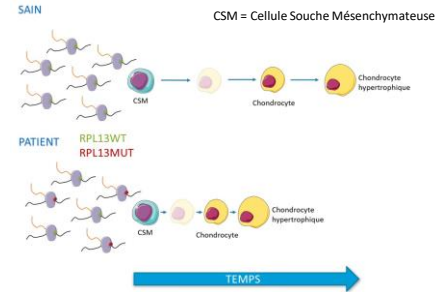


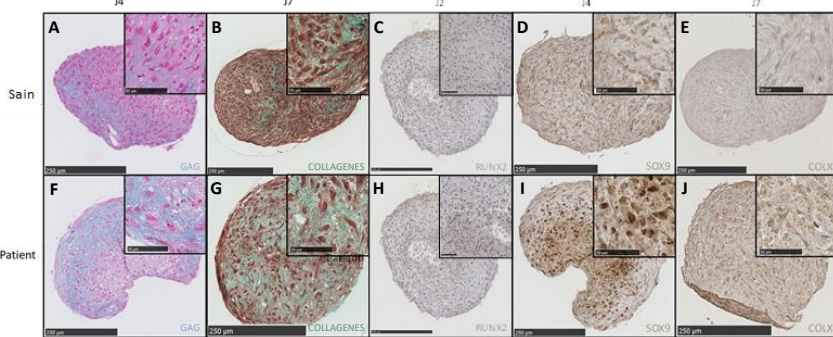
Brigitte Orgebin¹, François Lamoureux¹, Bertrand Isidor², Bénédicte Brounais Le Royer¹, Rose-Anne Thépault¹, Céline Charrier¹, Benjamin Ory¹, Frédéric Lézot¹ et Marc Baud'huin¹
¹ Université Nantes, INSERM, Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés, UMR 1238, F-44000 Nantes, France : emilien.orgebin@univ-nantes.fr; marc.baudhuin@univ-nantes.fr
² CHU Nantes, Service de génétique médicale, F-44000 Nantes, France

Introduction

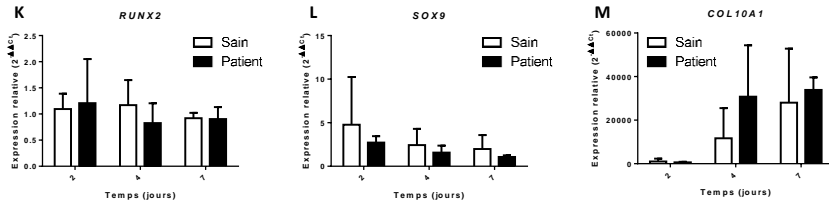
Les ribosomopathies sont un groupe de maladies génétiques rares caractérisées par un défaut dans la formation et/ou la fonction du ribosome. Bien que ces défauts soient ubiquitaires, les anomalies phénotypiques sont tissu-spécifiques. Une nouvelle forme de dysplasie spondylo-épi-métaphysaire (petite taille, scoliose, *genu varum*) a été diagnostiquée chez différents patients. Par séquençage complet de l'exome, plusieurs variants *de novo* ont été identifiés dans le gène codant pour RPL13, protéine de la sous-unité 60S du ribosome. Il en résulte des mutations faux sens soit au niveau de l'exon 6 ou soit au niveau de l'intron 5 conduisant à la rétention de 54 bases dans l'ARNm. Ces variants n'altèrent pas la biogenèse du ribosome et sont correctement intégrés au complexe ribonucléoprotéique. L'élargissement de la plaque de croissance constatée chez les patients a permis d'émettre l'hypothèse que les ribosomes « mutés » prendraient en charge de manière altérée certains transcrits clés de la différenciation chondrogénique en l'accélérant jusqu'au stade terminal hypertrophique.



1 Les cellules de patient expriment précocement les marqueurs de la différenciation chondrogénique

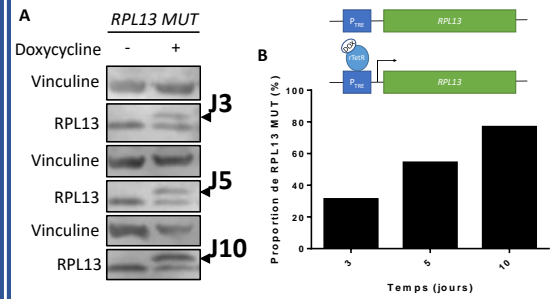


Microphotographies de coupes fines de sphéroïdes de CSM en différenciation chondrogénique à différents temps (J2, J4 et J7) issues d'un donneur sain (A-E) et d'un patient (F-J). Les coupes colorées au bleu alcian (A,F) et trichrome de Masson (B,G) mettent en évidence respectivement les glycosaminoglycane et les collagènes. Les coupes immunohistochimiques mettent en évidence les facteurs de transcription RUNX2 (C,H) et SOX9 (D,I) et la protéine matricielle collagène X (E,J). L'ensemble de ces marqueurs sont exprimés à des temps plus précoces de différenciation chez le patient que chez les donneurs sains, suggérant une accélération de celle-ci.

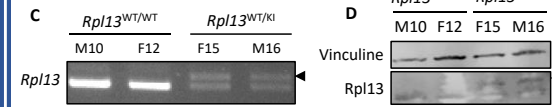


Niveaux d'expression de *RUNX2* (K), *SOX9* (L), *COL10A1* (M) (RT-qPCR) sur des CSM en différenciation chondrogénique issues de donneurs sains et d'un patient. Les niveaux d'expression des ARNm ne semblent pas être différents entre le patient et les donneurs sains. L'ensemble de ces résultats suggèrent une régulation traductionnelle.

2 Les modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* expriment le transgène mutant

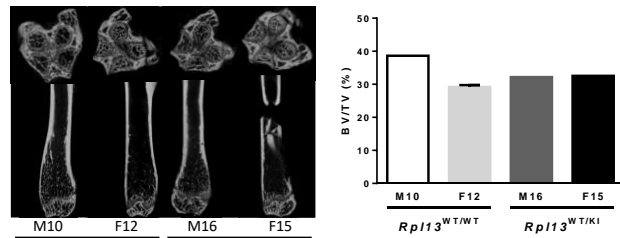


Western-Blot (A) et quantification de l'expression de RPL13 MUT (B) dans des CSM de donneurs sains modifiées avec des particules lentivirales pour exprimer le transgène *RPL13* mutant sous induction par la doxycycline (3, 5 et 10 jours de traitement). La bande supérieure correspond à la forme mutée de RPL13 (◀).



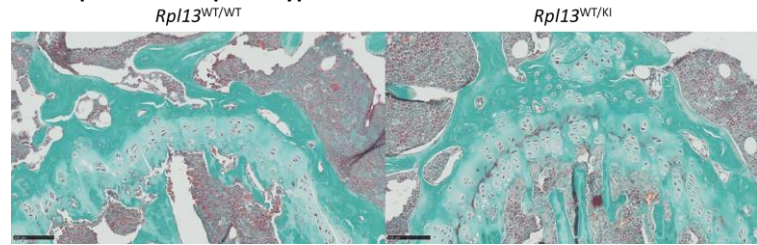
Expression de *Rpl13* par RT-PCR (C) et Western-Blot (D) sur le tissu rénal de souris homozygotes sauvages (*Rpl13*^{WT/WT}) et de souris hétérozygotes (*Rpl13*^{WT/KI}) obtenu par humanisation de l'exon 5 (rétention intronique). Les animaux hétérozygotes expriment le variant (◀).

3 Les animaux porteurs de la mutation à l'état hétérozygote semblent présenter un phénotype osseux normal



Images de microtomographies de fémurs de souris homozygotes sauvages (*Rpl13*^{WT/WT}) et de souris hétérozygotes (*Rpl13*^{WT/KI}) exprimant le variant.

Quantification du volume osseux dans les fémurs de souris homozygotes sauvages (*Rpl13*^{WT/WT}) et de souris hétérozygotes (*Rpl13*^{WT/KI}) exprimant le variant.



Microphotographies de coupes fines de fémurs de souris, homozygote sauvage (*Rpl13*^{WT/WT}) et hétérozygote (*Rpl13*^{WT/KI}) exprimant le variant, âgées de 12 semaines colorées au trichrome de Masson mettant en évidence les collagènes. La zone d'intérêt est centrée sur la plaque de croissance.

Conclusion

L'utilisation de cellules de patient a permis de mettre en évidence que la différenciation chondrogénique semble être accélérée jusqu'au stade terminal hypertrophique. Nos travaux ont permis de mettre au point un modèle cellulaire (CSM modifiées) et animal (souris « humanisée »). Cependant, l'expression de la protéine mutante à l'état hétérozygote chez la souris ne semble pas conduire à un phénotype, contrairement aux patients. Des analyses de RIBOseq/RNAseq couplées à de la spectrométrie de masse pour évaluer la néosynthèse peptidique sur des CSM modifiées en différenciation chondrogénique permettront d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de cette maladie en identifiant les transcrits sensibles au ribosome « muté ». L'étude du modèle murin par imagerie permettra de décrire le phénotype cartilagineux et osseux de cette nouvelle forme de dysplasie au cours de la croissance. Plus que la description du mécanisme physiopathologique de cette nouvelle ribosomopathie, cette étude permettra la compréhension de l'implication du ribosome et de son activité dans la biologie des tissus squelettiques.