2011), démontre l'implication du complexe ribonucléotidique nucléaire (plutôt que le complexe mitochondrial) dans l'étiologie de ces dysplasies squelettiques.

Outre la fonction de MAGMAS dans la régulation de l'import mitochondrial, cette protéine semble avoir des rôles extra-mitochondriaux importants. En effet, l'implication de MAGMAS dans la modification des histones, dans la biogenèse des peroxyosomes, dans la glycolyse et dans la synthèse des sphingolipides, a été récemment suggérée par Short et ses

collaborateurs (Short et al., 2012). De plus, la détection de différents transcrits humains de *MAGMAS*, dont certains ne renferment pas le signal d'adressage à la mitochondrie (Jubinsky et al., 2003), est en faveur de cette hypothèse.

L'observation d'un aspect fragmenté des mitochondries et d'une pexophagie intense dans les souches de levure mutées induites à une température non permissive, montre une induction de l'autophagie chez ces dernières. Ces résultats confirment les données de Roy et ses collaborateurs sur l'implication de *MAGMAS* dans le maintien de l'intégrité et de la viabilité cellulaire (Roy et al., 2012). Vu le rôle important attribué à l'autophagie dans le contrôle de la maturation et de la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance (Srinivas and Shapiro, 2006; Srinivas et al., 2009), on estime que l'induction par *MAGMAS* de l'autophagie précoce des chondrocytes, pourrait être responsable de la dérégulation du mécanisme d'ossification endochondrale chez les patients des familles A et B.

En conclusion, nos résultats ont permis d'identifier, pour la première fois, une mutation de *MAGMAS* dans une maladie humaine. Le lien établi entre *MAGMAS* et la dysplasie spondylo-métaphysaire des patients des familles A et B évoque un rôle clé de cette protéine mitochondriale dans le processus d'ossification endochondrale.

## 2. Famille C

Les patients de la famille C présentent un aspect trapu, un thorax plat, une brièveté des membres proximaux, un canal vertébral étroit et de petites épiphyses fémorales. Les données cliniques et radiologiques de ces patients évoquent une dysplasie rhizomélique de type autosomique récessif. Le séquençage direct du gène *FGFR3* a permis d'exclure son implication dans cette famille. Afin d'identifier la base moléculaire à l'origine de cette maladie, nous avons utilisé une stratégie couplant une approche de cartographie par homozygotie au séquençage de l'exome de l'un des patients. Nous avons ainsi identifié le gène « *NWD1* » comme étant le gène responsable de la dysplasie rhizomélique dans la famille C.

*NWD1* est un gène à 17 exons, qui code pour une protéine ayant 13 domaines WD (tryptophane-acide aspartique) et 1 domaine NACHT [neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), MHC class II transcription activator (CIITA), incompatibility locus protein from *Podospora anserina* (HET-E), and telomerase-associated protein (TP1)] impliqué dans la transduction du signal. Depuis son identification en 1986 (Fong et al., 1986), le motif WD a été retrouvé dans un nombre important de protéines, qui, actuellement constituent une large famille de plus de 123 entités. Il s'agit d'un domaine de 40 à 60 aa limité, du côté N-terminal, par le dipeptide glycine-histidine (GH) et du côté C-terminal, par le dipeptide WD. Une protéine est constituée par 4 à 16 unités répétitives qui sont désignées par « GH-WD repeats » ou « WD-repeats ». Ces protéines se différencient selon 3 critères essentiels qui sont les variations de séquence de leurs domaines WD, le nombre d'unités répétitives qui les constituent et les domaines supplémentaires qu'elles renferment (Li and Roberts, 2001). La fonction majeure commune à toutes ces entités est la coordination de l'assemblage des complexes protéiques grâce à l'échafaudage formé par les domaines WD (Smith et al., 1999). Ces protéines sont également impliquées dans divers processus physiologiques, dont la régulation de la transcription, la transduction du signal, le contrôle du cycle cellulaire, l'assemblage de la chromatine, la synthèse d'ARN et l'assemblage du cytosquelette. Le rôle spécifique de chacune de ces protéines permet sa classification dans l'une ou l'autre des sous-familles existantes (Yu et al., 2000). L'implication de *NWD1* dans la dysplasie rhizomélique de la famille C permet de lui attribuer un rôle significatif dans le mécanisme d'ossification endochondrale. D'autres protéines appartenant à la famille des protéines ayant des domaines WD répétitifs, ont été également associées au

processus d'ossification, parmi lesquelles, i) WDR35 (WD Repeat-Containing Protein 35), protéine impliquée dans le transport intraflagellaire et responsable de la dysplasie cranioectodermale 2 [MIM 613610] (Gilissen et al., 2010) et du syndrome côte courtes-polydactylie type V [MIM 614091] (Mill et al., 2011), ii) WSB-1 (WD repeat and SOCS box containing 1), une E3 ubiquitine ligase à motifs WD-40 qui module l'activation de l'hormone thyroïdienne et la sécrétion de PTHrP au niveau de la plaque de croissance (Dentice et al., 2005), iii) TRIP-1 (TGF- $\beta$  receptor II interacting protein 1) qui s'associe au domaine cytoplasmique du récepteur II de TGF- $\beta$  d'une manière kinase dépendante (Chen et al., 1995) et qui est impliquée dans l'induction de la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes ainsi que dans la minéralisation de la matrice osseuse (Ramachandran et al., 2012), et iv) STRAP (Serine/threonine kinase receptor associated protein) qui entre en interaction directe avec les récepteurs I et II du TGF- $\beta$  et agit, en synergie avec SMAD7 pour inhiber la voie de signalisation du TGF- $\beta$ .

Enfin, le séquençage du gène *NWD1* chez des patients qui semblent présenter les mêmes atteintes osseuses que celles des patients de la famille C, permettrait de mieux définir cette nouvelle entité et d'établir des corrélations de type génotype-phénotype.

### 3. Famille D

Le développement et la croissance d'un tissu dépendent de plusieurs facteurs qui conditionnent et contrôlent les différentes étapes de la vie d'une cellule, depuis sa prolifération jusqu'à sa mort programmée. Le cycle cellulaire, par exemple, est régulé par les cyclines kinases CDK (cyclines-dependent kinases) qui interagissent avec les cyclines pour former des complexes hétérodimériques spécifiques à chaque phase de ce cycle. L'activité de ces kinases est, à son tour, modulée par des agents inhibiteurs comme les CKI (cyclines-dependent kinases inhibitors) (Domingo-Sananes et al., 2011).

La croissance en hauteur d'un sujet est assurée par le mécanisme d'ossification endochondrale qui se manifeste par la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance épiphysaire et par leur différenciation en ostéoblastes. La taille éventuelle d'un adulte est surtout déterminée par son potentiel génétique mais aussi par divers facteurs endocriniens et métaboliques qui contrôlent le processus d'ossification endochondrale (Neylon et al., 2012). La dérégulation de ce mécanisme engendre soit un retard statural, soit une avance staturo-pondérale qui peuvent être associés, dans le cadre d'un syndrome génétique particulier, à d'autres critères cliniques ou dysmorphologiques. La dernière classification internationale et nosologie des dysplasies osseuses génétiques (Warman et al., 2011) reconnaît différentes formes syndromiques d'avances staturales rassemblées dans le groupe 30. Citons à titre d'exemples, i) le syndrome de Sotos [MIM 117550], dû à des mutations de *NSDI* (nuclear receptor binding SET domain protein 1) [MIM 606681], ii) le syndrome de Weaver [MIM 277590], dû à des mutations du gène *EZH2* (Enhancer of Zeste homolog 2) [MIM 601573], iii) le syndrome de Marshall-Smith [MIM 602535], dû à des mutations du *NFIX* (Nuclear factor I/X) [MIM 164005], iv) le syndrome de Proteus [MIM 176920], dû à des mutations du *AKT1* (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) [MIM 164730], v) le syndrome de Marfan [MIM 154700], dû à des mutations du gène *FBNI* [MIM 134797] (fibrillin1). L'hétérogénéité génétique caractérisant ces atteintes rend difficile l'établissement d'une classification moléculaire claire de ces entités.

Le progrès des techniques de biologie moléculaire a permis l'identification d'un nombre important de gènes responsables de formes syndromiques d'avances staturales. Cependant, la base moléculaire de certaines entités reste, à ce jour, mal établie. Mégarbané et ses collaborateurs (Mégarbané et al., 2012) ont récemment décrit un syndrome

caractérisé par une avance staturale et une dysmorphie faciale, dans une famille libanaise consanguine (famille D). Par une stratégie couplant l'approche de cartographie par homozygotie au séquençage de l'exome, nous avons identifié une mutation non-sens dans la séquence du gène *METTL21D* chez les malades de la famille D. L'identification de mutations de *METTL21D* comme responsables d'une dysplasie osseuse, permet d'attribuer à ce gène un rôle important dans le contrôle de l'ossification endochondrale.

*METTL21D* (Homo sapiens Methyltransferase Like 21D), gène à 6 exons, code pour une protéine appartenant à la famille des lysines méthyltransférases.

Les méthyltransférases constituent un groupe d'enzymes catalysant le transfert d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) d'un donneur (en général le SAM : S-adénosylméthionine) vers différents types d'accepteurs (ADN, ARN, protéines, lipides et petits métabolites). La variabilité des substrats ciblés attribue à ces enzymes des fonctions diverses dans différents processus biologiques (Petrossian and Clarke, 2011). Outre leur rôle essentiel dans la régulation épigénétique de certains gènes (Jones and Takai, 2001), les méthyltransférases sont impliquées dans la biosynthèse des lipides, dans le contrôle de la différenciation tissulaire (Yadav et al., 2008) et dans la modification post-traductionnelle des protéines, elle-même responsable du contrôle de la localisation cellulaire, du renouvellement, de l'interaction moléculaire et de l'activité de ces dernières (Cloutier et al., 2013). Les protéines méthyltransférases ciblent essentiellement les groupements amines des chaînes latérales des résidus lysine et arginine, et plus rarement ceux de l'histidine, de la glutamine et de l'asparagine. On distingue trois principales superfamilles selon la structure de ces enzymes : i) la classe I, constituée essentiellement des protéines arginine méthyltransférases (PRMT) et caractérisée par une structure en 7 feuillets β, ii) la superfamille des protéines contenant le domaine SET et constituée de la majorité des protéines lysines (K) méthyltransférases (PKMT) et iii) la superfamille des protéines contenant un domaine SOUT et impliquées dans la méthylation de l'ARN. Parmi les PKMT, quelques méthyltransférases présentent une homologie de structure avec les PRMT et forment le « groupe J » qui fait partie de la classe I (Petrossian and Clarke, 2011). Cloutier et ses collaborateurs (Cloutier et al., 2013) ont montré que ce groupe de méthyltransférases interagit préférentiellement avec des molécules chaperonnes pour en modifier la fonction. Ainsi, *METTL21D* (ou VCP-KMT) faisant partie du « groupe J », est une enzyme qui catalyse la triméthylation du résidu Lysine 315 de la chaperonne VCP (Valosin-containing protein)

(Kernstock et al., 2012). Cette dernière est un membre de la superfamille AAA-ATPase (pour ATPase associated with various cellular activities), constituée de deux domaines ATPasiques (D1 et D2), d'un domaine « CDC48 » de liaison au cofacteur et aux queues polyubiquitinilées, de deux séquences de liaison ou « linkers » (N-D1 linker et D1-D2 linker) et d'un domaine C-terminal (Zhang et al., 2000). Modulée par ASPSCR1/UBXD9, la méthylation de la VCP par METTL21D entraîne une diminution significative de l'activité du premier domaine ATPasique D1 de cette chaperonne (Cloutier et al., 2013). Certaines mutations de VCP sont responsables d'ALS14 (Amyotrophic Lateral Sclerosis type 14 with or without frontotemporal dementia) [MIM 613954]. D'autres causent le syndrome sévère IBMPFD (Inclusion Body Myopathy associated with Paget disease of bone and Frontotemporal Dementia) [MIM 167320] associant une myopathie à corps d'inclusion à la maladie de Paget et/ou à une démence frontotemporale (Watts et al., 2004). Du point de vue biochimique, les VCP des patients atteints d'IBMPFD possèdent une activité ATPasique et une affinité de liaison au cofacteur et aux protéines ubiquitinées, plus importantes que celle des VCP des sujets contrôles (Kakizuka, 2008). VCP est impliquée dans divers processus biologiques dont la régulation du cycle cellulaire, l'assemblage des peroxysomes et l'autophagie. Elle est également un constituant essentiel de la machinerie de dégradation des protéines ubiquitinées, par le mécanisme ERAD (Endoplasmic Reticulum-associated protein degradation) (Yamanaka et al., 2012). La déficience des cellules en METTL21D n'a aucun effet sur la dégradation par la VCP des protéines ubiquitinées, ni sur l'autophagie de ces cellules. Cependant, les cellules déficientes en METTL21D, sont caractérisées par une vitesse de croissance deux fois plus que la vitesse normale et une capacité de migration beaucoup plus importante que celle des cellules normales (Kernstock et al., 2012). On assume que METTL21D régule la croissance et la migration cellulaire en modulant l'activité de la chaperonne VCP. D'un autre côté, l'hypothèse de l'existence d'autres substrats de cette méthyltransférase ne peut pas être tranchée. Dans ce contexte, Kernstock et ses collaborateurs (Kernstock et al., 2012) ont montré que H2B, l'histone la plus riche en résidus lysine, peut être méthylée par METTL21D. Ce rôle d'histones méthyltransférases, attribué à METTL21D et rappelant celui de NSD1 et de EZH2, pourrait être également impliqué dans la physiopathologie du syndrome osseux de la famille D. En effet, *NSD1* et *EZH2*, gènes responsables des syndromes de Sotos et de Weaver respectivement, codent pour des protéines ayant des fonctions histones méthyltransférases, régulatrices de l'expression de certains gènes au cours du développement. La

comparaison du profil d'expression des gènes impliqués dans l'ossification endochondrale des différents patients atteints de ces formes d'avances staturales pourrait contribuer à l'élucidation du mécanisme physiopathologique des avances staturales.

Le taux d'expression de *METTL21D*, par les cellules sanguines des patients et celles de leurs parents et des contrôles ne montre aucune différence significative. A la lumière de ce résultat, nous pouvons donc exclure uniquement dans les cellules testées exclure la possibilité que le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (NMD) a eu lieu. Dans ce cas, deux hypothèses se présentent : la première suggère que le phénotype des patients est dû à la fonction altérée de la protéine METTL21D tronquée, et non à son instabilité à cause du mécanisme de contrôle de qualité des ARNm cellulaires. La deuxième hypothèse stipule que le NMD a lieu au niveau des cellules spécifiques du tissu osseux, où METTL21D est impliquée.

## 4. Famille E

Décrit pour la première fois par Meinhard Robinow et ses collaborateurs en 1969, le syndrome de Robinow (RS) est une ostéochondroplasie héréditaire rare caractérisée par une petite taille, un raccourcissement mésomélique ou acromésomélique des membres, des anomalies vertébrales et une hypoplasie des organes génitaux. Les patients présentent également un faciès typique d'apparence fœtale, défini par une macrocéphalie, un front bombant, un hypertélorisme, une hypoplasie mésofaciale, un nez court avec des narines antéversées, une fente labiale et palatine, une large bouche triangulaire, une micrognathie et des dents chevauchantes (Robinow et al., 1969). Des anomalies rénales (Wiens et al., 1990) et des atteintes cardiaques (Al-Ata et al., 1998; Webber et al., 1990) peuvent être associées au RS. Récemment, une hyperostose de l'os temporal, entraînant une surdité de transmission bilatérale, a été décrite chez un cas atteint de ce syndrome (Eijkenboom et al., 2012).

On distingue deux formes du RS : une forme atténuée autosomique dominante (ADRS, [MIM 180700]) associée dans moins de 10% des cas à des mutations du gène *WNT5A* [MIM 164975] (Person et al., 2010), et une forme plus sévère autosomique récessive (ARRS, [MIM 268310]), due à des mutations de perte de fonction du gène *ROR2* [MIM 602337] (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000). Certains signes cliniques sont communs aux deux types de RS, d'autres sont plus fréquemment observés dans l'une ou l'autre forme (Mazzeu et al., 2007). La fusion costale, par exemple, est un critère exclusif évoquant la forme récessive du syndrome (Bain et al., 1986).

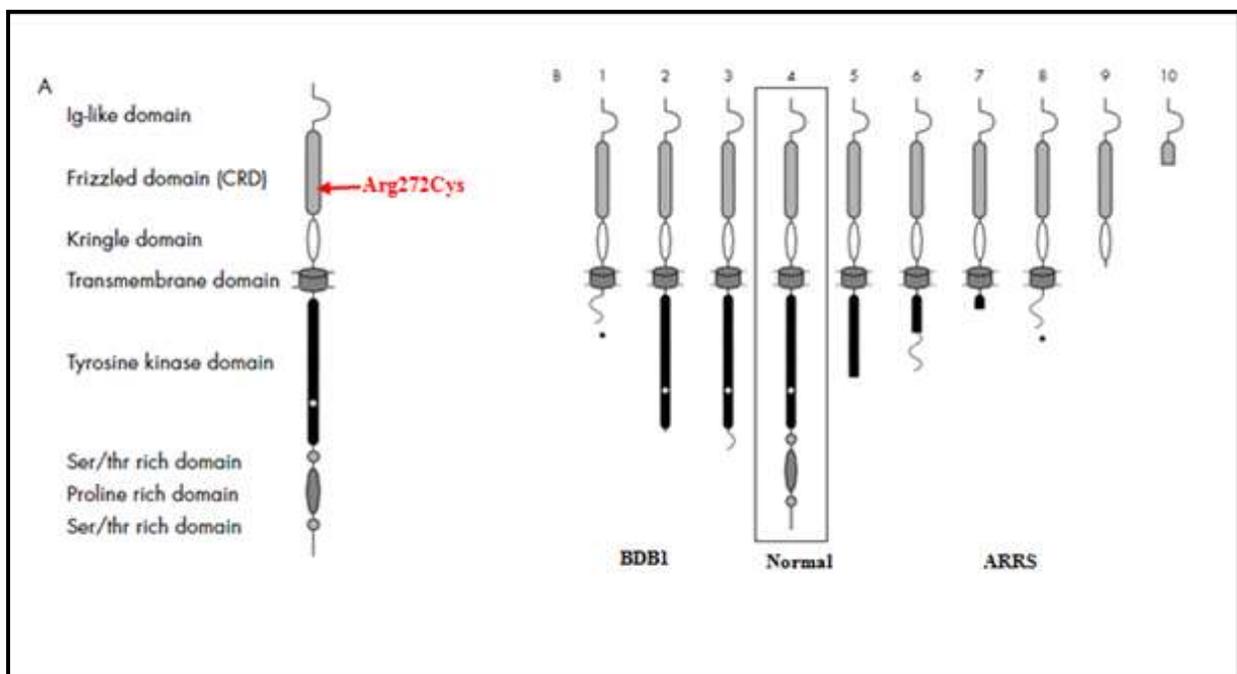
Les patientes EP1 et EP2 présentent une petite taille, un raccourcissement mésomélique des membres, une dislocation radio-ulnaire et un faciès typique d'apparence fœtale; signes évoquant le RS. Il s'agit, plus particulièrement de la forme autosomique récessive de ce syndrome. Contrairement à la majorité des cas d'ARRS décrits, les anomalies vertébrales de ces patientes sont modérées et leurs côtes ne sont pas fusionnées.

Le séquençage de *ROR2* chez EP1 et EP2 a permis d'identifier une nouvelle mutation : c.814C>T; p.Arg272Cys. *ROR2*, gène à 9 exons et localisé en 9q22.31, code pour une protéine appartenant à la famille de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. Ce récepteur joue

un rôle crucial dans les processus du développement embryonnaire du cœur et des systèmes nerveux et squelettique (DeChiara et al., 2000; Oishi et al., 1999; Takeuchi et al., 2000).

ARRS est allélique à la brachydactylie de type B1, maladie autosomique dominante associée à des mutations de gain de fonction de *ROR2* (Afzal et al., 2000; Oldridge et al., 2000). Les mutations engendrant ARRS sont divisées en deux groupes : le premier rassemble celles qui altèrent la liaison du récepteur à son/ses ligand(s), alors que le deuxième regroupe les mutations non-sens générant des protéines tronquées.

ROR2 est constitué de plusieurs domaines intra- et extra- cellulaires (Figure 41).



**Figure 41: Le récepteur ROR2. (A) L'organisation structurale de ce récepteur et la localisation de la mutation p.Arg272Cys au niveau du domaine CRD de ROR2. (B) Schéma comparatif établissant un lien entre les différentes localisations des mutations non-sens et le phénotype osseux engendré. BDB1 : Brachydactylie de type 1. ARRS : Autosomal Recessive Robinow Syndrome.**

La mutation p.Arg272Cys est localisée dans le domaine extracellulaire « CRD » (Cysteine rich domain) du ROR2. Les substitutions d'aa dans ce domaine causent le pliage anormal des protéines, engendrant ainsi leur rétention dans le réticulum endoplasmique et leur dégradation par le mécanisme ERAD (Ali et al., 2007). Les patients portant des mutations du CRD semblent présenter des signes cliniques modérés (Tableau 11) (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000; Mehawej et al., 2012; Tufan et al., 2005). On estime qu'à ce niveau, le

changement d'un résidu d'aa entraîne une légère modification de la structure secondaire de la protéine et donc une rétention incomplète de cette dernière, expliquant la perte de fonction partielle de ROR2.

Les malformations des membres observées dans l'ARRS semblent résulter d'un dysfonctionnement de la voie de signalisation Wnt (Minami et al., 2010; Oishi et al., 2003). En effet, la grande similitude entre le domaine CRD du ROR2 et le domaine de liaison des récepteurs de type « Frizzled » aux ligands Wnt, suggère une implication de ROR2 dans la voie de signalisation WNT (Saldanha et al., 1998). Deux sous-familles de protéines Wnt sont distinguées; la première est celle de Wnt1 (dont Wnt1, Wnt3a et Wnt8) activant la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine (voie canonique) pour réguler la prolifération, la différenciation et la spécification cellulaire, alors que la deuxième est celle de Wnt5a (dont Wnt5a et Wnt11) activant des voies de signalisation non-canoniques dont la voie « Planar Cell Polarity » (PCP) et la voie WNT/ $Ca^{2+}$ . La ressemblance entre les phénotypes des souris knock-out *Ror2*<sup>-/-</sup> et *Wnt5a*<sup>-/-</sup> a permis d'établir l'hypothèse d'une éventuelle interaction physique et fonctionnelle entre ces deux protéines, qui a été confirmée par des dosages par liaison spécifique *in vitro* (Green et al., 2008). Le récepteur ROR2 fixant le ligand WNT5A est capable d'activer une voie de signalisation Wnt non canonique qui est celle de la Jun N-terminal Kinase (WNT5A/JNK) (Oishi et al., 2003). Les anomalies associées au RS sont donc probablement dues à une altération de cette voie. Cependant, les malformations observées aux niveaux des mains des patients atteints du RS (Balci et al., 1993; Al Kaissi et al., 2007; Sabry et al., 1997; Tufan et al., 2005) sont remarquablement différentes de l'adactylie observée chez les souris *Wnt5a*<sup>-/-</sup> (Oberg, 2011). La polydactylie mésoaxiale combinée à une syndactylie des 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> doigts observée chez la patiente EP2 (Mehawej et al., 2012) en est un exemple. Ces observations laissent suggérer l'hypothèse d'une implication inconnue à ce jour de ROR2 dans des voies de signalisation Wnt non canoniques. Dans ce cadre, il a été montré que ROR2 induit la voie de signalisation non-canonique de Wnt11 (Minami et al., 2010) qui est responsable de l'induction de la maturation des ostéoblastes et de la minéralisation de la matrice osseuse (Friedman et al., 2009).

Enfin, la compréhension des voies de signalisations spécifiques en aval du ROR2 et l'établissement de corrélations génotype-phénotype, permettraient une orientation du pronostic et une prise en charge adéquate des patients.

## **VI- Conclusion et Discussion Générale**

«Un voyage de mille lieues commence par un premier pas »

Tao Te King

Afin d'identifier les gènes impliqués dans des dysplasies osseuses autosomiques récessives dans des familles libanaises consanguines, deux stratégies ont été adoptées. La première a été l'intersection des variations détectées par le séquençage des exomes de deux sujets non apparentés atteints d'une même dysplasie osseuse tandis que la deuxième a consisté en un couplage entre l'approche de cartographie par homozygotie et le séquençage de l'exome d'un patient par famille.

Notre travail a permis d'identifier le gène *MAGMAS* comme étant impliqué dans la dysplasie spondylo-métaphysaire létale des deux familles libanaises consanguines et non apparentées. *MAGMAS*, connu également sous le nom de *PAM16*, code pour une protéine mitochondriale qui joue un rôle crucial dans la régulation de l'import des pré-protéines vers la matrice mitochondriale. Nous avons confirmé la pathogénicité de la mutation identifiée chez les patients des familles A et B, et validé l'effet essentiel de *MAGMAS* sur la viabilité des cellules. Nous avons également démontré que ce gène est exprimé au niveau de l'os trabéculaire et des chondrocytes hypertrophiques, à différents stades de développement. L'implication de *MAGMAS* dans la dysplasie osseuse des familles A et B et son expression au niveau de la plaque de croissance, nous ont permis d'attribuer à cette protéine un rôle physiologique important dans l'ossification endochondrale.

La stratégie couplant le séquençage de l'exome à la cartographie par homozygotie, nous a permis d'identifier les bases moléculaires des dysplasies osseuses des deux familles C et D. *NWD1* est impliqué dans la dysplasie rhizomélique de la famille C. *NWD1* appartient à la grande famille des protéines ayant des domaines WD répétés qui lui confèrent un éventuel rôle dans divers mécanismes comme la transduction de signal, la régulation de la transcription, le transport vésiculaire et le contrôle du cycle cellulaire.

Le gène *METTL21D* est responsable de l'avance staturale syndromique dans la famille D. *METTL21D* est une lysine méthyltransférase qui catalyse la triméthylation de la chaperonne VCP. On suppose que *METTL21D* régule la croissance et la migration cellulaire en modulant l'activité de la chaperonne VCP. La protéine *METTL21D* pourrait être également impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes intervenant dans l'ossification endochondrale, par la méthylation de protéines histoniques.

Enfin, l'étude moléculaire par séquençage direct du gène *ROR2* codant pour un récepteur orphelin de la tyrosine kinase et responsable du syndrome de Robinow nous a permis d'identifier une nouvelle mutation dans la famille E qui présente une atteinte modérée de ce syndrome.

Nos résultats témoignent encore une fois du succès de l'exome dans l'identification de gènes responsables de maladies monogéniques et prouvent l'efficacité des deux stratégies que nous avons adoptées dans l'étude des maladies autosomique récessives. Le choix de l'une ou l'autre voie dépend surtout de la disponibilité de sujets atteints (apparentés ou non) et de la faisabilité d'une étude de liaison par homozygotie (cas des familles consanguines avec plusieurs sujets atteints).

Malgré son succès, le séquençage de l'exome connaît quelques contraintes qui peuvent être liées soit à la technique utilisée, soit à l'analyse des données générées (Bamshad et al., 2011; Ku et al., 2012; Singleton, 2011).

Parmi les limites de cette technique, on cite surtout celles liées à la capture des régions ciblées et à la couverture de ces dernières par le séquençage à haut débit. En effet :

- Le séquençage de l'exome cible essentiellement les exons des gènes connus. Les régions codantes non encore identifiées ne sont pas couvertes par cette technique.
- Les réarrangements, les CNVs et les variations non codantes telles que les variations au niveau des promoteurs ou des régions régulatrices, ne sont pas détectées par le séquençage de l'exome.
- Quelques régions codantes ne sont pas complètement capturées par l'exome. La qualité de la capture dépend de plusieurs facteurs dont la plateforme utilisée, la qualité de l'ADN du sujet séquencé et la richesse en bases GC de la séquence ciblée.
- Les séquences capturées ne sont pas toutes séquencées avec la même profondeur. De plus, leur alignement à la séquence référence n'est pas efficace à 100%. A partir de là, une variation qui n'est pas suffisamment couverte risque de passer inaperçue (cas des faux négatifs). On estime que le seuil minimal de couverture suffisant pour détecter les variations hétérozygotes soit de 15X.

- Un mésappariement lors de l'alignement des séquences peut générer des faux positifs qui sont des variations détectées par l'exome mais absentes dans le génome du sujet. Les faux positifs sont surtout dus aux régions dupliquées et aux pseudogènes.

Quant aux difficultés liées à l'analyse, elles sont représentées essentiellement par :

- L'interprétation erronée des résultats, surtout dans le cas des maladies présentant une hétérogénéité génétique ou dans le cas des maladies à faible pénétrance.
- Les erreurs de filtrage des variations. Ainsi, dans le cas des maladies récessives, certaines variations, présentes à l'état hétérozygotes chez des individus porteurs sains, sont considérés par certaines bases de données comme étant des polymorphismes, et sont donc éliminés lors de l'analyse. (Bamshad et al., 2011; Ku et al., 2012; Singleton, 2011).

En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier trois gènes responsables de dysplasies osseuses autosomiques récessives dans quatre familles libanaises. La diversité de la fonction de ces gènes confirme l'hétérogénéité de la grande famille des dysplasies osseuses.

L'établissement des mécanismes physiopathologiques de nouvelles entités de dysplasies osseuses permettrait une meilleure compréhension du processus physiologique complexe d'ossification endochondrale.

Dans un avenir plus lointain, l'identification des bases moléculaires de certaines maladies rares pourrait contribuer à la mise en place de nouvelles perspectives thérapeutiques adoptées au traitement des maladies plus fréquentes. Par exemple, l'identification du gène *TBX4* dans le syndrome de Ghosal qui est caractérisé par une ostéopétrose (Geneviève et al., 2008), et l'élucidation du mécanisme physiopathologique derrière ce syndrome, ont ouvert une nouvelle perspective pour le traitement de l'ostéoporose qui représente une atteinte osseuse très fréquente.

## Références

Abad, V., Meyers, J.L., Weise, M., Gafni, R.I., Barnes, K.M., Nilsson, O., Bacher, J.D., and Baron, J. (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* *143*, 1851–1857.

Afzal, A.R., Rajab, A., Fenske, C.D., Oldridge, M., Elanko, N., Ternes-Pereira, E., Tüysüz, B., Murday, V.A., Patton, M.A., Wilkie, A.O., et al. (2000). Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat. Genet.* *25*, 419–422.

Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Pagel, C.N., Davies, H.M.S., Mirams, M., and Mackie, E.J. (2007). Physiological death of hypertrophic chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *15*, 575–586.

Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J.F., Schedl, A., and de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* *16*, 2813–2828.

Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., et al. (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* *18*, 1072–1087.

Ali, B.R., Jeffery, S., Patel, N., Tinworth, L.E., Meguid, N., Patton, M.A., and Afzal, A.R. (2007). Novel Robinow syndrome causing mutations in the proximal region of the frizzled-like domain of ROR2 are retained in the endoplasmic reticulum. *Hum. Genet.* *122*, 389–395.

Alman, B.A. (2008). Skeletal dysplasias and the growth plate. *Clin. Genet.* *73*, 24–30.

Alvarez, J., Sohn, P., Zeng, X., Doetschman, T., Robbins, D.J., and Serra, R. (2002). TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 1913–1924.

- Al-Ata, J., Paquet, M., and Teebi, A.S. (1998). Congenital heart disease in Robinow syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 77, 332–333.
- Al-Awadi, S.A., Moussa, M.A., Naguib, K.K., Farag, T.I., Teebi, A.S., el-Khalifa, M., and el-Dossary, L. (1985). Consanguinity among the Kuwaiti population. *Clin. Genet.* 27, 483–486.
- Bain, M.D., Winter, R.M., and Burn, J. (1986). Robinow syndrome without mesomelic “brachymelia”: a report of five cases. *J. Med. Genet.* 23, 350–354.
- Balci, S., Erçal, M.D., Say, B., and Atasü, M. (1993). Robinow syndrome: with special emphasis on dermatoglyphics and hand malformations (split hand). *Clin. Dysmorphol.* 2, 199–207.
- Ballock, R.T., and O’Keefe, R.J. (2003). The biology of the growth plate. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A, 715–726.
- Ballock, R.T., Heydemann, A., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1993). TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev. Biol.* 158, 414–429.
- Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A., and Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* 12, 745–755.
- Barbour, B., and Salameh, P. (2009). Consanguinity in Lebanon: prevalence, distribution and determinants. *J. Biosoc. Sci.* 41, 505–517.
- Bateson, W. (1902). *Mendel’s law* (Cambridge).
- Becker, S., Gehrsitz, A., Bork, P., Buchner, S., and Buchner, E. (2001). The black-pearl gene of *Drosophila* defines a novel conserved protein family and is required for larval growth and survival. *Gene* 262, 15–22.

- Bemiss, S.M. (1858). Report on influence of marriages of consanguinity upon off-spring. *Trans Am Med Assn* *11*, 319–425.
- Bener, A., and Alali, K.A. (2006). Consanguineous marriage in a newly developed country: the Qatari population. *J. Biosoc. Sci.* *38*, 239–246.
- Bener, A., Hussain, R., and Teebi, A.S. (2007). Consanguineous marriages and their effects on common adult diseases: studies from an endogamous population. *Med. Princ. Pr. Int. J. Kuwait Univ. Heal. Sci. Cent.* *16*, 262–267.
- Bilgüvar, K., Oztürk, A.K., Louvi, A., Kwan, K.Y., Choi, M., Tatli, B., Yalnizoğlu, D., Tüysüz, B., Çağlayan, A.O., Gökben, S., et al. (2010). Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature* *467*, 207–210.
- Bittles, A. (2001). Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin. Genet.* *60*, 89–98.
- Bittles, A.H. (2003). The bases of western attitudes to consanguineous marriage. *Dev. Med. Child Neurol.* *45*, 135–138.
- Bittles, A.H. (2005). Endogamy, consanguinity and community disease profiles. *Community Genet.* *8*, 17–20.
- Bittles, A.H. (2011). Time to get real: investigating potential beneficial genetic aspects of consanguinity. *Public Heal. Genomics* *14*, 169–171; discussion 172.
- Van Bokhoven, H., Celli, J., Kayserili, H., van Beusekom, E., Balci, S., Brussel, W., Skovby, F., Kerr, B., Percin, E.F., Akarsu, N., et al. (2000). Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat. Genet.* *25*, 423–426.

- Bonafé, L., Schmitt, K., Eich, G., Giedion, A., and Superti-Furga, A. (2002). RMRP gene sequence analysis confirms a cartilage-hair hypoplasia variant with only skeletal manifestations and reveals a high density of single-nucleotide polymorphisms. *Clin. Genet.* *61*, 146–151.
- Bonaiti, C. (1978). Genetic counseling of consanguineous families. Use of Smith's method to calculate recurrence risks in multifactorial inheritance in consanguineous matings. *J. Med. Genet.* *15*, 109–112.
- Bonaventure, J., and Silve, C. (2005). [Hereditary skeletal dysplasias and FGFR3 and PTHR1 signaling pathways]. *Médecine Sci. MS* *21*, 954–961.
- Botstein, D., and Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* *33 Suppl*, 228–237.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* *32*, 314–331.
- De Braekeleer, M. Les effets de la consanguinité sur la mortalité infantile: une approche épidémiologique.
- Brooks, C. (1856). *Laws of reproduction, with reference to intermarriage of near blood-relations.* (Cambridge: Metcalf).
- Burdan, F., Szumiło, J., Korobowicz, A., Farooquee, R., Patel, S., Patel, A., Dave, A., Szumiło, M., Solecki, M., Klepacz, R., et al. (2009). Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* *47*, 5–16.
- Byers, P.D., and Brown, R.A. (2006). Cell columns in articular cartilage physes questioned: a review. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *14*, 3–12.
- Capdevila, J., and Izpisúa Belmonte, J.C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 87–132.

- Cavalli-Sforza, L.L., Kimura, M., and Barrai, I. (1966). The probability of consanguineous marriages. *Genetics* 54, 37–60.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628–644.
- Chapman, A.M., and Jacquard, A. (1971). Un isolat d'Amérique Centrale : Les indiens Jicaques du Honduras. *Génétique et Populations, Hommage à Jean Sutter*.
- Charafeddine, L., Ammous, F., Kobeissi, L., De Ver Dye, T., Matar, M., Faddous Khalife, M.-C., and Yunis, K. (2012). In- hospital Neonatal Mortality and the Role of Consanguinity. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 26, 398–407.
- Chelhod, J. (1965). Le mariage avec la cousine parallèle dans le système arabe. In *L'Homme*, pp. 113–173.
- Chen, R.H., Miettinen, P.J., Maruoka, E.M., Choy, L., and Derynck, R. (1995). A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor. *Nature* 377, 548–552.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 3 *Suppl* 3, S131–139.
- Cloutier, P., Lavallée-Adam, M., Faubert, D., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2013). A newly uncovered group of distantly related lysine methyltransferases preferentially interact with molecular chaperones to regulate their activity. *PLoS Genet.* 9, e1003210.
- Cohen, M.J. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 2646–2706.

- Cohen-Solal, M., and de Vernejoul, M.-C. (2003). Remodelage osseux: Physiological Basis of Bone Remodelling. *Thérapie* 58, 391–393.
- Cooper, G.M., and Shendure, J. (2011). Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat. Rev. Genet.* 12, 628–640.
- Cooper, D.N., Ball, E.V., and Krawczak, M. (1998). The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res.* 26, 285–287.
- D’Silva, P.R., Schilke, B., Walter, W., and Craig, E.A. (2005). Role of Pam16’s degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12419–12424.
- D’Silva, P.R., Schilke, B., Hayashi, M., and Craig, E.A. (2007). Interaction of the J-Protein Heterodimer Pam18/Pam16 of the Mitochondrial Import Motor with the Translocon of the Inner Membrane. *Mol. Biol. Cell* 19, 424–432.
- Davey, K.M., Parboosingh, J.S., McLeod, D.R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., Snyder, F.F., Bridge, P.J., and Bernier, F.P. (2006). Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *J. Med. Genet.* 43, 385–393.
- DeChiara, T.M., Kimble, R.B., Poueymirou, W.T., Rojas, J., Masiakowski, P., Valenzuela, D.M., and Yancopoulos, G.D. (2000). Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat. Genet.* 24, 271–274.
- Dentice, M., Bandyopadhyay, A., Gereben, B., Callebaut, I., Christoffolette, M.A., Kim, B.W., Nissim, S., Mornon, J.-P., Zavacki, A.M., Zeöld, A., et al. (2005). The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit

- WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nat. Cell Biol.* *7*, 698–705.
- Domingo-Sananes, M., Kapuy, O., Hunt, T., and Novak, B. (2011). Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *366*, 3584–3594.
- Eijkenboom, D.F., Verbist, B.M., Cremers, C.W., and Kunst, H.P. (2012). Bilateral conductive hearing impairment with hyperostosis of the temporal bone: a new finding in Robinow syndrome. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* *138*, 309–312.
- Elahi, E., Kumm, J., and Ronaghi, M. (2004). Global genetic analysis. *J. Biochem. Mol. Biol.* *37*, 11–27.
- Elsner, S., Simian, D., Iosefson, O., Marom, M., and Azem, A. (2009). The mitochondrial protein translocation motor: Structural conservation between the human and yeast Tim14/Pam18-Tim16/Pam16 co-chaperones. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 2041–2053.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E., and Derynck, R. (1995). Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* *80*, 371–378.
- Farquharson, C., and Jefferies, D. (2000). Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* *79*, 994–1004.
- Fleury, F. Systèmes de croisements non panmictiques-Cours de Génétique des Populations.
- Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., et al. (2004). Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 226–233.

- Frenz, D.A., Liu, W., Williams, J.D., Hatcher, V., Galinovic-Schwartz, V., Flanders, K.C., and Van de Water, T.R. (1994). Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 415–424.
- Friedman, M.S., Oyserman, S.M., and Hankenson, K.D. (2009). Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J. Biol. Chem.* *284*, 14117–14125.
- Garrod, A.E. (1996). The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. 1902. *Mol. Med.* *2*, 274–282.
- al-Gazali, L.I., Bener, A., Abdulrazzaq, Y.M., Micallef, R., al-Khayat, A.I., and Gaber, T. (1997). Consanguineous marriages in the United Arab Emirates. *J. Biosoc. Sci.* *29*, 491–497.
- Geneviève, D., Proulle, V., Isidor, B., Bellais, S., Serre, V., Djouadi, F., Picard, C., Vignon-Savoie, C., Bader-Meunier, B., Blanche, S., et al. (2008). Thromboxane synthase mutations in an increased bone density disorder (Ghosal syndrome). *Nat. Genet.* *40*, 284–286.
- George, J., Nagendran, J., and Azmi, K. (2012). Comparison study of growth plate fusion using MRI versus plain radiographs as used in age determination for exclusion of overaged football players. *Br. J. Sports Med.* *46*, 273–278.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* *5*, 623–628.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast Chichester Engl.* *11*, 355–360.

- Gilissen, C., Arts, H.H., Hoischen, A., Spruijt, L., Mans, D.A., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., van Reeuwijk, J., Kant, S.G., et al. (2010). Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sensenbrenner syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *87*, 418–423.
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H.G., and Veltman, J.A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *20*, 490–497.
- Glazov, E.A., Zankl, A., Donskoi, M., Kenna, T.J., Thomas, G.P., Clark, G.R., Duncan, E.L., and Brown, M.A. (2011). Whole-exome re-sequencing in a family quartet identifies POP1 mutations as the cause of a novel skeletal dysplasia. *PLoS Genet.* *7*, e1002027.
- Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., et al. (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat. Biotechnol.* *27*, 182–189.
- Le Goff, C., Mahaut, C., Wang, L.W., Allali, S., Abhyankar, A., Jensen, S., Zylberberg, L., Collod-Beroud, G., Bonnet, D., Alanay, Y., et al. (2011). Mutations in the TGF $\beta$  binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am. J. Hum. Genet.* *89*, 7–14.
- Le Goff, C., Mahaut, C., Abhyankar, A., Le Goff, W., Serre, V., Afenjar, A., Destrée, A., di Rocco, M., Héron, D., Jacquemont, S., et al. (2012). Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nat. Genet.* *44*, 85–88.
- Green, J.L., Kuntz, S.G., and Sternberg, P.W. (2008). Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol.* *18*, 536–544.
- Hall, C.M. (2002). International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am. J. Med. Genet.* *113*, 65–77.

- Hamamy, H., Jamhawi, L., Al-Darawsheh, J., and Ajlouni, K. (2005). Consanguineous marriages in Jordan: why is the rate changing with time? *Clin. Genet.* 67, 511–516.
- el-Hazmi, M.A., al-Swailem, A.R., Warsy, A.S., al-Swailem, A.M., Sulaimani, R., and al-Meshari, A.A. (1995). Consanguinity among the Saudi Arabian population. *J. Med. Genet.* 32, 623–626.
- Hedges, D.J., Hedges, D., Burges, D., Powell, E., Almonte, C., Huang, J., Young, S., Boese, B., Schmidt, M., Pericak-Vance, M.A., et al. (2009). Exome sequencing of a multigenerational human pedigree. *PLoS One* 4, e8232.
- Hijazi, Z., and Haider, M.Z. (2001). Influence of consanguinity and IgE receptor genotypes on clinical manifestations of asthma in Kuwaiti children. *J. Trop. Pediatr.* 47, 13–16.
- Hirai, T., Chagin, A.S., Kobayashi, T., Mackem, S., and Kronenberg, H.M. (2011). Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signaling is required for maintenance of the growth plate in postnatal life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 191–196.
- Huang, W., Chung, U.I., Kronenberg, H.M., and de Crombrughe, B. (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 160–165.
- Huber, C., Faqeih, E.A., Bartholdi, D., Bole-Feysot, C., Borochowitz, Z., Cavalcanti, D.P., Frigo, A., Nitschke, P., Roume, J., Santos, H.G., et al. (2013). Exome sequencing identifies INPPL1 mutations as a cause of opsismodysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 144–149.
- Iyama, K., Ninomiya, Y., Olsen, B.R., Linsenmayer, T.F., Trelstad, R.L., and Hayashi, M. (1991). Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification. *Anat. Rec.* 229, 462–472.

- Johnson, D.E., and Williams, L.T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* *60*, 1–41.
- Johnson, R.L., and Tabin, C.J. (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* *90*, 979–990.
- Jones, P.A., and Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* *293*, 1068–1070.
- Jubinsky, P.T., Messer, A., Bender, J., Morris, R.E., Ciruolo, G.M., Witte, D.P., Hawley, R.G., and Short, M.K. (2001). Identification and characterization of Magmas, a novel mitochondria-associated protein involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signal transduction. *Exp. Hematol.* *29*, 1392–1402.
- Jubinsky, P.T., Short, M.K., Mutema, G., and Witte, D.P. (2003). Developmental expression of Magmas in murine tissues and its co-expression with the GM-CSF receptor. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *51*, 585–596.
- Al Kaissi, A., Bieganski, T., Baranska, D., Chehida, F.B., Gharbi, H., Ghachem, M.B., Hendaoui, L., Safi, H., and Kozlowski, K. (2007). Robinow syndrome: report of two cases and review of the literature. *Australas. Radiol.* *51*, 83–86.
- Kakizuka, A. (2008). Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 105–108.
- Der Kaloustian, V.M., Naffah, J., and Loiselet, J. (1980). Genetic diseases in Lebanon. *Am. J. Med. Genet.* *7*, 187–203.
- Kanaan, R.A., and Kanaan, L.A. (2006). Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *12*, RA164–169.

- Karsenty, G. (2000). The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 11, 437–439.
- Karsenty, G. (2001). Central control of bone formation. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 31, 119–133.
- Karsenty, G., Kronenberg, H.M., and Settembre, C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 629–648.
- Kember, N.F., and Walker, K.V. (1971). Control of bone growth in rats. *Nature* 229, 428–429.
- Kernstock, S., Davydova, E., Jakobsson, M., Moen, A., Pettersen, S., Mælandsmo, G.M., Egge-Jacobsen, W., and Falnes, P.Ø. (2012). Lysine methylation of VCP by a member of a novel human protein methyltransferase family. *Nat. Commun.* 3, 1038.
- Khlat, M. (1988a). Consanguineous marriages in Beirut: time trends, spatial distribution. *Soc. Biol.* 35, 324–330.
- Khlat, M. (1988b). Consanguineous marriage and reproduction in Beirut, Lebanon. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 188–196.
- Khlat, M. (1989). Inbreeding effects on fetal growth in Beirut, Lebanon. *Am. J. Phys. Anthropol.* 80, 481–484.
- Khoury, S.A., and Massad, D. (1992). Consanguineous marriage in Jordan. *Am. J. Med. Genet.* 43, 769–775.
- Klat, M., and Khudr, A. (1986). Religious endogamy and consanguinity in marriage patterns in Beirut, Lebanon. *Soc. Biol.* 33, 138–145.
- Komori, T. (2002). Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J. Cell. Biochem.* 87, 1–8.

- Koziel, L., Kunath, M., Kelly, O.G., and Vortkamp, A. (2004). Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev. Cell* 6, 801–813.
- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336.
- Ku, C.-S., Cooper, D.N., Polychronakos, C., Naidoo, N., Wu, M., and Soong, R. (2012). Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann. Neurol.* 71, 5–14.
- Kuravi, K., Nagotu, S., Krikken, A.M., Sjollem, K., Deckers, M., Erdmann, R., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2006). Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 119, 3994–4001.
- Lander, E.S., and Botstein, D. (1987). Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236, 1567–1570.
- Langman, J. (1994). *Embryologie médicale: développement humain, normal et pathologique* (Paris; New York; Barcelone: Masson).
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., and Zeviani, M. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165.
- Leutenegger, A.-L., Prum, B., Génin, E., Verny, C., Lemainque, A., Clerget-Darpoux, F., and Thompson, E.A. (2003). Estimation of the inbreeding coefficient through use of genomic data. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 516–523.
- Li, D., and Roberts, R. (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 2085–2097.

- Linsenmayer, T.F., Chen, Q.A., Gibney, E., Gordon, M.K., Marchant, J.K., Mayne, R., and Schmid, T.M. (1991). Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Dev. Camb. Engl.* *111*, 191–196.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.
- Lu, Q., Wierzbicki, S., Krasilnikov, A.S., and Schmitt, M.E. (2010). Comparison of mitochondrial and nucleolar RNase MRP reveals identical RNA components with distinct enzymatic activities and protein components. *RNA New York N* *16*, 529–537.
- De Luca, F., and Baron, J. (1999). Control of Bone Growth by Fibroblast Growth Factors. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *10*, 61–65.
- Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S., and Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 46–62.
- Mackie, E.J., Tatarczuch, L., and Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J. Endocrinol.* *211*, 109–121.
- Marie, P.J. (1992). Physiologie du tissu osseux. *Immuno-Anal. Biol. Spécialisée* *7*, 17–24.
- Maroteaux, P. (1982). *Les maladies osseuses de l'enfant* (Paris: Flammarion médecine-sciences).
- Martini, F.H., Timmons, M.J., and Tallitsch, R.B. (2012). *Pearson - Human Anatomy, 7/E* (Benjamin Cummings).
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.

- Mazzeu, J.F., Pardono, E., Vianna-Morgante, A.M., Richieri-Costa, A., Ae Kim, C., Brunoni, D., Martelli, L., de Andrade, C.E., Colin, G., and Otto, P.A. (2007). Clinical characterization of autosomal dominant and recessive variants of Robinow syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* *143*, 320–325.
- Mc Kusick, V.A. (1978). *Mendelian Inheritance in Man* (Baltimore: Johns Hopkins Press).
- McKusick, V.A., and Scott, C.I. (1971). A nomenclature for constitutional disorders of bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* *53*, 978–986.
- Mégarbané, A., Dagher, R., and Melki, I. (2008). Sib pair with previously unreported skeletal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A.* *146A*, 2916–2919.
- Mégarbané, A., Hanna, N., Chouery, E., Jalkh, N., Mehawej, C., and Boileau, C. (2012). Marfanoid habitus, inguinal hernia, advanced bone age, and distinctive facial features: a new collagenopathy? *Am. J. Med. Genet. A.* *158A*, 1185–1189.
- Mégarbané, A., Mehawej, C., El Zahr, A., Haddad, S., and Cormier-Daire, V. (2013). A Second Family with Autosomal Recessive Spondylometaphyseal Dysplasia and Early Death. *Am. J. Med. Genet. A.* ID-130275R1 Subj. Peer Rev.
- Mehawej, C., Chouery, E., Maalouf, D., Baujat, G., Le Merrer, M., Cormier-Daire, V., and Mégarbané, A. (2012). Identification of a novel causative mutation in the ROR2 gene in a Lebanese family with a mild form of recessive Robinow syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* *55*, 103–108.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 31–46.
- Meyer, B.F. (2005). Strategies for the prevention of hereditary diseases in a highly consanguineous population. *Ann. Hum. Biol.* *32*, 174–179.

- Michot, C., Le Goff, C., Goldenberg, A., Abhyankar, A., Klein, C., Kinning, E., Guerrot, A.-M., Flahaut, P., Duncombe, A., Baujat, G., et al. (2012). Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 740–745.
- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M., and Aaronson, S.A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 246–250.
- Mill, P., Lockhart, P.J., Fitzpatrick, E., Mountford, H.S., Hall, E.A., Reijns, M.A., Keighren, M., Bahlo, M., Bromhead, C.J., Budd, P., et al. (2011). Human and mouse mutations in WDR35 cause short-rib polydactyly syndromes due to abnormal ciliogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* *88*, 508–515.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* *16*, 1215.
- Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., and Nishita, M. (2010). Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *239*, 1–15.
- Minina, E., Wenzel, H.M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A.P., and Vortkamp, A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 4523–4534.
- Mokhtar, M.M., and Abdel-Fattah, M.M. (2001). Consanguinity and advanced maternal age as risk factors for reproductive losses in Alexandria, Egypt. *Eur. J. Epidemiol.* *17*, 559–565.
- Morgan, T.H. (1911a). Random Segregation versus Coupling in Mendelian Inheritance. *Science* *34*, 384.
- Morgan, T.H. (1911b). Chromosomes and Associative Inheritance. *Science* *34*, 636–638.

Morton, N.E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7, 277–318.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.

Mundlos, S., and Olsen, B.R. (1997). Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11, 125–132.

Murakami, S., Kan, M., McKeehan, W.L., and de Crombrughe, B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1113–1118.

Mustapha, M. (1997). Étude éco-génétique des maladies héréditaires de la population du nord du Liban: effets de la consanguinité. Thèse de diplôme d'études approfondies. Université de Tunis II.

Neylon, O.M., Werther, G.A., and Sabin, M.A. (2012). Overgrowth syndromes. *Curr. Opin. Pediatr.* 24, 505–511.

Ng, P.C., Levy, S., Huang, J., Stockwell, T.B., Walenz, B.P., Li, K., Axelrod, N., Busam, D.A., Strausberg, R.L., and Venter, J.C. (2008). Genetic Variation in an Individual Human Exome. *PLoS Genet.* 4, e1000160.

Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A., et al. (2010a). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.* 42, 30–35.

- Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., Hannibal, M.C., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., Beck, A.E., Tabor, H.K., Cooper, G.M., Mefford, H.C., et al. (2010b). Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* *42*, 790–793.
- Oberg, K.C. (2011). Re: MM Al-Qattan. Wnt pathways and upper limb anomalies. *J Hand Surg Eur.* 2011, 36: 9-22. *J. Hand Surg. Eur.* Vol. 36, 434; author reply 434.
- Oishi, I., Takeuchi, S., Hashimoto, R., Nagabukuro, A., Ueda, T., Liu, Z.J., Hatta, T., Akira, S., Matsuda, Y., Yamamura, H., et al. (1999). Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *4*, 41–56.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., et al. (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *8*, 645–654.
- Oldridge, M., Fortuna, A.M., Maringa, M., Propping, P., Mansour, S., Pollitt, C., DeChiara, T.M., Kimble, R.B., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., et al. (2000). Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat. Genet.* *24*, 275–278.
- Olsen, B.R., Reginato, A.M., and Wang, W. (2000). Bone development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 191–220.
- Olsson, N., Piek, E., Sundström, M., ten Dijke, P., and Nilsson, G. (2001). Transforming growth factor-beta-mediated mast cell migration depends on mitogen-activated protein kinase activity. *Cell. Signal.* *13*, 483–490.
- Orioli, I.M., Castilla, E.E., and Barbosa-Neto, J.G. (1986). The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J. Med. Genet.* *23*, 328–332.

- Ornitz, D.M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 22, 108–112.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3005.
- Ornitz, D.M., and Marie, P.J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16, 1446–1465.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M.T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D., and Lonai, P. (1993). Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev. Biol.* 158, 475–486.
- Othman, H., and Saadat, M. (2009). Prevalence of consanguineous marriages in Syria. *J. Biosoc. Sci.* 41, 685–692.
- Pacifici, M., Golden, E.B., Oshima, O., Shapiro, I.M., Leboy, P.S., and Adams, S.L. (1990). Hypertrophic chondrocytes. The terminal stage of differentiation in the chondrogenic cell lineage? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 599, 45–57.
- Paquet (2011). *Histologie - Le tissu osseux.*
- Peng, J., Huang, C.-H., Short, M.K., and Jubinsky, P.T. (2005). Magma gene structure and evolution. *In Silico Biol.* 5, 251–263.
- Person, A.D., Beiraghi, S., Sieben, C.M., Hermanson, S., Neumann, A.N., Robu, M.E., Schleiffarth, J.R., Billington, C.J., van Bokhoven, H., Hoogetboom, J.M., et al. (2010). WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 327–337.
- Petrossian, T.C., and Clarke, S.G. (2011). Uncovering the human methyltransferasome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M110.000976.

- Pfanner, N., and Chacinska, A. (2002). The mitochondrial import machinery: preprotein-conducting channels with binding sites for presequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 15–24.
- Piróg, K.A., and Briggs, M.D. (2010). Skeletal dysplasias associated with mild myopathy-a clinical and molecular review. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 686457.
- Poitras, E., and Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotechnol* 2, 2–11.
- Rabbani, B., Mahdiah, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H., and Inoue, I. (2012). Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J. Hum. Genet.* 57, 621–632.
- Ramachandran, A., Ravindran, S., and George, A. (2012). Localization of transforming growth factor beta receptor II interacting protein-1 in bone and teeth: implications in matrix mineralization. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60, 323–337.
- Ramé, A., and Théron, S. (2006). *Anatomie et physiologie* (Elsevier Masson).
- Rapraeger, A.C. (1995). In the clutches of proteoglycans: how does heparan sulfate regulate FGF binding? *Chem. Biol.* 2, 645–649.
- Rapraeger, A.C., Krufka, A., and Olwin, B.B. (1991). Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252, 1705–1708.
- Reynolds, V. (1988). Religious rules, mating patterns and fertility. *Human Mating Patterns*.
- Ridanpää, M., van Eenennaam, H., Pelin, K., Chadwick, R., Johnson, C., Yuan, B., vanVenrooij, W., Pruijn, G., Salmela, R., Rockas, S., et al. (2001). Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell* 104, 195–203.

- Rimoin, D.L., Cohn, D., Krakow, D., Wilcox, W., Lachman, R.S., and Alanay, Y. (2007). The skeletal dysplasias: clinical-molecular correlations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1117*, 302–309.
- Robinow, M., Silverman, F.N., and Smith, H.D. (1969). A newly recognized dwarfing syndrome. *Am. J. Dis. Child.* *117*, 645–651.
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., and Hidaka, N. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* *245*, 1059–1065.
- Roy, S., Short, M.K., Stanley, E.R., and Jubinsky, P.T. (2012). Essential role of *Drosophila* black-pearl is mediated by its effects on mitochondrial respiration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 3822–3833.
- Sabry, M.A., Ismail, E.A., al-Naggar, R.L., al-Torki, N.A., Farah, S., al-Awadi, S.A., Obenbergerova, D., and Bastaki, L. (1997). Unusual traits associated with Robinow syndrome. *J. Med. Genet.* *34*, 736–740.
- Saggar, A.K., and Bittles, A.H. (2008). Consanguinity and child health. *Paediatrics and Child Health* *18*.
- Saldanha, J., Singh, J., and Mahadevan, D. (1998). Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *7*, 1632–1635.
- Schatz, G., and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* *271*, 1519–1526.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3091–3092.

- Serra, R., Karaplis, A., and Sohn, P. (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J. Cell Biol.* *145*, 783–794.
- Settembre, C., Artega-Solis, E., McKee, M.D., de Pablo, R., Al Awqati, Q., Ballabio, A., and Karsenty, G. (2008). Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev.* *22*, 2645–2650.
- Shah, G.H., Toney, M.B., and Pitcher, B.L. (1998). Consanguinity and child mortality: The risk faced by families. In *Population Research and Policy Review*, (Kluwer Academic Publishers.), pp. 275–283.
- Shawky, R.M., Elsayed, S.M., Zaki, M.E., Nour El-Din, S.M., and Kamal, F.M. (2013). Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* *14*, 157–164.
- Short, M.K., Hallett, J.P., Tar, K., Dange, T., Schmidt, M., Moir, R., Willis, I.M., and Jubinsky, P.T. (2012). The yeast magmas ortholog pam16 has an essential function in fermentative growth that involves sphingolipid metabolism. *PloS One* *7*, e39428.
- Sikorski, R.S., and Boeke, J.D. (1991). In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.* *194*, 302–318.
- Singleton, A.B. (2011). Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol.* *10*, 942–946.
- Sinha, D., Joshi, N., Chittoor, B., Samji, P., and D’Silva, P. (2010). Role of Magmas in protein transport and human mitochondria biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1248–1262.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 181–185.

- Sparkes, R., Patton, D., and Bernier, F. (2007). Cardiac features of a novel autosomal recessive dilated cardiomyopathic syndrome due to defective importation of mitochondrial protein. *Cardiol. Young* 17, 215–217.
- Sponseller, P.D. (2001). *Lovell and Winter's pediatric orthopaedics*. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- Spranger, J. (1992). International classification of osteochondrodysplasias. The International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Eur. J. Pediatr.* 151, 407–415.
- Srinivas, V., and Shapiro, I.M. (2006). Chondrocytes embedded in the epiphyseal growth plates of long bones undergo autophagy prior to the induction of osteogenesis. *Autophagy* 2, 215–216.
- Srinivas, V., Bohensky, J., and Shapiro, I.M. (2009). Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs* 189, 88–92.
- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., and Cooper, D.N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum. Mutat.* 21, 577–581.
- Stern, C. (1943). The Hardy-Weinberg Law. *Science* 97, 137–138.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072–2086.
- Stoll, C., Dott, B., Roth, M.P., and Alembik, Y. (1989). Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin. Genet.* 35, 88–92.

- Sturtevant, A.H. (1913). A THIRD GROUP OF LINKED GENES IN *DROSOPHILA AMPELOPHILA*. *Science* 37, 990–992.
- Sueyoshi, S., and Ohtsuka, R. (2003). Effects of polygyny and consanguinity on high fertility in the rural Arab population in South Jordan. *J. Biosoc. Sci.* 35, 513–526.
- Sulonen, A.-M., Ellonen, P., Almusa, H., Lepistö, M., Eldfors, S., Hannula, S., Miettinen, T., Tynismaa, H., Salo, P., Heckman, C., et al. (2011). Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome Biol.* 12, R94.
- Superti-Furga, A., and Unger, S. (2007). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *Am. J. Med. Genet. A.* 143, 1–18.
- Superti-Furga, A., Bonafé, L., and Rimoin, D.L. (2001). Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am. J. Med. Genet.* 106, 282–293.
- Tabah, L., and Sutter, J. (1951). Effets des mariages consanguins sur la descendance. *Pop* 6, 59–82.
- Takeuchi, S., Takeda, K., Oishi, I., Nomi, M., Ikeya, M., Itoh, K., Tamura, S., Ueda, T., Hatta, T., Otani, H., et al. (2000). Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 5, 71–78.
- Talbi, J., Khadmaoui, A.E., Soulaymani, A.E.M., and Chafik, A.E.A. (2007). Etude de la consanguinité dans la population marocaine. Impact sur le profil de la santé. *I5*, 1–11.
- Teebi, A.S., and El-Shanti, H.I. (2006). Consanguinity: implications for practice, research, and policy. *Lancet* 367, 970–971.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983.

- Thiel, C.T., Mortier, G., Kaitila, I., Reis, A., and Rauch, A. (2007). Type and level of RMRP functional impairment predicts phenotype in the cartilage hair hypoplasia-anauxetic dysplasia spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 519–529.
- Thomas, T., Martin, A., and Lafage-Proust, M.-H. (2008). *Physiologie du tissu osseux*. EMC - Appar. Locomoteur *3*, 1–16.
- Thompson, E. A. (2007). 1953: An unrecognized summit in human genetic linkage analysis. *Stat. Surv.* *1*, 1–15.
- Tillion, G. (1966). *Le Harem et les cousins* (Paris: Éditions du Seuil).
- Tufan, F., Cefle, K., Türkmen, S., Türkmen, A., Zorba, U., Dursun, M., Oztürk, S., Palandüz, S., Eder, T., Mundlos, S., et al. (2005). Clinical and molecular characterization of two adults with autosomal recessive Robinow syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* *136*, 185–189.
- Varela, T.A., Aínsua, R.L., and Fariña, J. (2001). Evolution of consanguinity in the Bishopric of Lugo (Spain) from 1900 to 1979. *Ann. Hum. Biol.* *28*, 575–588.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* *273*, 613–622.
- Wagner, K., Mick, D.U., and Rehling, P. (2009). Protein transport machineries for precursor translocation across the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 52–59.
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., et al. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* *280*, 1077–1082.

- Warman, M.L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Lachman, R., LeMerrer, M., Mortier, G., Mundlos, S., Nishimura, G., Rimoin, D.L., et al. (2011). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am. J. Med. Genet. A. 155A*, 943–968.
- Watts, G.D.J., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., and Kimonis, V.E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet. 36*, 377–381.
- Webber, S.A., Wargowski, D.S., Chitayat, D., and Sandor, G.G. (1990). Congenital heart disease and Robinow syndrome: coincidence or an additional component of the syndrome? *Am. J. Med. Genet. 37*, 519–521.
- Weber, J.L., and May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet. 44*, 388–396.
- Westermann, B., and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast 16*, 1421–1427.
- Wiens, L., Strickland, D.K., Sniffen, B., and Warady, B.A. (1990). Robinow syndrome: report of two patients with cystic kidney disease. *Clin. Genet. 37*, 481–484.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science 285*, 901–906.
- Wright, S. (1922). Coefficient of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*.
- Wu, X., Shi, W., and Cao, X. (2007). Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci. 1116*, 29–49.

- Yadav, N., Cheng, D., Richard, S., Morel, M., Iyer, V.R., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. (2008). CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO Rep.* 9, 193–198.
- Yamanaka, K., Sasagawa, Y., and Ogura, T. (2012). Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 130–137.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., and Ornitz, D.M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841–848.
- Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K.-I., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., et al. (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* 18, 952–963.
- Young, M.F. (2003). Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 14 *Suppl* 3, S35–42.
- Yu, L., Gaitatzes, C., Neer, E., and Smith, T.F. (2000). Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 2470–2476.
- Zelzer, E., and Olsen, B.R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423, 343–348.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P.A., Newman, R.H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M.A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., et al. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol. Cell* 6, 1473–1484.
- (1970). International nomenclature of constitutional diseases of bones. *Ann. Radiol. (Paris)* 13, 455–464.
- (1978). International nomenclature of constitutional diseases of bone. Revision, May, 1977. *J. Pediatr.* 93, 614–616.

(1983). International Nomenclature of Constitutional Diseases of Bone. Revision, May, 1983. *Ann. Radiol. (Paris)* 26, 457–462.

(1998). International nomenclature and classification of the osteochondrodysplasias (1997). International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Am. J. Med. Genet.* 79, 376–382.

## **Annexe 1**

Mehawej, C., Courcet, J.-B., Baujat, G., Mouy, R., Gérard, M., Landru, I., Gosselin, M., Koehrer, P., Mousson, C., Breton, S., et al. (2013). The identification of MAFB mutations in eight patients with multicentric carpo-tarsal osteolysis supports genetic homogeneity but clinical variability. *Am. J. Med. Genet. A.* 9999:1–7.

## **Annexe 2**

Mégarbané, A., Dagher, R., and Melki, I. (2008). Sib pair with previously unreported skeletal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 2916–2919.

### **Annexe 3 (Article accepté)**

Mégarbané, A., Mehawej, C., El Zahr, A., Haddad, S., and Cormier-Daire, V. (2013). A Second Family with Autosomal Recessive Spondylometaphyseal Dysplasia and Early Death. ID-130275R1 Subj. Peer Rev.

## **Annexe 4**

Mégarbané, A., Hanna, N., Chouery, E., Jalkh, N., Mehawej, C., and Boileau, C. (2012). Marfanoid habitus, inguinal hernia, advanced bone age, and distinctive facial features: a new collagenopathy? *Am. J. Med. Genet. A.* *158A*, 1185–1189.

**Annexe 5 : La liste des réactifs utilisés dans l'extraction de l'ADN.**

- **BLB** : *Blood Lysis Buffer* (20X) pH:7,4 (mélange de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 3,31 M (165,8 g),  $\text{KHCO}_3$ : 0,2 M (20 g), Acide Ethylène Diamine Triacétique EDTA: 20 mM (40 mL d'une solution stock à 0,5 M à pH:8,0) et de  $\text{H}_2\text{O}$  qsp pour 1000 ml).
- **WLB** : *White Lysis Buffer* (1X) (mélange de TRIS-HCl: 10 mM (1,21g), NaCl: 400 mM (23,4g) et EDTA: 2 mM (4 ml d'une solution stock à 0,5 M à pH:8,0).
- **TE** : 10 mM tris/0,1 mM EDTA pH : 7,5 (1X) (mélange de TRIS-HCl 2M pH : 7,5 : 1ml, EDTA : 0.4 M, pH : 8,0 : 50  $\mu\text{l}$  et  $\text{H}_2\text{O}$  qsp pour 200 ml. Le pH est ajusté à 7,5 avec du HCl.
- **Protéinase K (PK)** : 20 mg/ml
- **SDS** : Sodium Dodécyl Sulfate 20%
- **NaCl 6M** : 175,2 g NaCl dans 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  qsp
- **Ethanol 100%**

**Annexe 6 : La liste des amorces utilisées pour le séquençage de gènes**

<b>Amorce</b>	<b>Séquence (5'-&gt;3')</b>	<b>Tm</b>
<b>PAM16-F</b>	cccatctctgcctctcagtg	60,97
<b>PAM16-R</b>	aagcctggcacagttttctg	60,43
<b>KLRAQ1-F</b>	cgatztatgggtgtgcttttttg	59,53
<b>KLRAQ1-R</b>	GCCTCAAGAACTGGGAGAAA	59,41
<b>EPHX3-F</b>	TGCAGACATACCCCATCCT	62,63
<b>EPHX3-R</b>	AGGGACCTGGGTTGATTGCT	63,09
<b>NWD1-F</b>	ATTCCAGGCAGGACGTGATA	60,48
<b>NWD1-R</b>	CCTGACCAAGTGCCTCATT	60,11
<b>TM6SF2-F</b>	GATGGACTGGAGATGGGAAA	59,86
<b>TM6SF2-R</b>	GCACCCTGAAACACTTAGGC	59,74
<b>GATAD2A-F</b>	GATGAAATGTCCTGGGGATG	60,13
<b>GATAD2A-R</b>	TCTGAAAAGCAGGGAAGCAT	59,96
<b>ATP13A1-F</b>	AGGGGATGTTACTGCCTGCT	61,04
<b>ATP13A1-R</b>	GGCCCAGGCCTTACTTTGTA	61,35
<b>ZNF100-F</b>	TCCATTCATCACCAATTT	60,04
<b>ZNF100-R</b>	AAAGATGCCCTACGTGACAG	60,13
<b>METTL21D-F</b>	GCCAAACGTGTGATTTAGGG	60,37
<b>METTL21D-D</b>	TCGACTGAGGTGTAGGCACA	60,46
<b>ROR2-1F</b>	CCTTTGTGTTCAAGCGTTC	60,0
<b>ROR2-1R</b>	AGAGCGCGGCTTATTGTAAC	60,0
<b>ROR2-2F</b>	GGCTCCTGAAAGGAAAACCTG	47,3
<b>ROR2-2R</b>	CAATGGCAGTGCAAGATGAG	60,0
<b>ROR2-3F</b>	CCTTCCCTTGAAGAGTTCA	60,0
<b>ROR2-3R</b>	TGCTGACTGGTGTGTGTTCA	60,0
<b>ROR2-4F</b>	TGATTTGAAGAAGGTTGTATTCC	44,8
<b>ROR2-4R</b>	ACCCCGGATTCCTACATAAC	60,0
<b>ROR2-5F</b>	TAACAAAATTGCTGGATCGC	56,0
<b>ROR2-5R</b>	CCACTGACCATGCCATTAAC	60,0
<b>ROR2-6F</b>	GTGGGGACTGGATGAATGTC	62,0
<b>ROR2-6R</b>	CCCATACACATTTCAAGGGC	60,0
<b>ROR2-7F</b>	GGATCTTTTGGAAATTCTAGTTTGG	47,7
<b>ROR2-7R</b>	GCCCTCATCACAAGGTTTAC	62,0
<b>ROR2-8F</b>	AGGTGGAGAGTCGGTTGGTAG	51,2
<b>ROR2-8R</b>	CACGCCTGCCATTTATTTTC	58,0
<b>ROR2-9.1F</b>	GCACAGGGACTCCACTCCTC	66,0
<b>ROR2-9.1R</b>	GCATACACCTCTCGGAAGA	62,0
<b>ROR2-9.2F</b>	GGAGTACCTATCCAGCCACCA	51,2
<b>ROR2-9.2R</b>	GGTCTGATCTGGCCCTTCAT	62,0
<b>ROR2-9.3F</b>	GGGCAACCTTTCCAACACTACA	60,0
<b>ROR2-9.3R</b>	GGGCTCTTGTGATTGCTGAG	62,0

**Annexe 7: Les amorces utilisées pour la RT-PCR**

<b>Amorce</b>	<b>Séquence</b>
PAM16-RT-F	5'-TACCTGGCCCAGATCATTGT-3'
PAM16-RT-R	5'-GCATCTGCCCTTTTTCTCTG-3'
CORO7-RT-F	5'-GTCCTGGTGTACTGGGCATT-3'
CORO7-RT-R	5'-AGAGTCAGGGTCCAGCAGAG-3'
CORO7-PAM16-F	5'-CTCAGCGCAGTACCTGGAAG-3'
CORO7-PAM16-R	5'-GCCACCCACGGATTTATCAT-3'
GAPDH-RT-F	5'-ATGTTCGTCATGGGTGTGAA-3'
GAPDH-RT-R	5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'
METTL21D-RT-F	5'-CTTCTCCACCCGACTTCATACTG-3'
METTL21D-RT-R	5'-CAATGGCTCCAAAGACTCTTCA-3'

## Annexe 8: Les milieux utilisés pour la mutagenèse dirigée

- LB Agar (pour 1 Litre )  
10g de NaCl  
10g de Tryptone  
5g d'extraits de levure  
20g d'agar  
H<sub>2</sub>O qsp 1L  
Ajuster le pH à 7 avec du NaOH (5 M)  
Autoclaver avant de couler dans les boites à pétri.
- LB-Ampicilline Agar (pour 1 Litre)  
1 Litre du LB agar  
Autoclaver  
Refroidir à 55 °C puis ajouter 100 mg de l'ampicilline.  
Enfin, couler dans les boites de culture.
- NZY<sup>+</sup> Broth (pour 1 Litre)  
10g de l'amine NZ (hydrolysate de caséine)  
5g d'extrait de levure  
5g de NaCl  
H<sub>2</sub>O qsp 1L  
Ajuster le pH à 7,5 en ajoutant du NaOH  
Autoclaver, puis ajouter les suppléments :
  - 12,5 mL de MgCl<sub>2</sub> (1M)
  - 12,5 mL de MgSO<sub>4</sub> (1M)
  - 20 mL du glucose (20 %)
- Tampon TE  
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA

**Annexe 9: Les amorces utilisées pour le séquençage du plasmide.**

<b>Amorce</b>	<b>Séquence</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>T7-F</b>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	53,2
<b>M13-R</b>	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3'	59,3
<b>MAG-F</b>	5'-GTGATGGGCGTGCAGGTGGTGG-3'	67,7
<b>MAG-R</b>	5'-CTGGATTTTGAGTTCCTCAT-3'	53,2

## **Annexe 10: Les solutions utilisées pour la transformation de levures.**

- **Solution Tris EDTA 10X (TE 10X)**  
100 mM EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique)  
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- **Solution AcLi 10X**  
1M Acétate de Lithium pH 7,5
- **Solution PEG<sub>4000</sub>**  
50% Polythéleneglycol 4000 (p/vol)
- **Solution AcLi 0,1M / TE 1X**  
10 mL Solution TE 10X  
10 mL Solution AcLi 10X  
qsp 100 mL H<sub>2</sub>O
- **Solution AcLi 0,1 M / TE 1X / PEG<sub>4000</sub> 40%**  
0,1 mL Solution TE 10X  
0,1 mL Solution AcLi 10X  
0,8 mL Solution PEG 4000
- **L'ADN de sperme de saumon à 10mg/mL**

## **Annexe 11 (Article non encore publié)**

### **The impairment of MAGMAS function in human is responsible for a severe skeletal dysplasia**

**Cybel Mehawej<sup>1,2</sup>, Agnès Delahodde<sup>3</sup>, Laurence Legeai-Mallet<sup>2</sup>, Valérie Delague<sup>4,5</sup>, Nabil Kaci<sup>2</sup>, Jean-Pierre Desvignes<sup>4,5</sup>, Zoha Kibar<sup>6,7</sup>, Eliane Chouery<sup>1</sup>, Arnold Munnich<sup>2</sup>, Valérie Cormier-Daire<sup>2\*</sup> and André Mégarbané<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Unité de Génétique Médicale et laboratoire associé INSERM à l'Unité UMR\_S 910, Faculté de Médecine, Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon

<sup>2</sup> Département de Génétique, Unité INSERM U781, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Fondation Imagine, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris 75015, France

<sup>3</sup> University of Paris-Sud, CNRS, UMR 8621, Institute of Genetics and Microbiology, Orsay, 91405, France

<sup>4</sup>Inserm, UMR\_S 910, 13385, Marseille, France

<sup>5</sup>Aix Marseille Université, GMGF, 13385, Marseille, France

<sup>6</sup>Center of Excellence in Neuroscience of Université de Montréal, Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada

<sup>7</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal, Montréal, Canada

\* V. Cormier-Daire and A. Mégarbané contributed equally to this work.

Conflict of interest: none.

**Annexe 12 :**

Mehawej, C., Chouery, E., Maalouf, D., Baujat, G., Le Merrer, M., Cormier-Daire, V., and Mégarbané, A. (2012). Identification of a novel causative mutation in the ROR2 gene in a Lebanese family with a mild form of recessive Robinow syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 103–108.