



HAL
open science

Mécanisme physiopathologique et spectre clinique liés aux mutations d'ECEL1, un gène majeur d'arthrogrypose

Brice Poreau

► **To cite this version:**

Brice Poreau. Mécanisme physiopathologique et spectre clinique liés aux mutations d'ECEL1, un gène majeur d'arthrogrypose . Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01254570

HAL Id: dumas-01254570

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01254570>

Submitted on 12 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2014

N°

**MECANISME PHYSIOPATHOLOGIQUE ET SPECTRE CLINIQUE LIES AUX
MUTATIONS D'*ECELI*, UN GENE MAJEUR D'ARTHROGRYPOSE**

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT**

Brice POREAU

Né le 30/10/1981 à ORANGE (084)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE*

Le 30 septembre 2014

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Monsieur le Professeur Pierre-Simon JOUK

Membres

Monsieur le Professeur Thierry BOUGEROL

Monsieur le Docteur Julien FAURE

Monsieur le Docteur Klaus DIETERICH, Directeur de thèse

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2013-2014

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	APEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
PU-PH	BACONNIER Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	BAGUET Jean-Philippe	Cardiologie
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BAUDAIN Philippe	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BEANI Jean-Claude	Dermato-vénéréologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
PU-PH	BETTEGA Georges	Chirurgie maxillo-faciale, stomatologie
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
MCU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA CHRISTIAN	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence

Mise à jour le 11 février 2014

PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIROSEL Jean-Paul	Anatomie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
MCU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GODFRAIND Catherine	Anatomie et cytologie pathologiques (type clinique)
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique

Mise à jour le 11 février 2014

PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Département de veille sanitaire
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU-PH	LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	chirurgie générale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MACHECOURT Jacques	Cardiologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MCLEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MOUCHET Patrick	Physiologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie

Mise à jour le 11 février 2014

PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
MCU-PH	RAY Pierre	Génétique
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET J. Paul	Ophthalmologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmacoclinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	SERGENT Fabrice	Gynécologie obstétrique
PU-PH	SESSA Carmine	Chirurgie vasculaire
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU	VILLA Alessandro	Neurosciences
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUTI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

Mise à jour le 11 février 2014

Celui qui désespère des événements est un lâche, mais
celui qui espère en la condition humaine est un fou.

A. Camus

Remerciements

A Monsieur le Professeur JOUK, vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse, veuillez accepter mes plus sincères remerciements et ma gratitude pour votre enseignement.

A Monsieur le Professeur BOUGEROL, veuillez recevoir toute ma gratitude pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

A Monsieur le Docteur FAURE, veuillez accepter toute ma reconnaissance pour juger ce travail et pour toute l'aide apportée.

A Monsieur le Docteur DIETERICH, veuillez accepter toute ma reconnaissance pour avoir dirigé mes travaux de recherche, pour m'avoir soutenu et pour me soutenir encore dans la suite de mon parcours.

Je remercie le Docteur Isabelle Marty pour m'avoir permis de travailler au sein de son équipe « Muscle et Pathologies » et pour me permettre de poursuivre ma route.

Je remercie toute l'équipe 4 pour leur aide précieuse et pour leur bonne humeur.

Je remercie tous les membres du service de génétique clinique et de foetopathologie pour me supporter depuis plusieurs mois, voire années.

Je remercie tous les membres du service de cytogénétique pour leur enthousiasme et leur aide.

Je remercie tous les membres du laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire pour leur écoute et leur bonne humeur.

Je remercie les médecins et internes m'ayant permis de recueillir les données cliniques.

Je remercie tous mes consœurs et confrères rencontrés depuis l'externat à Lyon et ma première partie d'internat à Grenoble.

Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mon frère, mon épouse et ma fille, sans qui rien n'aurait de sens.

Sommaire

Remerciements	p. 7
Abréviations	p. 10
Avant-Propos	p. 12
Introduction	p. 14
Contexte historique	p. 14
Contexte scientifique	p. 16
<i>ECELI</i> : approche clinique	p. 18
<i>ECELI</i> : approche biologique	p. 20
Problématique	p. 23
Matériel et Méthodes	p. 25
A) Etude biologique	p. 25
1) Expression protéique	p. 25
a) Plasmides	p. 25
b) Midi-Prep	p. 25
c) Lignées cellulaires et cultures cellulaires	p. 26
d) Transfections	p. 27
e) Préparation des lysats	p. 28
f) Dosage protéique par la méthode de Folin-Lowry	p. 29
g) Anticorps utilisés	p. 29
h) Western-Blot	p. 29
2) Localisation	p. 30
a) Marquage immunofluorescent	p. 30
b) Anticorps primaires	p. 30
c) Anticorps secondaires	p. 31
3) Protocole d'activité enzymatique	p. 31
a) Lysat au CHAPS	p. 31
b) Activité enzymatique	p. 32

B) Etude clinique	p. 33
1) Données cliniques	p. 33
2) Score de sévérité	p. 34
Résultats	p. 37
A) Analyse biologique : mécanismes physiopathologiques	p. 37
1) Expression protéique	p. 37
2) Localisation protéique	p. 39
3) Activité enzymatique	p. 41
a) Etude de l'activité de p.Cys760Arg	p. 41
b) Etude de l'activité de p.Leu165Pro, p.Gln318Pro, p.Arg702Leu	p. 43
B) Analyse clinique : spectre de sévérité	p. 45
1) Données cliniques	p. 45
a) Patients avec mutations faux-sens	p. 47
b) Patients avec mutations non-sens et d'épissage	p. 51
2) Score de sévérité	p. 62
Discussion – Perspectives	p. 64
Conclusion	p. 70
Bibliographie	p. 72
Annexes	p. 75
Cahier clinique	p. 75
Score de Weinreb et al.	p. 78
Classification des arthrogryposes distales	p. 79
Communications affichées	p. 80
Serment d'Hippocrate	p. 83
Résumé - Summary	p. 84

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AMC : arthrogrypose multiple congénitale

BSA : bovin serum albumin

CaCl₂ : chlorure de Ca²⁺

CGI-S : clinical global impression - severity

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

COS-7 : CV-1 in origin and carrying the SV40 genetic material

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DO : densité optique

ECE-1 : endothelin converting enzyme 1

ECEL1 : endothelin converting enzyme like 1

EDTA : 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl dinitrilo) tetraacetic acid

EMG : électromyogramme

FBS : fetal bovine serum

HBS : hepes buffered saline

HEK : human embryonic kidney

HRP : horseradish peroxydase

IRM : imagerie par résonance magnétique

KCl : chlorure de potassium

kDa : kilo Dalton

LB : lysogeny broth

NaCl : chlorure de sodium

PBS : phosphate buffer saline

pH : potentiel hydrométrique

PS : pénicilline-streptomycine

RCIU : retard de croissance intra-utérin

RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay buffer

SA : semaine d'aménorrhée

SDS : sodium dodécyl sulfate

TBS : Tris-buffered saline

WT: wild type

Avant-propos

La « biologisation de la médecine¹ » s'est fortement accrue depuis la seconde moitié du vingtième siècle, et plus encore depuis l'avènement de la génétique moléculaire voici près de trois décennies². La thèse d'exercice proposée ici s'inscrit clairement dans cette démarche. Le transfert de technologies et de méthodologies d'une discipline scientifique, la biologie, qui s'est développée essentiellement à partir du dix-neuvième siècle vers cet art-science qu'est la médecine, pluriséculaire, ne s'opère toutefois pas sans réinterroger les principes fondamentaux de cette dernière.

La relation médecin-patient est le centre de la pratique médicale. Elle donne le sens même de la vocation du professionnel de santé. Ce n'est pas novateur, le serment d'Hippocrate n'en est-il d'ailleurs pas le reflet ? Paradoxalement, cette biologisation de la médecine pourrait, à première vue, exprimer un éloignement entre le médecin, et plus spécifiquement le médecin spécialiste, et le patient. En effet, les modèles cellulaires que nous allons utiliser, les études biochimiques et microscopiques, les techniques de séquençage de gènes, ne laissent apparaître le patient que par un numéro, voir l'effacent totalement sous l'empire de la législation de l'anonymat. Associé à cet effet, nous devons également évoquer que nos recherches se focalisent ici sur des maladies rares. Les patients qui en souffrent, souffrent aussi des difficultés de prise en charge de ces pathologies difficilement diagnostiquées et de la reconnaissance sociale de leur pathologie. Ces deux éléments combinés, maladies rares et biologisation, font-ils disparaître le patient ? A-t-on perdu le sens de notre pratique ?

Il n'en est rien. Si cette thèse n'est pas une réponse exhaustive à cette problématique, elle est une illustration du raisonnement qui intègre le patient au centre de la pratique du médecin. En 1943, Georges Canguilhem³ (1904-1995) intitule sa thèse d'exercice en médecine *Essai sur quelques problèmes concernant le normal et la pathologique*, qui sera publiée aux Presses Universitaires de France en 1966 après modifications et corrections sous le titre plus laconique *Le normal et le pathologique*. La clé de cet ouvrage est la notion de normativité. A partir de quel niveau, ou degré d'atteinte un être humain n'est-il plus ou pas « normal » ? Cette question fondamentale s'applique aux cas que nous allons étudier. Canguilhem revisite les développements statistiques qui émergent durant la première moitié du vingtième siècle et conclut qu'il est difficile d'évaluer le pathologique par rapport au normal uniquement en

¹ Terme repris à Pascal Nouvel, cours du 11/03/2011, Université Paul Valéry, Montpellier.

² Nous prenons en compte les découvertes de gènes associés à des pathologies depuis l'utilisation de la PCR, Polymerase Chain Reaction des années 1980, puis le séquençage haut-débit et aujourd'hui très haut-débit. Mais l'histoire de la génétique moléculaire a des origines antérieures. Voir à ce sujet les travaux de Michel Morange.

³ Philosophe de formation, normalien.

utilisant des écarts statistiques. Cette difficulté provient de la spécificité du vivant à s'adapter d'une part, mais aussi à la spécificité de l'être humain à se situer dans un contexte social. « Par suite, dans l'espèce humaine, la fréquence statistique ne traduit pas seulement une normativité vitale mais une normativité sociale⁴ ». Certes, la biologie et la physiologie sont un instrument du médecin, mais le médecin a alors un rôle qui va au-delà.

Par la connaissance nouvelle de la biologie et de ses technologies, le médecin a la possibilité, en particulier dans le cas des maladies rares, de s'investir dans la compréhension des signes cliniques qu'il observe et qu'il décrit. Dans l'optique du sens même de sa pratique, le médecin peut réintégrer les éléments découverts par la recherche fondamentale au bénéfice de la relation médecin-patient. En cela, il peut non seulement tenter d'établir une normativité clinique⁵ mais il doit aussi participer à la normativité sociale.

Le rôle social du médecin du vingt-et-unième siècle est lourd de sens. Appréhender la biologie d'aujourd'hui, poursuivre la pratique clinique et donner au patient une place dans la société actuelle sont les trois axes de la démarche proposée.

Dans cet avant-propos, nous tentons de donner un sens. Il semble qu'il faut être fou pour donner du sens à la condition humaine⁶. Mais au fond, la folie n'est-elle pas le propre de l'homme⁷ ?

⁴ Canguilhem G., *Le normal et le pathologique*, PUF Quadrige, 2004, p. 102.

⁵ Nous employons ce terme plutôt que celui de normativité vitale, cette dernière faisant référence au courant vitaliste du dix-neuvième siècle qui consiste en la vision d'une force vitale ou d'un élan vital qui animerait la matière et permettrait le vivant. Voir à ce sujet les travaux d'Henri Bergson, et les débats, toujours actuels notamment aux Etats-Unis entre le vitalisme, le créationnisme et les courants évolutionnistes.

⁶ Citation d'Albert Camus reprise avant les remerciements.

⁷ Voir l'ouvrage d'Erasmus, *Eloge de la folie*, avec plusieurs éditions du seizième siècle.

Introduction

Contexte historique

« Arthrogrypose » provient du grec αρτρον articulation γρυπος courbée. Ce terme est référencé dans les dictionnaires de la fin du dix-neuvième siècle⁸. Une des définitions fournies est la suivante : « position vicieuse des articulations consistant dans leur flexion permanente, comme on le voit dans certaines arthralgies, ankyloses etc...⁹ ». Pour autant, le terme est assez peu employé dans les descriptions cliniques. On lit par exemple contracture spasmodique congénitale¹⁰, ou simplement contracture congénitale. Les pieds bots ou encore les mains bottes font également partis du vocable descriptif sémiologique. Ces descriptions cliniques se retrouvent essentiellement dans les travaux tératologiques¹¹ de la seconde moitié du dix-neuvième siècle, en particulier dans l'étude des fœtus humains.



Figure 1 : Illustration d'un fœtus avec pieds bots, articulations courbées, fente labiale. Tirée de Deleplanque P., *Études tératologiques. I. Des Difformités congénitales produites sur le fœtus par la contraction musculaire*, Editeur O. Doin, Paris, 1895, planche V.

L'arthrogrypose, à la fin du dix-neuvième siècle, début du vingtième siècle, est un signe clinique utilisé dans les descriptions, mais qui n'apparaît pas comme le signe central d'une

⁸ *Dictionnaire encyclopédique universel contenant tous les mots de la langue française et résumant l'ensemble des connaissances humaines à la fin du XIXe siècle*, Editeur C. Flammarion, Paris, 1894-1898, p. 388.

Dictionnaire des dictionnaires. Lettres, sciences, arts, encyclopédie universelle, Impressions Réunies, Paris, 1895, p. 588.

⁹ *Ibid.*

¹⁰ Mugdan, Arthrogrypose ou contracture spasmodique congénitale, *Sém. Med.*, n° 57, 1892.

¹¹ La tératologie était la science qui étudiait les malformations congénitales (science « des monstres »). Voir les travaux d'Olivier Roux concernant l'histoire de cette discipline.

pathologie ou d'un syndrome en particulier. Il faut attendre la seconde moitié du vingtième siècle pour voir apparaître l'utilisation du terme arthrogrypose constitué comme une entité plus spécifique. Cependant, la question entre maladie ou syndrome demeure. Une thèse de 1965 s'intitule « Arthrogrypose multiple congénitale, maladie ou syndrome ?¹² ». Le questionnement sur l'origine de ce syndrome ou de cette pathologie est clairement mis en relief. Ainsi, les travaux et observations des années 1970 permettent d'établir diverses étiologies envisageables. Maurice Lamy, suite à une observation d'Antoine Giroud l'explique en 1972 : « Certaines [formes d'arthrogrypose] semblent être de nature génétique. D'autres, vraisemblablement sont des embryopathies acquises et non transmissibles, d'où l'intérêt des enquêtes touchant les facteurs susceptibles d'agir pendant la vie intra-utérine¹³ ». Au début des années 1980, Judith Hall, pédiatre, publie une délimitation d'entités nouvelles concernant les arthrogryposes¹⁴. Des années 1990 à nos jours, des étiologies géniques vont être découvertes et vont permettre de questionner à nouveau les entités cliniques précédemment décrites. Cette thèse s'inscrit dans cette continuité.

¹² Vialettes M.-L., *Arthrogrypose multiple congénitale, maladie ou syndrome ? A propos de 31 cas et d'une revue de la littérature des dix dernières années*, Impression R. Vezin, Paris, 1965.

¹³ Lamy M., A propos de la communication de M. Antoine Giroud : Syndromes arthro-myodysplasiques et leurs causes chez l'homme et l'animal, *Bull. Acad. Nat. Med.*, séance du 21 novembre 1972, 156, 859-861.

¹⁴ Hall et al., The distal arthrogryposes : delineation of new entities – review and nosologic discussion, *Am. J. Med Genet.*, 1982, 11(2):185-239.

Contexte scientifique

L'arthrogrypose multiple congénitale (AMC) correspond à la présence d'au moins deux niveaux de limitations articulaires (Hall et al., 1983). Il s'agit par exemple d'un fœtus avec pied(s) bot(s) (atteinte unie ou bilatérale) et main(s) botte(s) (atteinte unie ou bilatérale). Le groupe d'affections est donc hétérogène, selon les articulations mises en jeu et les signes associés. Une diminution voire une abolition des mouvements fœtaux est à l'origine de ces fixations articulaires (Moessinger, 1983 ; Hall et al., 1983). La prévalence estimée est de 1/3000 à 1/12000 selon les études (Darin et al., 2002 ; Lowry et al., 2010). Il s'agit donc d'une affection rare.

Les étiologies de cette diminution, voire abolition des mouvements fœtaux sont multiples, comme le mentionnait déjà M. Lamy en 1972. L'étiologie génétique, et plus précisément génique, existe et semble être l'une des plus fréquentes (Hall, 1997). Par ailleurs, d'un point de vue physiologique, l'atteinte du système neuromusculaire semble être la plus fréquente comparativement aux atteintes du système nerveux central, du tissu conjonctif ou de l'os (Darin et al., 2002 ; Hall, 2014).

Au sein des sous-groupes hétérogènes d'AMC, le sous-groupe des arthrogryposes distales (AD) affecte plus particulièrement, mais non spécifiquement, la distalité des membres (Hall, 1997). Les signes cliniques fréquemment observés sont une camptodactylie, un chevauchement des doigts, les pieds bots varus équins, une déviation ulnaire, une absence de plis de flexion des articulations interphalangiennes (Figure 2). Différents phénotypes ont été décrits et permis l'établissement de classifications (Hall et al., 1983 ; Bamshad et al., 1996 ; Annexe).



Figure 2 : Illustration des signes cliniques d'arthrogrypose distale touchant les mains. A gauche, camptodactylie et déviation ulnaire des doigts. Au centre, chevauchement des doigts II sur IIIème et IV sur Vème. A droite, absence de plis de flexion. (Dieterich, 2013).

Récemment, plusieurs gènes ont été impliqués dans le sous-groupe des arthrogryposes distales dont le mécanisme physiopathologique le plus fréquent met en jeu les protéines de l'appareil contractile musculaire : *MYH2*, *MYH3*, *MYH8*, *MYBPC1*, *TPM2*, *TNNI2*, *TNNT3* (Bamshad et al., 2009 pour revue). En effet, ces sept gènes codent tous pour des protéines de l'unité motrice des fibres musculaires qu'est le sarcomère.

Ce sous-groupe d'arthrogrypose comporte des atteintes qui n'évoluent pas au cours du temps. Elles sont par définition présentes à la naissance. Le diagnostic anténatal n'est en revanche effectué que dans une petite proportion. Ce sous-groupe est ainsi différent des myopathies congénitales dont les atteintes peuvent évoluer avec l'âge et dont la présentation clinique initiale est constituée d'une hypotonie généralisée et de la diminution voire de l'absence de mouvements spontanés. Les atteintes histologiques peuvent être également spécifiques, ce qui n'est pas le cas pour les arthrogryposes distales. Le mécanisme physiopathologique est ainsi différent (Dieterich, 2013).

En 2013, un nouveau gène a été associé à une forme spécifique d'arthrogrypose distale, autosomique récessive, il s'agit du gène *ECELI* (Dieterich et al., 2013). De récentes publications ont confirmé le lien entre *ECELI* et ce type d'arthrogrypose distale (McMillin et al., 2013 ; Shaaban et al., 2013 ; Shaheen et al., 2013 ; Barnett et al., 2014 ; Patil et al., 2014). Nos travaux de thèse d'exercice vont se focaliser sur ce gène.

ECEL1 : approche clinique

L'association du gène *ECEL1*, endothelin converting enzyme like 1, avec un type particulier d'arthrogrypose distale a été mise en évidence en 2013 au cours d'une étude réalisée par une équipe grenobloise. Il s'agissait d'une étude dans le cadre de la thèse ès science du Dr Dieterich, effectuée conjointement dans l'équipe de recherche « Muscle et pathologies » dirigée par le Dr Isabelle MARTY (Grenoble-Institut des Neurosciences), le laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble dirigé par le Pr Joël LUNARDI, et actuellement par le Dr Julien FAURE, et le Centre de Référence national labellisé « maladies rares » des Anomalies du Développement Centre-Est, dont la coordination locale est assurée par le Pr Pierre-Simon JOUK, et dont la spécificité nationale est le diagnostic et la prise en charge de pathologies avec arthrogrypose (Dieterich et al., 2013).

Cette étude a été menée sur une famille consanguine initialement, puis sur cinq autres familles (10 patients au total). L'étude de liaison génétique par homozygotie par filiation et l'analyse statistique par calcul du lod-score ont permis d'évoquer *ECEL1* comme gène candidat. Le séquençage des 18 exons du gène a amené à la découverte d'une mutation faux-sens p.Cys760Arg ainsi que des mutations non-sens. La cohorte initiale de patients permettait de décrire un phénotype reconnaissable (Dieterich et al., 2013).

Les manifestations comprennent :

- Des signes fréquents : en anténatal : diminution des mouvements fœtaux, genoux en extension ; en post-natal : amyotrophie des membres inférieurs, scoliose, camptodactylie, limitation active des genoux, amyotrophie de la langue, ptosis, syndrome restrictif pulmonaire
- Des signes accompagnateurs : en anténatal : retard de croissance intra-utérin (RICU), oligoamnios, hydramnios ; en post-natal : hyperlordose, luxation congénitale de hanche, lagophthalmie, pseudo-exophthalmie, pieds varus ou valgus convexes, pterygia.
- Les examens complémentaires ont montré : en IRM musculaire : un profil d'infiltration graisseuse avec atteinte sévère du muscle biceps fémoral et importante du sartorius, épargnant le droit antérieur et le gracilis. Les examens histologiques ou électromyographiques ne comportaient pas de signes spécifiques.

De l'ensemble de ces signes cliniques, et notamment en plus de l'amyotrophie des membres et des atteintes articulaires, les éléments plus spécifiques à rechercher pour orienter le praticien devant une arthrogrypose congénitale multiple vers *ECELI* sont la limitation de la flexion active des genoux, le ptosis et l'amyotrophie linguale (sillon marqué) (figure 3, annexe p.82).



Figure 3 : A gauche : Amyotrophie linguale (avec sillon médian très marqué) chez un patient avec mutation faux-sens du gène *ECELI*. Au centre: limitation de la flexion active des genoux, visible lors que le patient est au bord de la table d'examen. A droite : ptosis unilatéral (Dieterich, 2013).

Si le phénotype clinique semble être clairement défini, qu'en est-il des connaissances biologiques du gène et de la protéine ECEL1 ?

ECEL1 : approche biologique

Le gène *ECEL1* comporte 18 exons et code une protéine qui comprend 775 acides aminés. La protéine endothelin-converting enzyme like 1 (ECEL1) est une enzyme de la famille des endopeptidases. Une souris KO existe pour ce gène. Les expérimentations avec cette souris ont montré que la protéine ECEL1 est impliquée dans le développement des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans le système nerveux central (Kiryu-Seo et al., 2000 ; Nagata et al., 2006 ; Nagata et al., 2010). Contrairement aux gènes impliqués dans l'unité sarcomérique, *ECEL1* n'est pas directement lié au mécanisme moléculaire de contraction musculaire.

La protéine ECEL1 est une protéine transmembranaire qui réside dans la membrane du réticulum endoplasmique (Benoît et al., 2004). Elle possède un domaine enzymatique caractéristique des endopeptidases de la famille des neprilysines, metalloprotéases à zinc (Valdenaire et al., 1999), cependant son substrat naturel est inconnu à ce jour. L'inactivation du gène *ECEL1* est létale chez la souris par défaut de fonctionnement du diaphragme conduisant à l'insuffisance respiratoire. L'absence d'expression de la protéine chez la souris KO entraîne un défaut présynaptique avec une diminution du nombre de branchements terminaux de l'axone moteur au contact du muscle à innover et une diminution du nombre de jonctions neuromusculaires (Nagata et al., 2010).

Les mutations identifiées par le laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble et celles retrouvées dans la littérature font du gène *ECEL1* l'une des causes les plus fréquentes d'arthrogrypose distale actuellement. Les mutations sont pour la plupart des mutations non-sens, des mutations impliquant un décalage du cadre de lecture et des mutations d'épissage (Dieterich et al., 2013 ; McMillin et al., 2013 ; Shabaan et al., 2013 ; Barnett et al., 2014 ; Patil et al., 2014). Le mécanisme physiopathologique proposé est double : la dégradation prématurée des transcrits aberrants aussi appelée *mRNA decay* (Nicholson et al., 2010), et la dégradation des protéines tronquées. Cependant, si les mutations impliquant ce type de mécanisme physiopathologique sont majoritaires, des mutations faux-sens, modifiant un acide aminé et permettant ainsi la transcription et la formation d'une protéine sont retrouvées. Nous illustrons l'ensemble des mutations faux-sens du laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble et celles de la littérature (Figure 4).

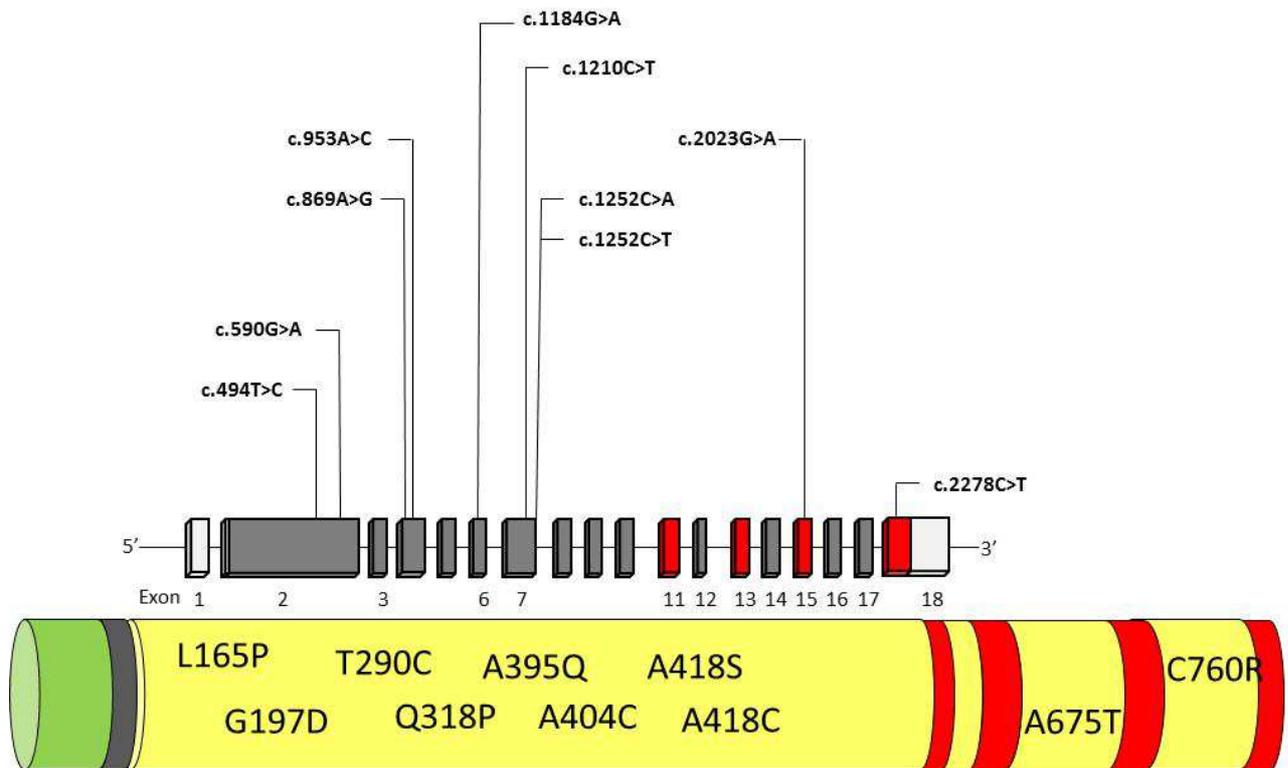


Figure 4 : Mutations faux-sens retrouvées dans le gène *ECEL1*. La structure du gène est sur le haut du schéma, les exons 1 à 18 sont représentés. La structure de la protéine est représentée en bas : les zones colorées en rouge représentent les séquences primaires du domaine enzymatique, la zone grisée le domaine transmembranaire. La limite du domaine transmembranaire est l'acide aminé 82. Les mutations retrouvées au sein du laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble sont p.Leu165Pro et p.Gln318Pro. La mutation faux-sens p.Cys760Arg est la première à avoir été identifiée. Les mutations p.Ala675Thr comme p.Cys760Arg sont impliquées dans le domaine de l'activité enzymatique de la protéine.

Deux de ces mutations, p.Ala675Thr (Patil et al., 2014 ; Dohrn et al., 2013) et p.Cys760Arg (Dieterich et al., 2013,) sont situées dans la partie C-terminale, respectivement dans ou à proximité de deux domaines d'activité enzymatique de la protéine. L'hypothèse physiopathologique pour expliquer l'effet pathogène de ces mutations est la perte de la fonction enzymatique d'*ECEL1* (figure 5).

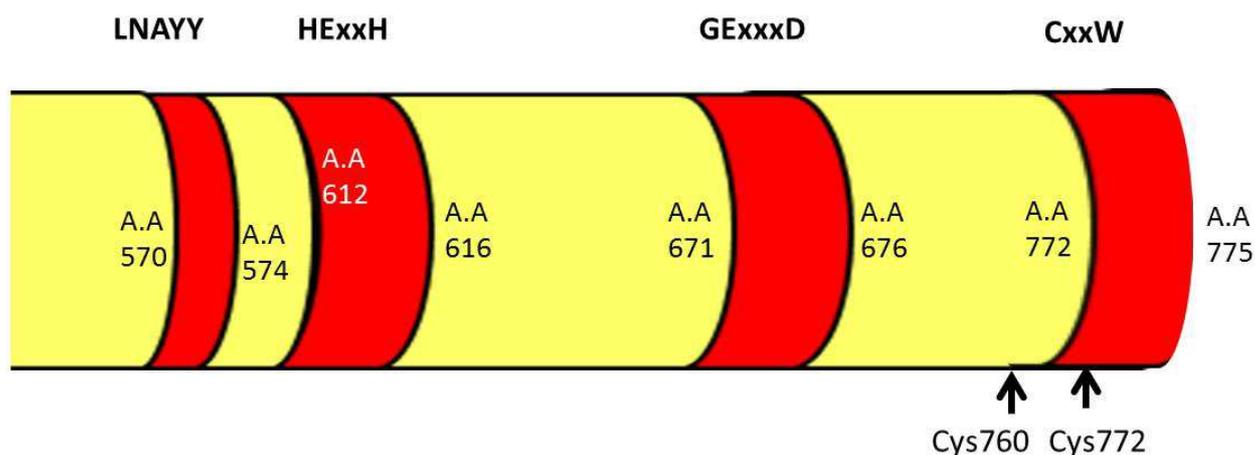


Figure 5 : Protéine ECEL1 schématique avec représentation du domaine enzymatique comportant trois domaines LNAYY, HExxH et GExxxD impliqués dans la coordination avec l'ion Zinc et CxxW dans l'activité enzymatique. La mutation décrite par Patil et al. se situe au sein du domaine GExxxD. La mutation p.Cys760Arg est à proximité du domaine GExxxD. Une autre cystéine en position 772 est présente.

L'activité enzymatique d'ECEL1 est rendue possible grâce à trois domaines cruciaux pour la coordination entre le Zinc et la protéine, mais aussi pour la stabilisation du complexe lors de la catalyse et un domaine pour la maturation protéique. Ces trois domaines sont LNAYY, HExxH et GExxxD pour la coordination avec le Zinc (Figure 4) et CxxW pour le domaine impliqué dans la maturation et dans l'activité enzymatique. Ils ont été identifiés car ils sont conservés entre Endothelin-converting enzyme *ECE-1* et *ECEL-1* (Valdenaire et al., 1999). La cystéine 760 établit un pont disulfure avec la cystéine 772 du domaine CxxW.

Une hypothèse de mécanisme physiopathologique des mutations faux-sens est la perte de l'activité enzymatique, avec néanmoins production de la protéine. En effet la protéine mutée, dans un système in vitro, est bien présente dans la cellule. Cela a été montré pour la mutation p.Cys760Arg (Dieterich et al, 2013).

Problématique

Le but général de mon travail est de mieux comprendre la physiopathologie de l'arthrogrypose distale liée à *ECELI* au niveau biologique d'une part et de définir le spectre de sévérité clinique d'autre part.

A) L'analyse biologique

Tout d'abord, l'analyse biologique va porter sur les variants faux-sens. En effet, les mutations non-sens et d'épissage amènent à l'absence de production de la protéine telle que cela a été démontré précédemment pour ce type de mutations (Dieterich et al, 2013). Le mécanisme physiopathologique est donc connu. Cependant, qu'en est-il du mécanisme pour les mutations avec production de la protéine ? L'hypothèse émise est notamment la perte ou la nette diminution de l'activité enzymatique. Un autre élément important de la fonction d'*ECEL1* pourrait être sa localisation intracellulaire. J'ai entrepris l'étude de deux variants considérés comme pathogènes (p.Leu165Pro et p.Gln318Pro), identifiés au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire depuis la mise en place du séquençage au titre diagnostique d'*ECELI* (figure 3) ainsi que d'un variant considéré comme non pathogène (p.Arg702Leu) (tableau 1) qui servira de contrôle pour les analyses d'expression, de localisation et d'activité enzymatique. Il s'agit notamment d'avérer d'une part la perte de la fonction enzymatique comme l'un des mécanismes physiopathologiques, mais aussi d'établir s'il s'agit du seul mécanisme ou si d'autres interviennent.

Le tableau ci-dessous présente le statut génétique de chaque variant dans le génome des patients.

Tableau 1 : Caractéristiques des variants

Variants	Caractéristiques moléculaires
p.Leu165Pro	Homozygote
p.Gln318Pro	Associé à une mutation affectant l'épissage
p.Arg702Leu	Pas d'autre variant associé
p.Cys760Arg	Homozygote

Deux objectifs sont assignés à cette première partie : l'analyse biologique.

- a) Le premier est l'étude de l'impact des trois variants faux-sens (p.Leu165Pro, p.Gln318Pro, p.Arg702Leu) sur l'expression de la protéine par analyse *in vitro* sur des modèles cellulaires COS-7 et HEK293, ainsi que l'étude de l'impact des variants sur la localisation de la protéine sur les mêmes modèles cellulaires. Si la localisation n'est pas affectée, l'activité enzymatique sera alors étudiée.
- b) Le second objectif est l'étude de l'activité enzymatique par la mise au point d'un test d'activité *in vitro* avec ECEL1 recombinant, ce test n'existant pas à ce jour. Le but est en particulier d'évaluer l'impact des substitutions nucléotidiques en dehors du domaine enzymatique de la protéine. Le transfert de cette technologie au laboratoire de diagnostic permettrait une évaluation plus poussée du caractère pathogène de ces mutations, qui s'appuie actuellement sur les connaissances structurales de la protéine et des logiciels de prédiction de pathogénicité.

B) Analyse clinique : spectre de sévérité

La seconde partie de mon travail consiste à établir un lien possible entre les différents mécanismes physiopathologiques observés et découverts et le phénotype des patients. En effet, même si les signes cliniques permettent d'orienter, de par leur spécificité, vers la recherche de mutation d'ECEL1 (Dieterich et al., 2013), ce phénotype reste variable dans une certaine mesure. Certains patients ont des atteintes articulaires, musculaires et fonctionnelles plus sévères que d'autres. Y a-t-il un lien entre cette sévérité, ce « spectre » clinique observé par les praticiens, et les mécanismes biologiques sous-jacents ? Plus précisément, l'hypothèse formulée est que les patients avec des mutations non-sens ou d'épissage ont un phénotype moins sévère que ceux avec une mutation faux-sens.

A cet effet, l'objectif est double.

- a) Préciser le phénotype pour chaque patient
- b) Etablir un système de score pour évaluer la sévérité clinique des atteintes.

Méthodologie

A) Etude biologique

1) Expression protéique

L'objectif est d'analyser par Western-Blot si les protéines mutées sont produites en quantité identique à la protéine WT.

a) Plasmides

Les plasmides des trois variants et de la mutation (p.Cys760Arg, p.Leu165Pro, p.Gln318Pro, p.Arg702Leu) ont été réalisés préalablement au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble. Les séquences sont optimisées pour une expression dans des cellules de mammifère (COS-7) et contenues dans un vecteur d'expression pcDNA3.1(+) (figure 6).

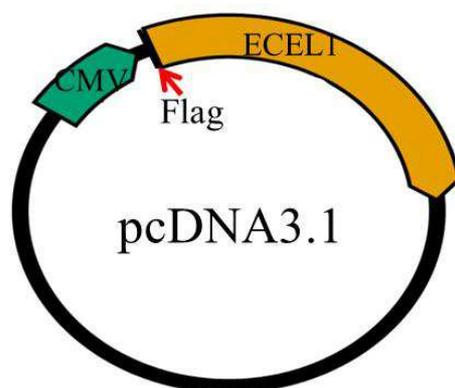


Figure 6 : plasmide pc DNA3.1 utilisé comprenant un promoteur CMV, un Flag dans le domaine N-terminal et le gène *ECELI*.

b) Midi-Prep

En vue d'obtenir une quantité suffisante de plasmides pour effectuer les transfections cellulaires, des midi-prep ont été réalisées pour les trois variants et la mutation. Le protocole du kit NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) a été suivi. Après prolifération des colonies, une colonie de chaque variant a été mise en culture dans du LB medium (5 ml) pendant 8 heures, à 37°C avec une agitation constante à 300 tours par minute. A l'issue de ces 8 heures, le milieu trouble a été placé dans un erlenmeyer de 200ml avec 100ml de LB medium durant la nuit à 37°C avec une agitation constante à 300rpm. Le lendemain, les bactéries ont été récoltées après centrifugation. Une suspension a ensuite été réalisée avec le

tampon RES-EF (8 ml). La lyse a été réalisée avec le tampon LYS-EF (8 ml), pendant 5 minutes, sans vortexer. Le tampon EQU-EF (15 ml) a permis l'équilibration de la colonne, puis la neutralisation (tampon NEU-EF, 8ml) a été suivie d'une incubation sur glace de 5 minutes. L'étape suivante a été la clarification puis trois lavages ont été effectués. Les trois dernières étapes ont été l'élution (avec le tampon ELU-EF, 5ml), la précipitation avec de l'isopropanol (3,5ml) et la reconstitution d'ADN.

La concentration d'ADN de chaque plasmide a été vérifiée par mesure de la densité optique (DO) avec un spectrophotomètre Smart-Spec Plus (Bio-rad) après une dilution au 1/200.

c) Lignées cellulaires et cultures cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été employées dans mon étude : COS-7 et HEK 293. Les deux lignées ont une morphologie différente, ce qui permet d'optimiser les manipulations selon l'objectif recherché. Le milieu de culture utilisé est constitué de : DMEM 4,5g/l de glucose, 20% FBS-USA (sérum de veau fœtal), 2% PS (antibiotiques). Le milieu a été préparé par séquence de 200 ml (soit 178 ml de DMEM, 20 ml de FBS et 2 ml de PS). Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 100mm de diamètre (P100) dans 10 ml de milieu. Elles sont amplifiées dans ce milieu pendant 2 à 3 jours tout en surveillant régulièrement leur confluence. Dans ce milieu, la confluence recherchée est une confluence maximale pour obtenir un taux de transfection élevé. Entre 90% et 100% de confluence a été recherchée. En moyenne, les P100 comprenaient 20 millions de cellules HEK 293 et environ 15 millions de cellules COS. Les cellules sont passées pour permettre ensuite leur utilisation en vue de l'expression protéique. Le passage consiste à collecter les cellules d'un support physique (boîte de culture, lamelle ou autre) pour pouvoir les compter et les ensemencer sur un nouveau support à plus faible densité. Pour ce faire, les cellules sont trypsinées (0.05% trypsine) pendant 3 minutes pour la lignée HEK 293 et 5 minutes pour la lignée COS-7, à 37°C. Un millilitre de milieu est ajouté par P100 pour récupérer les cellules, et 8 ml de milieu ont été ensuite ajoutés. Les cellules ont été comptées (compte sur 20 µl d'une plaquette adaptée au comptage). Elles sont ensuite ensemencées à la dilution choisie.

A l'issue d'un nombre de passages (>2 après la décongélation du culot initial), des boîtes de Pétri de 60 mm (P60) sont ensemencées avec un million de cellules (HEK293 ou COS-7), 48 heures après un des passages. Après incubation durant la nuit à 37°C, les P60 ont été utilisées pour transfection.

d) Transfections

Deux types de transfection ont été utilisés : avec Exgen 500 et avec du phosphate de calcium. La première méthode a été utilisée pour obtenir les résultats d'expression et de localisation plus rapidement et avec un coût moindre. La seconde méthode a permis d'obtenir un taux de transfection nettement supérieur en vue de mettre au point le test enzymatique.

- La transfection avec de l'Exgen 500 a été faite avec les produits suivants

Tableau 2 : Transfection - Préparation pour une P60

NaCl	97 μ l
ADN, plasmide (si 1μg/μl)	3 μ g (=3 μ l si 1 μ g/ μ l)
Exgen 500	10 μ l
Total	110 μ l

- Lors de la préparation de la solution, ont été mis dans l'ordre, le NaCl, puis l'ADN, puis l'Exgen 500. 30 secondes de vortex ont été effectuées à l'issue. La solution a été laissée 10 minutes à température ambiante, puis la solution a été ajoutée goutte à goutte dans chaque P60.

- La transfection au phosphate de calcium a été réalisée avec les produits suivants

Tableau 3 : Transfection - Préparation pour une P60

CaCl₂	32 μ l
ADN, plasmide (si 1μg/μl)	7,5 μ g (=7,5 μ l si 1 μ g/ μ l)
H₂O	225 μ l
HBS	260 μ l
Total	520 μ l

- Les produits sont issus du kit CalPhos Mammalian Transfection de Clontech. La réalisation a été faite systématiquement par 4P60 au minimum. Dans un falcon de 15ml, l'ADN (30 µg), le CaCl₂ (128 µl) et l'eau (900 µl), pour 4P60 ont été mis ensembles et vortexés quelques secondes. L'HBS (1040 µl) pour 4P60 a été rajouté goutte à goutte à la première solution, tout en vortexant faiblement celle-ci. La solution ainsi obtenue a été laissée 10 minutes à température ambiante.
- A l'issue, 520 µl ont été distribués dans chaque P60.
- Les P60 ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 37°C.

e) Préparation des lysats

Pour obtenir des lysats dans l'objectif unique de connaître si l'expression protéique est altérée, du tampon RIPA (radio immuno precipitation assay) associé à des anti-protéases a été utilisé. Le tampon a été réalisé avec 50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% de SDS, 0,5% de sodium deoxycholate, 1% NP-40, et une tablette d'antiprotéase Complete, EDTA-free de Roche, pour 50 ml de RIPA.

Pour obtenir le lysat, les P60 ont été mises sur glace (4°C), puis un lavage des cellules au PBS (4°C, 2ml environ) a été réalisé. Le PBS a été retiré. 200 µl de RIPA+anti-protéase ont été ajoutés dans une P60. Les cellules ont été récoltées dans le RIPA à l'aide d'un râteau. Les 200 µl avec les cellules ont ensuite été mis dans une seconde P60. Le même processus a été reproduit dans cette seconde P60. L'objectif d'utiliser uniquement 200 µl pour 2 P60 était d'obtenir un lysat plus concentré. Le lysat obtenu a été placé dans un tube de 2ml et a été centrifugé 15000 tours pendant 10 minutes en chambre froide. Le surnageant a été récupéré et a été congelé dans l'azote liquide.

f) Dosage protéique par la méthode Folin-Lowry

Une fois le lysat obtenu, et avant la réalisation du Western-Blot, un dosage est effectué. Une gamme étalon de BSA de 0 à 80 µg est réalisée à partir de BSA à 1 mg/ml. La BSA est déposée dans des tubes à hémolyse, on ajoute 2.5mL de mélange 1 :1 EDTA – Cu²⁺ à 0.05% et Na₂CO₃ à 4%. Après ajout de 125 µL de réactif de Folin (Sigma-Aldrich ref F9252) et agitation, la réaction se développe à l'obscurité pendant 45 min, puis la densité optique est lue à 660 nm. La concentration protéique est ensuite calculée à partir de l'équation de la régression linéaire de la droite de la gamme passant par 0 selon la formule : concentration = DO / pente de la droite.

g) Anticorps utilisés

Les anticorps utilisés pour les Western-Blots sont des anticorps commerciaux (tableau 4).

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés pour les Western-Blots

Anticorps primaires utilisés pour les western-blot			
espèce	Cible	concentration	Provenance
souris	Anti-flag M2	1/1000	Sigma Aldrich
souris	Anti-tubuline bêta	1/5000	Sigma Aldrich
Anticorps secondaires utilisés pour les western-blot			
lapin	Horse Radish Peroxidase (HRP)	1/10000	Sigma Aldrich

h) Western-Blot

Du tampon de dissociation de Laemmli (Tris-HCl 62,5mM pH = 6.8, SDS 2%, Glycerol 10%, 2-mercaptoéthanol 5%, bleu de Bromophénol 0,005%) est ajouté aux extraits protéiques puis ces derniers sont chauffés à 100°C durant 10 min environ. Des gels d'acrylamide à 12% ont été réalisés. Les extraits sont déposés sur gel et les protéines séparées par migration pendant environ 1h à 40mA constant. Le transfert est réalisé à 100V constant durant 1h30 sur des membranes d'immobilon préalablement perméabilisées dans l'éthanol. Puis, les membranes sont saturées en TBS Tween 20 0,05% durant 30min pour éviter les fixations non spécifiques

et incubées durant la nuit avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation. Après plusieurs lavages en TBS-Tween 20 0,05%, les membranes sont mises en présence des anticorps secondaires couplés à la HRP (Horse Radish Peroxydase) pendant environ 2h. La révélation est réalisée avec un substrat chemiluminescent Pico (Enhanced ChemiLuminescence, Pierce), après trois lavages de 10 minutes dans 10 mL de TBS Tween 20 0,05%.

2) Localisation protéique

Toutes les étapes sont identiques jusqu'à la transfection (étapes 1a à 1d comprises). Après transfection avec Exgen 500 et incubation pendant 24 heures à 37°C, les étapes suivantes ont été effectuées. A la place des boîtes de Pétri de 60 mm, des boîtes de Pétri de 35 mm ont été utilisées car le volume cellulaire était un paramètre moins important pour l'objectif fixé dans cette partie : observer la localisation des protéines ECEL1. De plus, après les passages des P100 et lors de la préparation des P35 avant l'ensemencement, deux lamelles ont été ajoutées pour permettre l'observation en microscopie confocale.

a) Marquage immunofluorescent

La fixation et la perméabilisation ont été réalisées en salle de cultures directement avec pour chaque boîte de Pétri de 35mm

2 lavages PBS, concentration 1x, (2ml environ), puis, à -20°C, ajout de 2 mL par boîte de méthanol, conservé à -20°C. Attente de 6 minutes à -20°C. Ensuite, 5 lavages au PBS avec aspiration préalable du méthanol et ajout de PBS concomitant. A l'issue, 2mL de PBS par boîte ont été ajoutés. Les P35 ont été conservées si besoin à +4°C.

b) Anticorps primaires

Tableau 5 : Produits pour Ac I, pour une lamelle (préparation au minimum pour 5)

PBS	46,9µl
Sérum de chèvre	2,5µl
Anti-calnexine (pAB) (dilution 1/500 ^e)	0.1µl
Anti-Flag (dilution 1/100 ^e)	0.5µl
Total	50µl

Ainsi, à l'issue des lavages, 50 μl de cette solution ont été mis sur une lamelle pendant 1h à température ambiante. A l'issue, trois lavages de 5 minutes avec 200 μl d'une solution (90% PBS et 10% de sérum de chèvre) ont été réalisés pour chacune des lamelles.

c) Anticorps secondaires

Tableau 6 : Produits pour Ac II, pour une lamelle (préparation au minimum pour 5)

PBS	47,3 μl
Sérum de chèvre	2,5 μl
Alexa 488 (souris) (dilution 1/500 ^e)	0.1 μl
Cy3 (lapin) (dilution 1/500 ^e)	0.1 μl
Total	50 μl

Le même processus que précédemment a été réalisé avec la solution contenant les anticorps secondaires. Enfin, les lamelles ont été nettoyées à l'eau milliQ puis montées sur lame avec du Moviol (5 μl). Puis les lames sont observées en microscopie confocale Leica grossissement x40 et x100 à huile.

3) Protocole d'activité enzymatique

Toutes les étapes de l'expression protéique ont été réalisées jusqu'à la transfection (étapes 1a à 1d comprise). La transfection a été réalisée exclusivement au phosphate de calcium pour permettre un meilleur taux de transfection par rapport à l'Exgen 500. A l'issue de la transfection, une incubation de 24 heures minimum a été observée à 37°C. Les étapes suivantes ont été effectuées.

a) Lyse au CHAPS

Le lysat n'a pas été produit avec le tampon précédemment décrit (RIPA+anti-protéase) car l'objectif de cette partie est de mesurer une activité enzymatique. Il nous faut donc obtenir les protéines ECEL1 tout en gardant cette activité. Pour cela, un tampon a été employé : le CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate). Le RIPA est notamment composé de NP-40 et de sodium deoxycholate, détergents qui vont détériorer la protéine et ne pas permettre d'étudier son activité enzymatique. Le CHAPS, au contraire, va permettre cette analyse.

En salle de cultures, pour 2P60 systématiquement, un lavage au PBS a été effectué (3mL), 1mL de trypsine a été ajouté. Une incubation de 3 minutes a été faite à 37°C. A l'issue, 1mL de milieu a été ajouté par P60 et les cellules, le milieu et la trypsine ont été mis pour 2p60 dans un Falcon de 15 ml. Celui-ci est ensuite centrifugé à 1000 tours par minutes pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré et 1mL de PBS froid (4°C) a été ajouté. Le tube a été à nouveau centrifugé pendant 5 minutes à 1000 tours par minute. Le surnageant est également retiré puis ont été ajoutés 1mL de tampon Tris-Hcl 150mM, pH 7,40, NaCl 150mM. Le surnageant est retiré, puis est ajouté 100 µl de solution Tris-Hcl 150mM, pH 7,40, NaCl 150mM – CHAPS 0,5%. La solution a été mélangée au minimum 5 fois par aspiration-refoulement et a été transférée dans un tube de 2mL. Celui-ci est placé dans la glace (4°C) pendant 10 minutes. Le tube a été ensuite centrifugé pendant 5 minutes, 15000 tours par minutes, en chambre froide. Le surnageant est retiré et congelé dans l'azote.

b) Activité enzymatique

Selon le protocole de lysat-CHAPS, 100 µl sont obtenus pour 2P60 de cultures cellulaires. Au minimum 8P60 ont été systématiquement réalisées pour une expérience avec un variant et 8P60 pour pouvoir comparer avec le WT. Ainsi, 400 µl de lysat étaient obtenus pour un variant et 400 µl pour le WT.

Avec le lysat obtenu, 50 µl seront utilisés pour un test d'activité enzymatique direct et 50 µl pour un test avec ajout de Thiorphan, inhibiteur spécifique des métalloprotéases. Les résultats ont été produits en triplicat. 150 µl (3*50) étaient donc utilisés pour les trois tests directs, 150 µl (3*50) pour les trois tests avec Thiorphan. Il restait ainsi 100 µl pour le variant et pour le WT pour effectuer les contrôles : d'une part, le dosage protéique par la méthode de Folin-Lowry et d'autre part un Western-Blot avec ECEL1 et la Tubuline.

Le test enzymatique a été ensuite réalisé. Dans des tubes de 2 ml ont été ajoutés : 110 µl de tampon [Tris-Hcl 150mM, pH 7,40, NaCl 150mM], 50 µl de lysat, 2 µl de peptide chromogène [Z-Gly-Gly-Leu-pNA] de Peptide Institute, Inc., Osaka, Japon. Le clivage du peptide par l'enzyme ECEL1 va modifier l'absorbance du milieu. Le clivage s'effectue au niveau de la région nitroanilide. A cette solution, dans un tube sur deux, 3 µl de Thiorphan, préalablement incubés à 37°C pendant 5 minutes avec le tampon [Tris-Hcl 150mM, pH 7,40, NaCl 150mM] ont été ajoutés.

Les tubes de 2ml ainsi constitués ont été placés dans le noir pendant 30 minutes.

L'absorbance a été lue à 405 nm (BioRad SmartSpec-plus).

B) Etude clinique

1) Données cliniques

Un cahier clinique (annexe) a été créé afin de recueillir les données cliniques des patients dont les mutations ont été retrouvées au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble. Le cahier clinique a été transmis aux praticiens prescripteurs de l'analyse moléculaire (médecins généticiens et pédiatres).

2) Score de sévérité

Les données cliniques et l'appréciation des photos des patients montraient un degré de variabilité de la sévérité de l'atteinte entre les familles et dans une moindre mesure au sein d'une même fratrie. Cette variabilité phénotypique des patients portant des mutations *ECELI* a déjà été relevée dans la littérature (Dieterich et al, 2013 ; McMillin et al, 2013). Nous nous sommes intéressés à quantifier cette variabilité de la sévérité phénotypique et à rechercher un lien entre la sévérité phénotypique et la nature des mutations identifiées.

Suite aux données recueillies, à l'instar d'un score de sévérité mis en place pour la maladie de Gaucher (maladie rare, autosomique récessive) (Weinreb et al., 2010), une cotation totale de 0 à 80 est proposée pour l'ensemble de huit domaines de l'arthrogrypose distale liée à *ECELI* (tableau 7). Le score mis en place pour la maladie de Gaucher a été établi selon les organes fréquemment impliqués et les signes cliniques, biologiques et d'imagerie fréquemment relevés pour chaque organe (score en annexe). Pour chaque signe, un nombre de points a été attribué. Dans le cas d'*ECELI*, les huit items ont été sélectionnés en accord avec les critères de faisabilité (Bombardier et al., 1982). Plus le score est élevé, plus la sévérité est importante. Les huit domaines sont : les atteintes de l'étage supérieur (face, ORL) (sur dix points), les atteintes articulaires des membres (sur dix points), les atteintes articulaires du tronc (sur dix points), les atteintes respiratoires (sur dix points), l'atrophie musculaire (sur dix points), les atteintes ante ou périnatales (sur dix points), les atteintes fonctionnelles globales (sur dix points), l'évolution après prise en charge (sur dix points) (tableau 7). Les critères de reproductibilité et de validité (Bombardier et al., 1982) ne sont pas mis en place dans cette première phase dont l'objectif est la mise au point de l'outil « score de sévérité ».

Tableau 7 : Items du score de sévérité *ECELI*

Numéro d'item		
1	Atteintes de l'étage supérieur (face, ORL)	/10
2	Atteintes articulaires du tronc	/10
3	Atteintes articulaires des membres	/10
4	Atteintes respiratoires	/10
5	Atrophie musculaire	/10
6	Atteintes anténatales et périnatales	/10
7	Atteintes fonctionnelles globales	/10
8	Evolution après prise en charge	/10
TOTAL		/80

Pour chaque item, j'ai déterminé les signes cliniques et le degré d'atteinte. J'ai attribué un nombre de points pour la présence de ces signes (tableau 8).

Les différents items ne correspondent pas tous à des atteintes cliniques d'organes. En effet, l'approche fonctionnelle (comme le périmètre de marche) est une donnée essentielle pour la qualité de vie des patients avec arthrogrypose. De même l'impact sur l'environnement (familial) est pris en compte dans l'item 8 (évolution après prise en charge). Si ce score ne remplace pas les scores mis en place par les praticiens de médecine physique et réadaptation pour évaluer l'atteinte fonctionnelle et la qualité de vie, il intègre certains de ces paramètres pour évaluer la sévérité.

Tableau 8 : Détail de la cotation des 8 items Abréviations : LA : limitation articulaire / SRP : syndrome restrictif pulmonaire / CPT : capacité pulmonaire totale / RCIU retard de croissance intra-utérin / IMG : interruption médicale de grossesse.

Item									
1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulatoires (+1pt)	10
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		10
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		10
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement(s) associé(s) (+2pts)			10
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<-2DS) (+1pt)					10
6	RCIU (+1pt)	diminution des mouvements foetaux (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement par le siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	10
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte de la motricité fine (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					10
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				10

Concernant l'item 1 : pas de cumul entre ptosis unilatéral et ptosis bilatéral ; les autres manifestations ophtalmologiques excluent l'anomalie de Duane ainsi que la pseudo-exophtalmie.

Concernant l'item 2 : pas de cumul entre scoliose modérée et majeure (l'angle de Cobb est mesuré sur la radiographie).

Pour l'item 3 : Les atteintes des pieds comprennent les pieds valgus convexes, les pieds varus, et les chevauchements au niveau des orteils. L'évaluation de la scoliose est effectuée avec l'angle de Cobb. Est prise en compte la présence ou non de pterygia et s'il s'agit d'atteinte unilatérale ou bilatérale pour les coudes, les épaules et les genoux.

Pour l'item 4 : pas de cumul entre le syndrome restrictif pulmonaire léger, modéré et sévère. Pas de cumul entre prise en charge avec et sans appareillage. Les traitements associés comprennent les corticoïdes, bronchodilatateurs mais également traitements faisant suite aux infections bronchiques.

Pour l'item 5 : l'atrophie musculaire est déterminée par le clinicien, en comparaison avec des enfants du même âge en bonne santé.

Pour l'item 6 : l'accouchement par césarienne peut faire suite à une menace d'accouchement prématuré.

Pour l'item 7 : le périmètre de marche est évalué selon l'âge du patient. La prise en charge est multidisciplinaire : kinésithérapie, ergothérapie, orthophonie avec des séances régulières et rapprochées. La motricité fine comporte, selon l'âge, l'écriture, les gestes pour l'habillement et autres gestes du quotidien. La douleur résiduelle est après efforts.

Pour l'item 8 : l'absence d'amélioration correspond à une stagnation du périmètre de marche ainsi que de l'angle de Cobb après prise en charge. Le ressenti familial et le retentissement psychologique sont indiqués par le patient et sa famille. Le suivi par un psychologue et/ou un psychiatre pour le patient et/ou les parents est considéré comme un retentissement psychologique sur le patient et/ou un ressenti familial difficile. Le ressenti familial difficile comprend également le retentissement sur l'activité professionnelle des parents (temps partiel ou parent au foyer en vue de s'occuper de l'enfant).

Résultats

A) Analyse biologique : mécanismes physiopathologiques

1) Expression protéique

L'expression protéique et la localisation de la mutation d'ECEL1 p.Cys760Arg ont déjà été testées (Dieterich et al., 2013) et ne montraient pas de différence avec les caractéristiques de la protéine WT. Nous allons donc présenter les résultats obtenus avec les trois variants faux-sens : p.Arg702Leu, p.Gln318Pro, p.Leu165Pro. Les résultats présentés (figure 8) correspondent à la moyenne de quatre expériences différentes (depuis les cultures cellulaires jusqu'à l'obtention des western-blots). L'intérêt de tester les deux lignées était d'obtenir un taux de transfection meilleur avec l'une d'entre elle afin de l'utiliser pour le dosage protéique. Ceci a été confirmé avec les cellules HEK-293 (Figure 7). L'expression la plus importante en Western-Blot a été obtenue avec les cellules HEK-293.

Avant la réalisation du Western-Blot, les lysats obtenus par la méthode avec du RIPA ont été dosés par la méthode de Folin-Lowry pour charger les Western-Blots avec la même quantité de protéine. Ce dosage est ensuite vérifié par la quantification avec une normalisation à la tubuline (Figures 7 et 8).

La protéine ECEL1 est révélée par une bande à 90 kDa (Figure 7), le contrôle par la tubuline est représenté par une bande à 55 kDa (Figure 7). La quantification (rapport ECEL1/tubuline) permet de visualiser l'absence de modification de l'expression entre le WT et les trois variants. Un test de Student montre qu'il n'y a pas de différence significative.

Au total, l'expression des variants p.Arg702Leu, p.Gln318Pro, p.Leu165Pro n'est pas altérée (Figure 8).

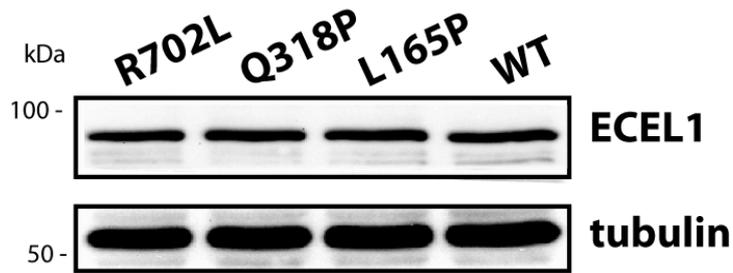


Figure 7 : Western-Blot avec à 90kDa la présence d'une bande pour chaque lysat révélée par anticorps anti-flag, l'anticorps utilisé est l'Ac anti-flag M2. Vers 55kDa, présence de 4 bandes également d'intensité égale. L'anticorps utilisé est l'AC anti-tub2.1.

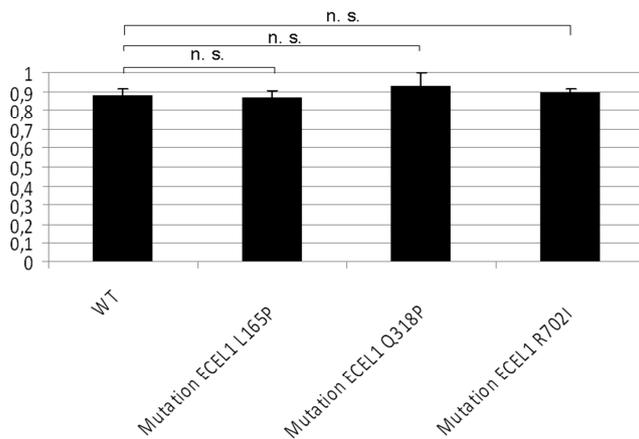


Figure 8 : Quantification anticorps anti-flag/anticorps anti-tubuline. Moyenne (n=4), erreur-type mesurée à : WT : 0,04 ; L165P : 0,07 ; Q318P : 0,03 et R072L : 0,02. Le test statistique t-test entre le WT et chaque variant ne montre pas de différence significative ($p > 0,05$). N.S. : Non Significatif.

2) Localisation protéique

La localisation de la protéine ECEL1 a été étudiée par marquage immunofluorescent sur des cellules COS-7. Ces dernières présentent l'intérêt d'avoir un réticulum endoplasmique étendu. ECEL1 est une protéine présente au niveau du réticulum, ce type de lignée cellulaire est donc adapté pour l'étude. Le marquage de la protéine ECEL1 est réalisé à l'aide d'anticorps Anti-flag, il est représenté en vert (images de gauche de la figure 9). Un marquage d'une protéine endogène du réticulum a été choisi : il s'agit de la calnexine (en rouge, images centrales de la figure 5). La superposition des deux images donne une image jaune s'il y a une colocalisation (images de droite de la figure 9). Le marquage de la calnexine correspond aux images classiques décrites pour le réticulum endoplasmique de cellules COS-7 (en dentelle autour du noyau). Il en est de même pour ECEL1.

Si l'on compare les images du WT et des trois variants (la mutation p.Cys760Arg a déjà été étudiée (Dieterich et al., 2013) et ne montrait pas de différence de la localisation), la localisation d'ECEL1 n'est pas modifiée par les variants. Les immunofluorescences réalisées montrent également une colocalisation entre la protéine du réticulum endoplasmique (calnexine) et ECEL1. Les variants p.Leu165Pro, p.Gln318Pro et p.Arg702Leu n'altèrent pas *in vitro* la localisation dans le réticulum endoplasmique de la protéine ECEL1 (Figure 9).

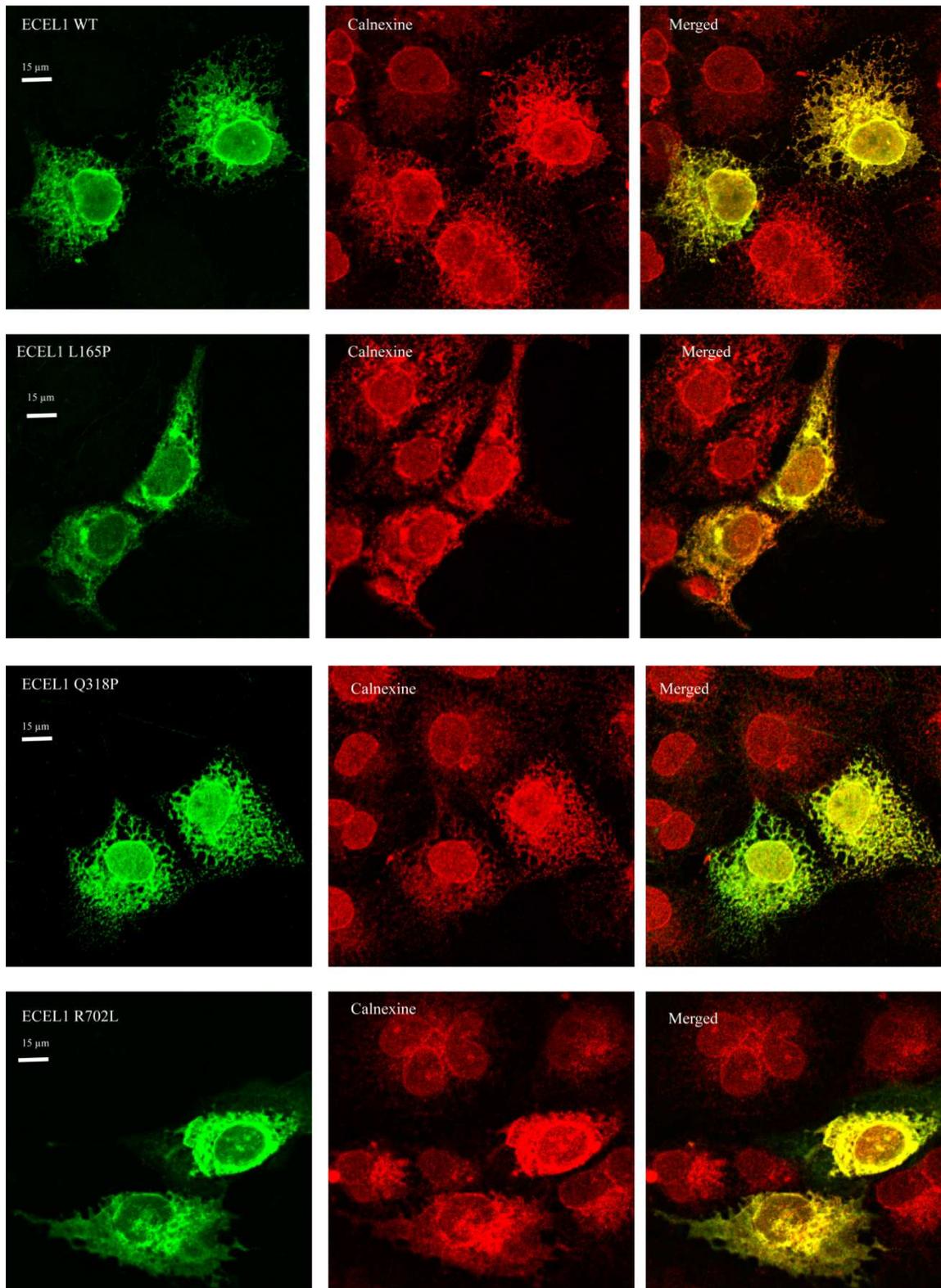


Figure 9 : Marquage avec Ac anti-flag (ECEL1, en vert) et Ac anti-calnexine (en rouge). Les images de droite correspondent à la superposition des deux premières images. On observe une colocalisation entre les variants et la protéine endogène du réticulum endoplasmique. Les variants p.Leu165Pro, p.Gln318Pro et p.Arg702Leu n'altèrent pas in vitro la localisation dans le réticulum endoplasmique de la protéine ECEL1.

3) **Activité enzymatique**

Un test de l'activité enzymatique de la protéine ECEL1 n'existe pas à ce jour. L'étude cherche à mettre en évidence une modification de l'activité enzymatique. Par analogie avec les mutations d'épissage et non-sens, l'hypothèse est celle d'une perte ou d'une forte diminution de cette activité pour expliquer un mécanisme physiopathologique par perte de fonction. A l'instar de tests réalisés pour des enzymes de la même famille, ce test est mis au point.

a) **Etude de l'activité de p.Cys760Arg**

La mutation p.Cys760Arg est utilisée comme « contrôle positif » du test enzymatique créé. En effet, l'hypothèse la plus vraisemblable est une perte ou une forte diminution de l'activité enzymatique dans ce cas. Les résultats suivants correspondent à la moyenne de 4 expériences réalisées distinctement, et pour chaque expérience des mesures en triplicat. Une expérience correspond à une phase depuis la culture cellulaire jusqu'à l'obtention du lysat (avec du CHAPS) et test enzymatique.

De façon systématique, les tests sont contrôlés par un dosage protéique (méthode de Folin-Lowry) et par un Western-Blot. Ces contrôles permettent de vérifier la présence de la protéine ECEL1 dans le lysat, en quantité équivalente entre le WT et les mutants.

Ont été systématiquement testés, les activités de lysat de Hek 293 non transfectées (NF), le lysat des mêmes cellules transfectées avec ECEL1 (WT) et le lysat des mêmes cellules transfectées avec ECEL1 (WT) plus du Thiorphan. Le Thiorphan est un inhibiteur spécifique des métalloprotéases, l'activité observée doit donc être abaissée fortement après ajout de cet inhibiteur. Il s'agit d'un contrôle de spécificité. Enfin, est étudié également le lysat avec le mutant choisi et le lysat avec le mutant plus le Thiorphan.

Nous avons effectué la moyenne des résultats obtenus, et nous avons normalisé la mesure par rapport au WT dont l'activité a été arbitrairement fixée à 1, avec un écart-type de 0. Les résultats de ces moyennes, l'écart-type ainsi que l'erreur-type sont mentionnés dans le tableau 9.

Un test statistique de Student a été réalisé entre les différentes moyennes.

A l'issue des 4 expériences, les résultats obtenus montrent (figure 10):

- Une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) entre le WT et les cellules non transfectées (NF)

- Une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) entre le WT avec et sans Thiorphan
- Une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) entre le WT sans Thiorphan et le mutant p.C760R sans Thiorphan est observée.
- > Ceci permet de déduire que l'activité observée provient de l'enzyme ECEL1, qui est en surexpression et qui est inhibée par le Thiorphan. Par ailleurs, l'activité de p.Cys760Arg est fortement abaissée.

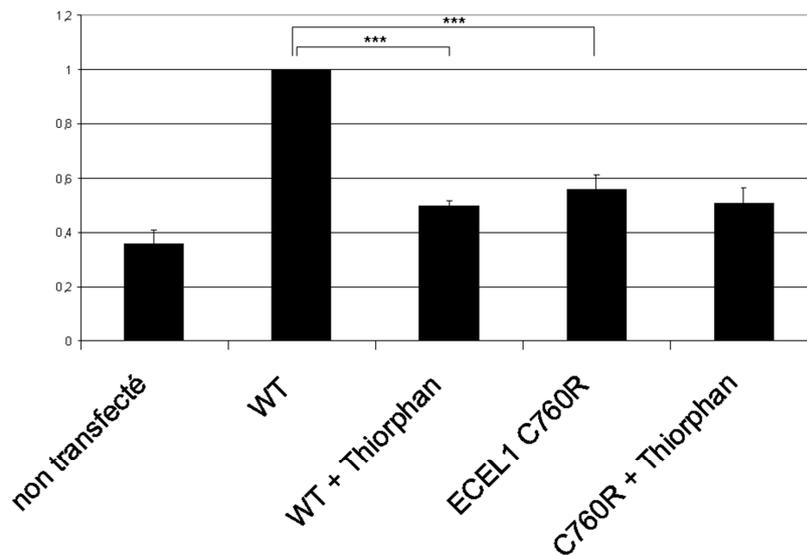


Figure 10 : Rapport de l'absorbance entre le WT et les cellules non transfectées, WT avec thiorphan et la mutation p.Cys760Arg de la protéine ECEL1 avec et sans Thiorphan. Moyenne (n=4) des rapports. Le test de Student entre le WT avec et sans Thiorphan montre une différence significative (***) : $p < 0,001$), ainsi qu'entre le WT et la protéine avec la mutation p.Cys760Arg.

Tableau 9 : Résultats des essais, moyenne, écart-type et erreur-type pour la mutation p.Cys760Arg

Rapport	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	moyenne	écart-type	erreur-type
Non transfecté	0,28	0,43	0,47	0,28	0,36	0,09	0,05
WT	1	1	1	1	1	0	0
WT + Thiorphan	0,51	0,52	0,52	0,45	0,50	0,03	0,01
ECEL1 C760R	0,5	0,55	0,70	0,49	0,56	0,09	0,05
C760R + Thiorphan	0,5	0,44	0,65	0,45	0,51	0,09	0,05

b) Etude de l'activité de p.Leu165Pro, p.Gln318Pro et p.Arg702Leu

Le même protocole que précédemment est appliqué pour les trois variants p.Leu165Pro, p.Gln318Pro et p.Arg702Leu (Figure 11, tableau 10).

On ne constate pas de diminution de l'activité enzymatique pour ces protéines. L'activité est même augmentée par rapport au WT ($p < 0,05$) pour p.Leu165Pro, mais la différence statistique n'est pas aussi importante que dans les expériences précédentes. La différence entre le WT et les trois variants et leurs homologues avec Thiorphan est statistiquement significative ($p < 0,001$).

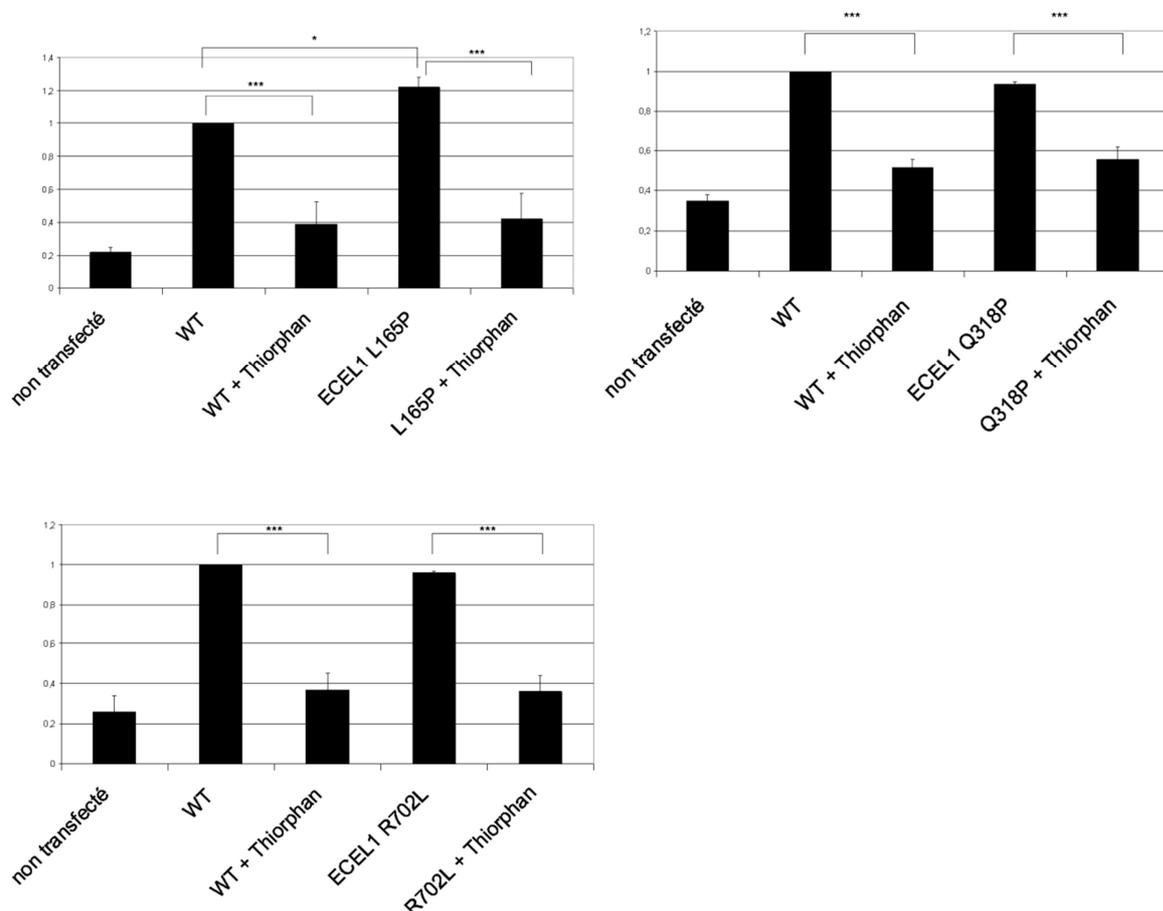


Figure 11 : En haut à gauche : Rapport de l'absorbance entre le WT et les cellules non transfectées, WT avec Thiorphan, p.Leu165Pro et p.Leu165Pro avec Thiorphan. Moyenne (n=3) des rapports. Le test de Student entre le WT avec et sans Thiorphan montre une différence significative (*** : $p < 0,001$), ainsi qu'entre p.Leu165Pro avec et sans Thiorphan. Une augmentation entre le WT et p. L165P est significative (* : $p < 0,05$) également.

En haut à droite : Rapport de l'absorbance entre le WT et les cellules non transfectées, entre le WT avec et sans Thiorphan et le variant p.Gln318Pro dans et avec Thiorphan. Moyenne

(n=3) des rapports. Le test statistique de Student entre le WT avec et sans Thiorphan montre une différence significative (***) : $p < 0,001$) ainsi qu'entre le variant p.Gln318Pro avec et sans Thiorphan. Il n'y a pas de différence significative entre WT et p.Gln318Pro.

En bas à gauche : Rapport de l'absorbance entre le WT et les cellules non transfectées, WT avec et sans thiorphan, le variant p. R702L sans et avec thiorphan. Moyenne (n=3) des rapports. Le test statistique de Student entre le WT avec et sans thiorphan montre une différence significative (***) : $p < 0,001$) ainsi qu'entre le variant p. R702L avec et sans thiorphan. Il n'y a pas de différence significative entre le WT et p. R702L.

Tableau 10 : Résultats des essais, moyenne, écart-type et erreur-type pour la mutation p.Leu165Pro, p.Gln318Pro et p.Arg702Leu

rapport	Essai 1	Essai 2	Essai 3	moyenne	écart-type	erreur-type
Non transfecté	0,21	0,16	0,29	0,22	0,06	0,03
WT	1	1	1	1	0	0
WT + Thiorphan	0,23	0,28	0,66	0,39	0,23	0,13
ECEL1 L165P	1,27	1,32	1,09	1,22	0,11	0,06
L165P + Thiorphan	0,3	0,25	0,73	0,42	0,26	0,15

rapport	Essai 1	Essai 2	Essai 3	moyenne	écart-type	erreur-type
Non transfecté	0,28	0,36	0,41	0,35	0,06	0,03
WT	1	1	1	1	0	0
WT + Thiorphan	0,45	0,61	0,50	0,52	0,08	0,04
ECEL1 Q318P	0,90	0,96	0,96	0,94	0,03	0,01
Q318P + Thiorphan	0,43	0,64	0,61	0,56	0,11	0,06

rapport	essai1	essai2	essai3	moyenne	écart-type	erreur-type
Non transfecté	0,09	0,39	0,30	0,26	0,15	0,08
WT	1	1	1	1	0	0
WT + Thiorphan	0,20	0,49	0,42	0,37	0,14	0,08
ECEL1 R702L	0,95	0,98	0,96	0,96	0,01	0,01
R702L + Thiorphan	0,20	0,49	0,38	0,36	0,14	0,08

B) Analyse clinique : spectre de sévérité

1) Données cliniques :

Nous présentons tout d'abord les données recueillies concernant les patients avec mutations faux-sens d'*ECELI* identifiées au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire et lors des recherches menées par Dieterich et collaborateurs. Ensuite, nous présentons les données recueillies concernant les mutations non-sens et d'épissage également identifiées au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire et lors des recherches menées par Dieterich et collaborateurs. Nous avons récapitulé l'ensemble des mutations et des familles (tableau 11). Nous donnons également une illustration des patients avec mutations faux-sens et mutations non-sens et d'épissage (Figure 12).

Tableau 11 : liste des familles et des mutations

Famille	Mutations ADN	Mutations Protéine
1	c.953A>C	p.Gln318Pro
	c.1059+2T>A	-
2	c.494T>C	p.Leu165Pro
3	c.2278C<T	p.Cys760Arg
4	c.1059+1G>C	-
	c.1407+5G>C.	-
5	c.1143delC	-
	c.1685+1G>A	-
6	c.1184+2T>A	p.Trp719*
7	c.1649C>G	p.Ser550*
8	c.1791C>T	p.Arg333*
	c.3202G>A	p.Trp490*
9	c.874delG	p.Val292Cysfs51*
10	c.1685+1G>T	-
11	c.966+1G>A	-

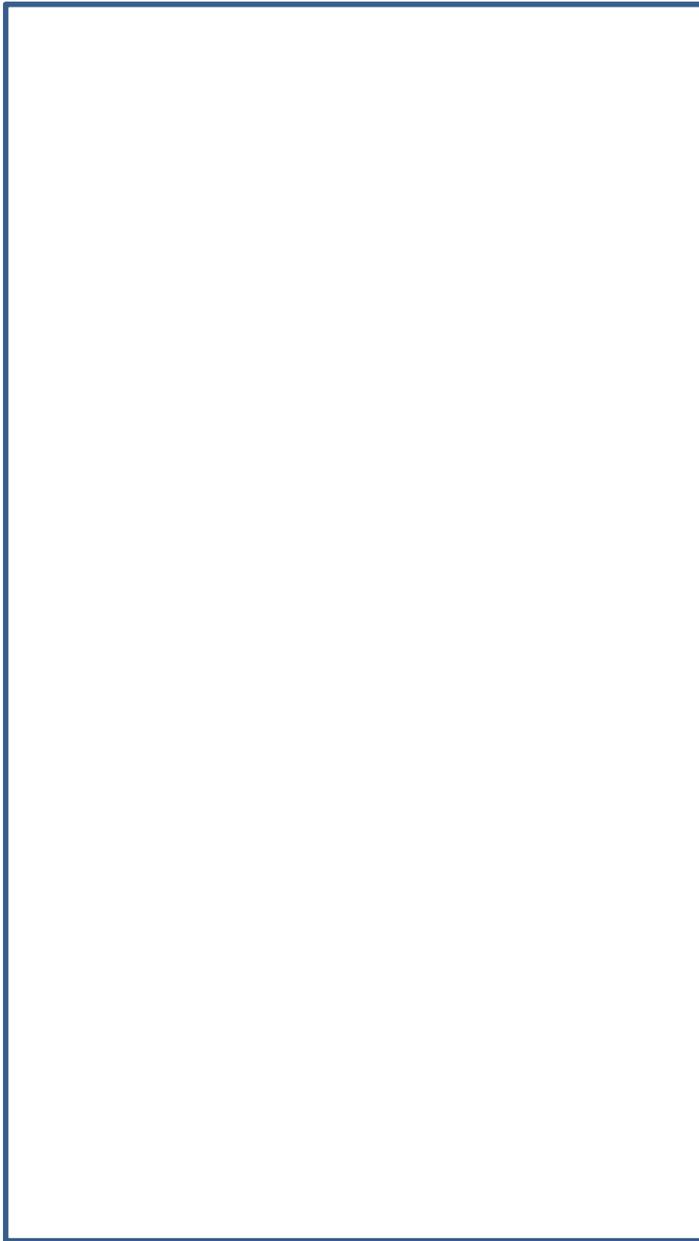
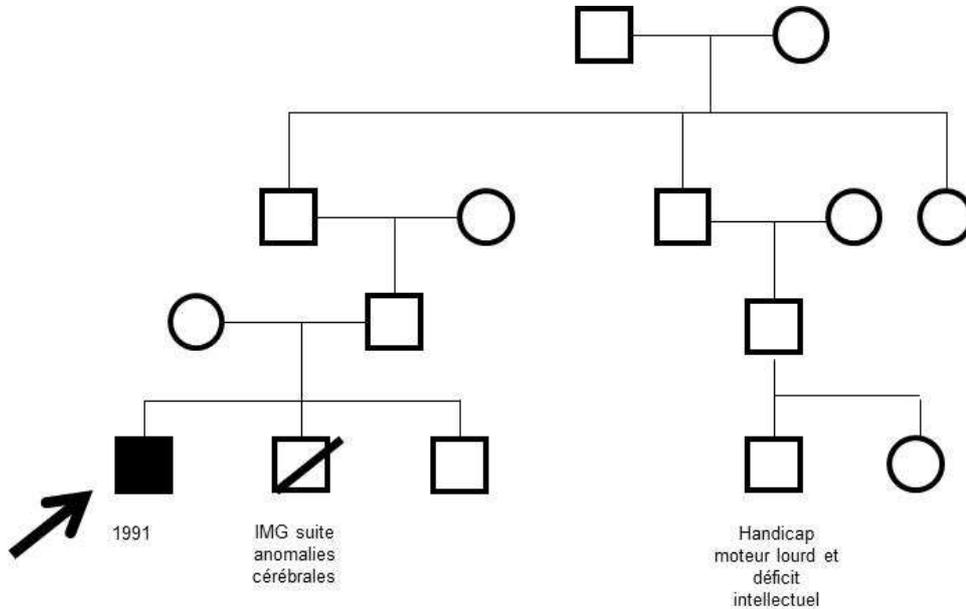


Figure 12 : En haut : deux patients avec mutations faux-sens familles 1 (p.Gln318Pro) et 3 (p.Cys760Arg). En bas : deux patients avec mutations non-sens et d'épissage : familles 5 (c.1143delC c.1685+1G>A) et 6 (c.1184+2T>A).

a) Patients avec mutation(s) faux-sens

Famille 1 : La mutation retrouvée est p.Gln318Pro (c.953A>C). Cette mutation est associée à une mutation c.1059+2T>A qui abolit le site d'épissage donneur de l'intron 5, reconnue pathogène par analyse *in silico*.



Les deux mutations ont été héritées pour l'une de la mère et pour l'autre du père. Les deux parents sont asymptomatiques. Un cousin présente un handicap moteur sévère, sans toutefois de mise en cause d'*ECELI* à ce jour (la probabilité étant faible, il n'y a pas de consanguinité mentionnée).

Concernant le patient, l'accouchement a eu lieu à 35 SA suite à une menace d'accouchement prématuré. Il n'y a pas de cause connue de cette menace d'accouchement prématuré. A la naissance, une prise en charge adaptée a dû être effectuée avec massage cardiaque et ventilation au masque. Les atteintes neuromusculaires sont majeures, tant au niveau de la posture et du rachis (cyphoscoliose majeure, avec port de corset puis arthrodeuse vertébrale à l'âge de 16 ans) que des membres inférieurs et supérieurs (camptodactylie bilatérale, atteinte des index, limitations articulaires des coudes et des épaules, ptérygia marqués au niveau des doigts, opérés, ainsi qu'au niveau des coudes, luxation congénitale de hanche, pieds valgus convexes, limitation de la flexion active des genoux, le patient ne peut s'accroupir). La face est également atteinte avec présence d'un ptosis bilatéral et d'une lagophtalmie, ainsi que d'une anomalie de Duane. Le patient souffre également d'un syndrome restrictif pulmonaire. Les limitations articulaires sont présentes à tous les niveaux avec des ptérygia marqués des membres supérieurs. Sur le plan fonctionnel, le périmètre maximal de marche est d'un

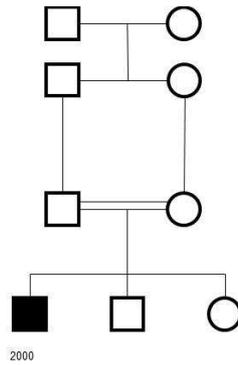
kilomètre. La position debout est tenue quelques heures. La prise en charge multidisciplinaire depuis la naissance, se poursuivant dans l'enfance et pendant l'adolescence comprend de la kinésithérapie, de l'ergothérapie ainsi que des adaptations concernant l'atteinte pulmonaire et la cyphoscoliose. Des améliorations notables sont remarquées au niveau des limitations articulaires et de la marche. Le retentissement sur la vie personnelle et familiale est majeur avec prise en charge psychologique et psychiatrique.

Les examens complémentaires effectués dont la biopsie et l'EMG présentent des anomalies non spécifiques.

1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	9
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		9
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		10
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			10
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<-2DS) (+1pt)					10
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	5
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					8
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP(+2pts)	retentissement psychologique sur le patient(+2pts)				6

Le score de sévérité d'ECELLI avec les données fournies est de 67.

Famille 2 : La mutation retrouvée est p.Leu165Pro (c.494T>C). Elle est à l'état homozygote.



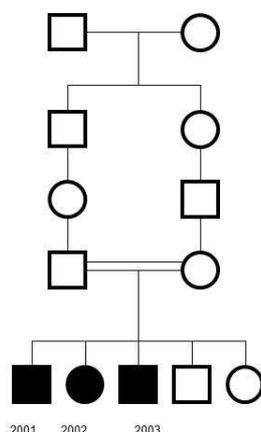
Pas d'éléments notoires en anténatal ni en périnatal. Les informations obtenues ne sont cependant pas complètes.

Les atteintes articulaires sont présentes au niveau du tronc (scoliose thoraco-lombaire avec port de corset et arthrodèse) et des membres (interphalangiennes proximales en « griffe », atteinte des index, limitation des poignets, limitation de la flexion active des genoux). Les atteintes de la face sont présentes (anomalie de Duane). L'amyotrophie est présente au niveau des membres inférieurs. Un syndrome pulmonaire restrictif est sévère (CPT<50%). Celui-ci est amélioré par la prise en charge (kinésithérapique et médicamenteuse). Au niveau fonctionnel, l'enfant a une autonomie importante. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est identifié par un suivi psychologique des parents.

1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	6
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		9
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		10
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			7
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<-2DS) (+1pt)					9
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	3
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					7
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP(+2pts)	retentissement psychologique sur le patient(+2pts)				0

Le score de sévérité d'ECELI avec les données fournies est de 51.

Famille 3 : La mutation retrouvée est p.Cys760Arg (c.2278C<T).



La description suivante concerne l'ensemble de la fratrie, sans distinction précise des signes pour l'un ou l'autre des enfants. En effet, les atteintes se situent au même niveau avec un degré quasi-identique de sévérité. Certains signes cliniques diffèrent (par exemple hyperlordose pour le frère aîné, scoliose pour la sœur), mais ne modifie pas l'évaluation. Un seul score de sévérité sera donc produit pour les trois enfants.

Pas d'éléments notoires en anténatal ni en périnatal. Les informations obtenues ne sont cependant pas complètes.

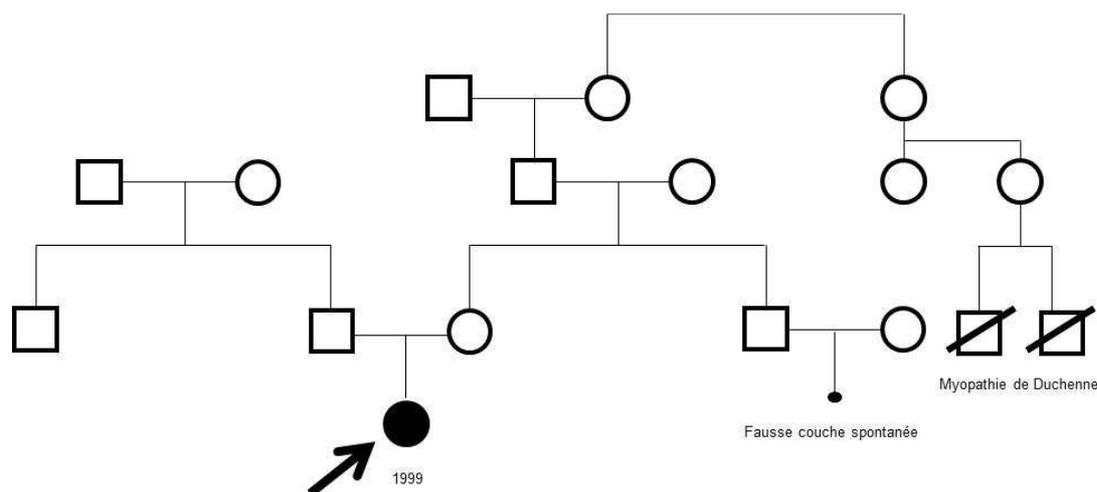
Les atteintes articulaires sont présentes au niveau du tronc (hyperlordose lombaire / scoliose), des membres (interphalangiennes fixées en flexion, pouces adductus, limitation active des genoux). La face est également atteinte (ptosis unilatéral). L'amyotrophie, importante, est présente au niveau des membres supérieurs et inférieurs. Un syndrome pulmonaire restrictif est relevé. La prise en charge par kinésithérapie permet une stabilité des atteintes. Au niveau fonctionnel, les enfants ont une autonomie pour la marche. Il existe des difficultés de langage avec prise en charge orthophonique. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est important.

Item									
1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	7
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		9
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	imitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		9
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			8
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<-2DS) (+1pt)					6
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	5
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					10
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				6

Le score de sévérité d'ECELI avec les données fournies est de 60.

b) Patients avec mutations non—sens et d'épissage

Famille 4 : Les mutations retrouvées sont deux mutations d'épissage c.1059+1G>C et c.1407+5G>C.



Antécédent de myopathie de Duchenne dans la famille du côté des grands-parents maternels.

En anténatal, on note la présence d'un retard de croissance intra-utérin. Les membres inférieurs sont observés en flexion lors de la troisième échographie. Détresse respiratoire à la naissance.

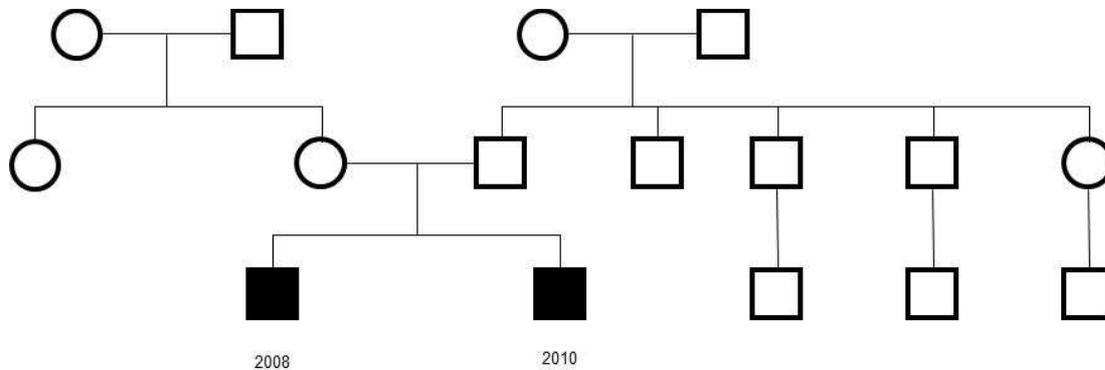
Les atteintes articulaires sont présentes au niveau du tronc (scoliose), des membres (camptodactylie, atteinte des index, limitation bilatérale des coudes, des épaules, pieds valgus convexes, limitation active des genoux). Au niveau de la face un ptosis bilatéral, une asymétrie faciale et un palais ogival sont présents. L'amyotrophie, légère à modérée, est présente au niveau des membres supérieurs et inférieurs. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie n'est plus nécessaire. Au niveau fonctionnel, l'autonomie est totale.

Les examens complémentaires (biopsie, emg, IRM cérébrale) n'évoquaient aucun signe spécifique.

1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	3
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		9
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		9
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			6
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<2DS) (+1pt)					6
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	6
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					3
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				0

Le score de sévérité d'ECEL1 avec les données fournies est de 42.

Famille 5 : Les mutations retrouvées sont c.1143delC et c.1685+1G>A, l'une héritée du père et l'autre de la mère. Les parents sont asymptomatiques.



Il n'y a pas d'antécédent notable.

La sévérité est différente entre les deux enfants atteints. Nous décrirons les atteintes de chaque enfant.

Concernant l'aîné, en anténatal, une diminution des mouvements fœtaux est perçue lors du premier trimestre, présence d'un oligo-amnios. A la naissance, par césarienne, épisode de détresse respiratoire avec prise en charge par ventilation au masque.

Les atteintes articulaires sont présentes au niveau du tronc (hyperlordose, scoliose, mise en place d'un corset) et des membres (camptodactylie, atteinte des index, limitation bilatérale des coudes, des épaules, pieds valgus convexes, limitation active des genoux, pterygia modérés au niveau des coudes). Des atteintes de la face sont présentes (succion-déglutition). L'amyotrophie est présente au niveau des membres inférieurs. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie a été importante. Au niveau fonctionnel, l'enfant est autonome pour l'habillage en dehors des gestes fins. Au niveau scolaire, il y a une bonne intégration. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est important.

Item									
1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulatoires (+1pt)	4
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb < 35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb > 35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions > 1 (+1pt)		8
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pt)	LA des épaules (+1pt)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		8
4	SRP léger CPT > 70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT < 60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			3
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (< -2DS) (+1pt)					6
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	7
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					6
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				2

Le score de sévérité d'ECEL1 avec les données fournies est de 43.

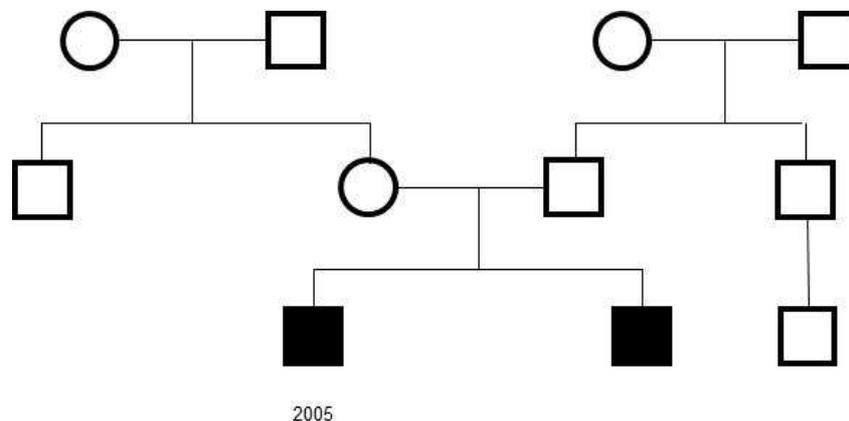
Concernant l'enfant né en 2010, en anténatal, un oligo-amnios est présent lors de l'échographie du second trimestre mais se normalise lors de l'échographie suivante. A la naissance, il n'y a pas d'élément notable.

Les atteintes sont présentes au niveau des membres (camptodactylie, atteinte des index, limitation bilatérale des coudes, des épaules, limitation active des genoux) et de la face (ptosis). Il n'y a pas d'atteinte du tronc. L'amyotrophie n'est pas présente. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. On note par ailleurs quelques variants morphologiques cliniques : mamelon surnuméraire, trigonocéphalie, sourcils arqués, angiome du front, racine du nez peu marquée. La prise en charge par kinésithérapie a été modérée. Au niveau fonctionnel, l'enfant est autonome. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est important (prise en charge psychologique et aménagement du temps de travail pour les parents).

Item									
1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	4
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		0
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		2
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			0
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<2DS) (+1pt)					6
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	2
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					2
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				2

Le score de sévérité d'ECEL1 avec les données fournies est de 18.

Famille 6 : Les mutations retrouvées sont W719X et c.1184+2T>A, l'une héritée du père et l'autre de la mère. Les parents sont asymptomatiques.



Il n'y a pas d'antécédent notable.

La sévérité est différente entre les deux enfants atteints. Nous n'avons pu recueillir les informations cliniques que du premier enfant, né en 2005.

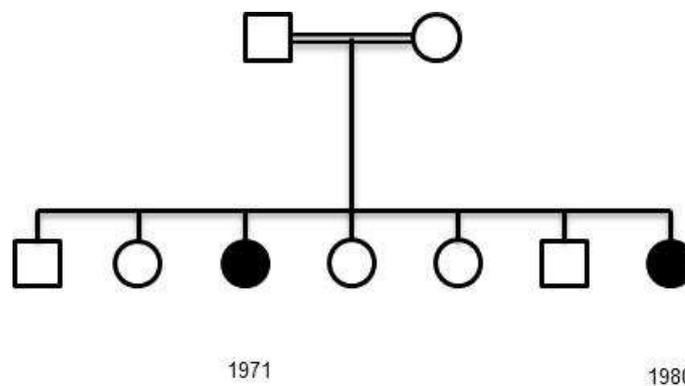
En anténatal, présence d'un hydramnios à la naissance sans retentissement en période périnatale.

Les atteintes sont présentes au niveau des membres (camptodactylie, flexion des poignets limitée, limitation active des genoux) et de la face (succion-déglutition). L'amyotrophie n'a pas été relevée. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie a été modérée et les améliorations importantes tant au niveau de la marche que de la motricité fine. Au niveau fonctionnel, l'enfant est autonome. Au niveau scolaire, il y a une bonne intégration.

1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	1
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		0
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		6
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			0
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<2DS) (+1pt)					6
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	3
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					5
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				2

Le score de sévérité d'ECEL1 avec les données fournies est de 23.

Famille 7 : La mutation retrouvée en deux exemplaires est c.1649C>G, un exemplaire est hérité du père et l'autre de la mère. Les parents sont asymptotiques.



Il n'y a pas d'antécédent notable. Les parents sont consanguins.

La sévérité est équivalente entre les deux soeurs atteintes.

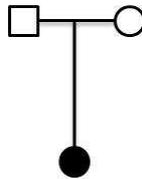
En anténatal, présence d'une diminution des mouvements fœtaux pour la plus jeune et position en siège pour la seconde, avec accouchement par césarienne.

Les atteintes sont présentes au niveau des membres (camptodactylie, flexion des poignets limitée, limitation active des genoux) et de la face (ptosis bilatéral, pseudo-exophtalmie, atrophie linguale et difficulté articulaire). L'amyotrophie des membres inférieurs est plus marquée qu'aux membres supérieurs. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie a été modérée et les améliorations importantes au niveau de la marche. Au niveau fonctionnel, l'autonomie est acquise. Au niveau professionnel, il y a une bonne intégration. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est présent (prise en charge psychologique).

1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	6
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions >1 (+1pt)		4
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		5
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			0
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<2DS) (+1pt)					3
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	3
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					5
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP(+2pts)	retentissement psychologique sur le patient(+2pts)				2

Le score de sévérité d'ECEL1 avec les données fournies est de 28.

Famille 8 : Les mutations retrouvées sont c.1791C>T et c.3202G>A, l'une héritée du père et l'autre de la mère. Les parents sont asymptomatiques.



1993

Il n'y a pas d'antécédent notable. Il n'y a pas de consanguinité entre les parents.

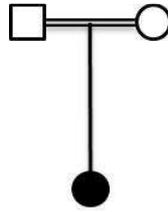
En anténatal, présence d'un retard de croissance intra-utérin. Une diminution des mouvements fœtaux est notée. Le fœtus était en siège.

Les atteintes sont présentes au niveau des membres (camptodactylie, flexion des coudes limitée, limitation active des genoux) et de la face (atrophie linguale). L'amyotrophie des membres inférieurs et supérieurs est modérée. Au niveau du tronc, présence d'une scoliose modérée et d'une hyperlordose. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie a été modérée et les améliorations importantes tant au niveau de la marche que de la motricité fine. Au niveau fonctionnel, l'autonomie est acquise. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est présent (prise en charge psychologique).

Item									
1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophthalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	3
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb < 35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb > 35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions > 1 (+1pt)		3
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pt)	LA des épaules (+1pt)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		8
4	SRP léger CPT > 70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT < 60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			0
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (< -2DS) (+1pt)					3
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	3
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					5
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				2

Le score de sévérité d'ECEL1 avec les données fournies est de 27.

Famille 9 : La mutation retrouvée en deux exemplaires est c.874delG, un exemplaire est hérité du père et l'autre de la mère. Les parents sont asymptomatiques. Les parents sont consanguins.



2009

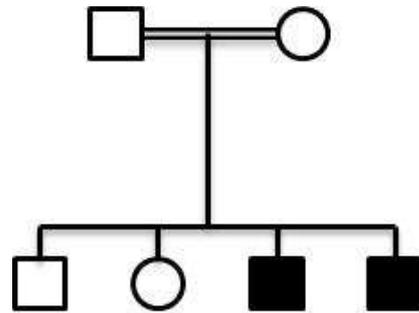
En anténatal, aucune anomalie n'a été relevée, l'accouchement a eu lieu par voie basse.

Les atteintes articulaires sont présentes au niveau des membres (camptodactylie, luxation congénitale de hanche, limitation active des genoux). Au niveau de la face, un ptosis bilatéral et une amyotrophie de la langue sont présents. L'amyotrophie des membres inférieurs est modérée. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie a été modérée et les améliorations importantes. Au niveau fonctionnel, l'enfant est autonome.

1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	4
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb < 35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb > 35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions > 1 (+1pt)		1
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pt)	LA des épaules (+1pt)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		5
4	SRP léger CPT > 70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT < 60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			0
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (< -2DS) (+1pt)					3
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	0
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					5
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				0

Le score de sévérité d'ECCL1 avec les données fournies est de 18.

Famille 10 : La mutation retrouvée en deux exemplaires est c.1685+1G>T, un exemplaire est hérité du père et l'autre de la mère. Les parents sont consanguins au premier degré.



1999

2003

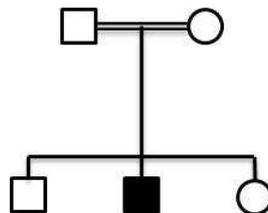
La description clinique est identique pour les deux frères.

Pour les deux enfants, présence d'un retard de croissance intra-utérin avec accouchement à terme par voie basse, sans particularité. Concernant les atteintes de la face, un ptosis bilatéral est présent. Nous n'avons pas l'information concernant l'amyotrophie de la langue. Les limitations articulaires concernent les coudes et les genoux. Présence d'une hyperlordose sans scoliose, et d'une luxation congénitale de hanche. Les pieds sont en valgus convexe. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. L'amyotrophie des membres inférieurs est marquée. Par ailleurs, le retentissement au niveau de la vie familiale est important.

Item									
1	ptosis unilatéral (+1pt)	ptosis bilatéral (+2pts)	amyotrophie linguale (+2pts)	anomalie de Duane (+2pts)	lagophtalmie et/ou pseudo-exophtalmie (+1pt)	autre manifestation ophtalmologique (+1pt)	troubles succion-déglutition (+1pt)	difficultés articulaires (+1pt)	2
2	cyphoscoliose modérée angle de Cobb<35° (+2pt)	cyphoscoliose majeure, angle de Cobb>35° (+4pt)	hyperlordose (+1pt)	port corset (+1pt)	arthrodèse (+2pt)	autre prise en charge orthopédique (+1pt)	Nombre d'interventions>1 (+1pt)		1
3	atteinte des pieds (+2pt)	atteinte des index/camptodactylie (+2pt)	LA des poignets (+1pt)	LA des coudes (+1pts)	LA des épaules (+1pts)	limitation active des genoux (+2pts)	LA hanche (+1pt)		7
4	SRP léger CPT>70% (+2pts)	SRP modéré (+4pts)	SRP sévère CPT<60% (+6pts)	prise en charge sans appareillage (+1pt)	prise en charge avec appareillage (+2pts)	Traitement associé (+2pts)			0
5	atrophie des membres inférieurs (+3pts)	atrophie des membres supérieurs (+3pts)	atrophie du tronc + face (+3pts)	retard de croissance staturo-pondéral (<-2DS) (+1pt)					6
6	RCIU (+1pt)	diminution des MF (+2pt)	détresse respiratoire à la naissance (+3pts)	oligoamnios/hydramnios (+1pt)	accouchement siège-césarienne (+1pt)	genoux en extension (+1pt)	autres signes échographiques (+1pt)	IMG (+10pts)	1
7	périmètre de marche diminué (+3pts)	atteinte MF (+3pts)	prise en charge (+2pts)	douleurs résiduelles (+2pt)					5
8	absence d'amélioration marche ou posture (+2pts)	difficultés scolaires (+2pts)	ressenti familial difficile (+2pts)	absence d'amélioration du SRP (+2pts)	retentissement psychologique sur le patient (+2pts)				2

Le score de sévérité est identique pour les deux enfants. **Le score de sévérité avec les données fournies est de 24.**

Famille 11 : La mutation retrouvée en deux exemplaires est c.966+1G>A, un exemplaire est hérité du père et l'autre de la mère. Les parents sont consanguins.



1997

En anténatal, présence d'un retard de croissance intra-utérin.

En post-natal, les atteintes articulaires sont présentes au niveau des membres (camptodactylie, et limitation active des genoux). Une luxation congénitale de hanche est présente. On note par ailleurs un ptosis bilatéral, une atrophie linguale et des difficultés articulaires. L'amyotrophie est marquée au niveau des membres inférieurs. Il n'y a pas de syndrome restrictif pulmonaire. La prise en charge par kinésithérapie a été modérée et les améliorations importantes tant au niveau de la marche que de la motricité fine.

Au niveau fonctionnel, l'enfant est autonome. Le retentissement au niveau de la vie personnelle et familiale est modéré.

Des données cliniques manquantes (limitations articulaires des coudes, des épaules) et concernant la prise en charge ne nous permettent pas d'établir le score de sévérité pour ce patient.

2) Score de sévérité :

Les calculs du score de sévérité sur 80 points donnent les résultats suivants (tableau 12). La famille 11 n'a pas de score suite à des informations manquantes. Concernant la famille 5, les scores des deux enfants atteints sont indiqués car la différence entre ces scores est marquée.

Tableau 12 : liste des familles et des scores de sévérité

Famille	Score
1	67
2	51
3	60
4	42
5-a	43
5-b	18
6	23
7	28
8	27
9	18
10	24

La moyenne des scores des mutations faux-sens (familles 1 à 3) et des mutations non-sens et d'épissage (familles 4 à 10) est représentée dans le graphique suivant (figure 13).

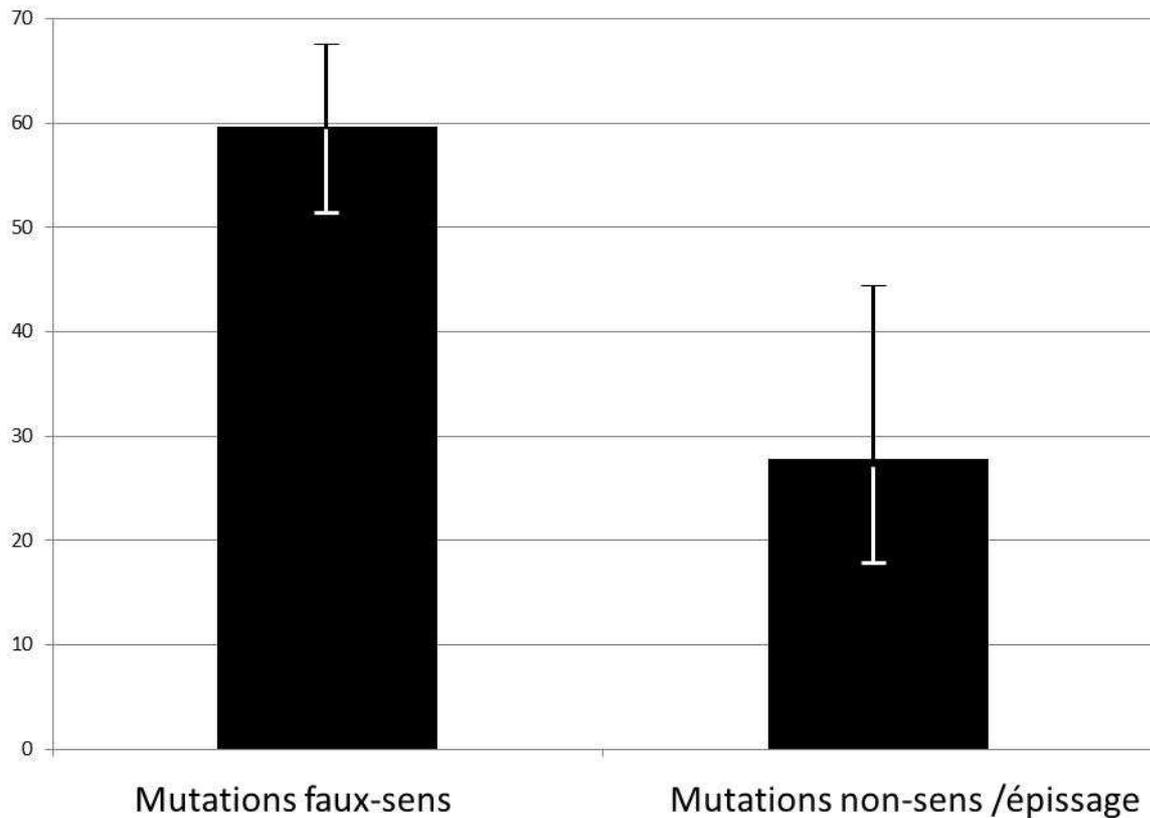


Figure 13 : Moyenne des scores de sévérité pour les patients avec mutations faux-sens et patients avec mutations non-sens et d'épissage (n=3 pour les mutations faux-sens ; n=8 pour les mutations non-sens et d'épissage). Les barres blanches représentent les valeurs minimales et les barres noires les valeurs maximales. Elles sont respectivement de 51 (mutations faux-sens) et 18 (mutations non-sens) ; 67 (mutations faux-sens) et 43 (mutations non-sens).

Une différence des moyennes est relevée entre la sévérité des patients ayant des mutations faux-sens et les patients ayant des mutations non-sens et d'épissage (figure 13). La valeur maximale atteinte pour les mutations non-sens est de 43 (famille 5-a) alors que la valeur minimale pour les mutations faux-sens est de 51 (famille 2).

Discussion

A) Analyse biologique : mécanismes physiopathologiques

L'objectif était de tester l'hypothèse de perte de fonction pour les mutations faux-sens. Pour les mutations non-sens et d'épissage, le mécanisme résulte d'une absence de production de la protéine (Nicholson et al., 2010). Pour les mutations faux-sens, différents mécanismes physiopathologiques peuvent être envisagés : perte de fonction par absence de synthèse protéique, par défaut de localisation et par perte de la fonction enzymatique.

Ces trois hypothèses physiopathologiques ont été testées avec la mutation identifiée p.Cys760Arg et les variants p.Arg702Leu, p.Gln318Pro, p.Leu165Pro (figure 14).

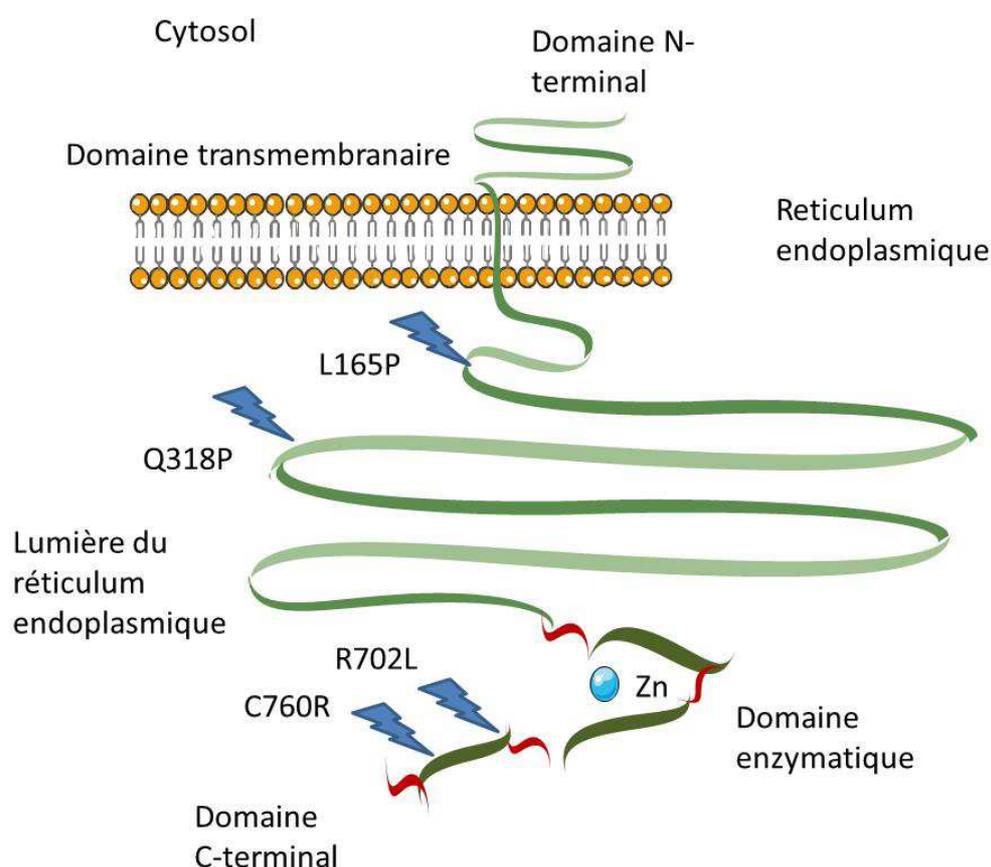


Figure 14 : Schéma illustratif représentant la protéine ECEL1 avec son domaine transmembranaire, et son domaine enzymatique actif, représenté en quatre parties rouge. Les mutations et variants étudiés sont représentés par des éclairs. La mutation p.Cys760Arg établit un pont disulfure avec l'acide aminé 772, qui se situe à l'extrémité C-terminal du domaine enzymatique (quatrième partie rouge). Les autres variants ne sont pas situés dans le domaine actif (notamment p.Arg702Leu). La mutation p.Leu165Pro est proche du domaine transmembranaire (dernier acide aminé : 82).

1) Etude de la mutation p.Cys760Arg : perte d'activité enzymatique

Le variant p.Cys760Arg était prédit comme pathogène (Dieterich, 2013) par l'analyse de ségrégation, la conservation de l'acide aminé au cours de la phylogenèse (figure 15), la fonction de la cystéine au sein du domaine enzymatique et l'analyse *in silico* avec des logiciels de prédiction.

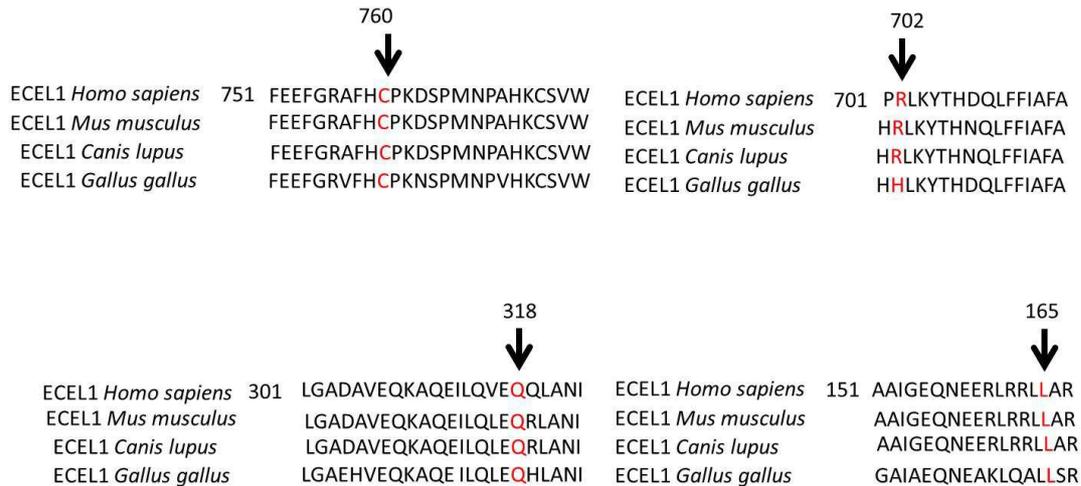


Figure 15 : Alignement des séquences protéiques d'ECEL1 humain, de ses orthologues d'autres espèces animales (ECEL1 de la souris, du chien et de poulet). Les acides aminés sont conservés excepté pour Arg702 qui n'est pas conservé au sein de l'espèce *Gallus gallus*.

L'expression et la localisation de la protéine avec le variant p.Cys760Arg n'étaient pas altérées dans un modèle *in vitro* (Dieterich et al., 2013). L'activité enzymatique *in vitro* par le test enzymatique est fortement abaissée. Le caractère pathogène de p.Cys760Arg est corroboré par la perte de la fonction enzymatique qui suppose le même mécanisme physiopathologique sous-jacent par perte de fonction que pour les mutations non-sens et d'épissage.

Suite à cette perte de fonction enzymatique, l'hypothèse est que le substrat non connu à ce jour, pourrait s'accumuler puisqu'il n'est pas clivé et perturber les voies dans lesquelles il est impliqué.

2) Etude des variants p.Leu165Pro, p.Gln318Pro et p.Arg702Leu

Le variant p. Leu165Pro est à l'état homozygote chez le patient. Il est à l'état hétérozygote chez les parents. Ce qui confirme une transmission autosomique récessive. De plus, il n'est pas référencé dans les bases de données (Exome Variant Server, Genome Variant Server, dbSNP, et 1000genomes). Par ailleurs, ce variant concerne un acide aminé conservé au cours de l'évolution (figure 15). La probabilité est forte qu'il soit pathogène. Cependant, l'expression et la localisation ne sont pas affectées. L'activité enzymatique n'est pas diminuée. Elle apparaît même augmentée ($n=3$, $p<0,01$), d'environ 20%. Le variant est proche du domaine transmembranaire mais ne se situe pas dans ce domaine (figure 14).

L'analyse *in silico* n'identifie pas d'altération de l'épissage. Deux hypothèses peuvent être formulées : la protéine mutée altère les voies de signalisation dans lesquelles elle est impliquée du fait d'une activité enzymatique augmentée (ECEL1 ne serait pas uniquement utile pour modifier son substrat, mais serait également partenaire de protéines indispensables au développement et au fonctionnement de la mise en place des branchements terminaux intramusculaires des motoneurones) et une modification de la structure de la protéine.

Le variant p.Gln318Pro est associé à une mutation qui affecte l'épissage selon les analyses bio-informatiques. Chaque parent a transmis un exemplaire. Ce qui confirme une transmission autosomique récessive. Le variant p.Gln318Pro n'est pas référencé dans les bases de données (Exome Variant Server, Genome Variant Server, dbSNP, et 1000genomes) et l'acide aminé mis en jeu est conservé au cours de l'évolution (figure 15). La probabilité est forte qu'il soit pathogène. Cependant, l'expression, la localisation et l'activité enzymatique ne sont pas altérées.

L'analyse *in silico* n'identifie pas d'altération de l'épissage pour p.Gln318Pro. Les deux hypothèses précédemment décrites pour p.Leu165Pro peuvent également être envisagées.

Le variant p.Arg702Leu est à l'état hétérozygote chez le patient. Aucun autre variant associé n'a été retrouvé. Ce variant est recensé dans les bases de données comme bénin (Exome Variant Server et dbSNP). Il n'est pas conservé dans la phylogénèse (figure 15). Enfin l'expression, la localisation et l'activité enzymatique ne sont pas altérées. L'hypothèse que p.Arg702Leu est un Single Nucleotid Polymorphism est forte.

Les études d'expression, de localisation et de l'activité enzymatique concourent à l'établissement du caractère pathogène ou bénin des variants faux-sens. Des perspectives sont à envisager suite à l'analyse biologique.

3) Perspectives de l'analyse biologique

Les résultats biologiques ont été obtenus avec un modèle expérimental *in vitro* de surexpression. Une confirmation *in vivo* de l'expression protéique (analyse par Western-Blot) et une étude de transcrits sur biopsie humaine pourraient être envisagées.

De même concernant la localisation, l'étude avec des cellules COS-7 n'a pas permis d'obtenir une localisation fine de la protéine ECEL1. Il a été montré que 90% de cette protéine est localisée au niveau du reticulum endoplasmique et qu'un petit pourcentage serait au niveau de la membrane plasmique en utilisant une méthode par biotinylation (Benoît et al., 2004). Une étude de la localisation avec des marqueurs de la membrane plasmique ou par biotinylation pourrait être entreprise pour confirmer ou infirmer la localisation d'ECEL1 mutée. En outre, la localisation pourrait être étudiée dans un modèle se rapprochant du modèle *in vivo*, comme des motoneurones en culture.

Quant à l'activité enzymatique, le test a été effectué en comparant les variants au WT. De plus, un inhibiteur spécifique des endopeptidases a été utilisé. Les résultats étaient reproductibles (n=4 pour p.Cys760Arg et n=3 pour les autres variants). Les résultats obtenus concernant p.Cys760Arg, ont confirmé le mécanisme envisagé de perte de fonction enzymatique. Le test est donc valide pour étudier les conséquences des mutations faux-sens sur l'activité enzymatique. Il pourrait être adapté à un modèle différent (motoneurones en culture).

B) Analyse clinique : spectre de sévérité

Si le phénotype lié aux mutations du gène *ECEL1* est identifiable par le praticien pour orienter la recherche moléculaire vers ce gène (Dieterich et al., 2013 ; McMillin et al., 2013 ; Shabaan et al., 2013 ; Barnett et al., 2014 ; Patil et al., 2014), la présentation clinique est variable. Le score de sévérité en 8 items a pour but d'une part de quantifier cette variabilité et d'autre part d'établir une corrélation génotype-phénotype.

La quantification de la sévérité est nécessaire afin de pouvoir comparer les phénotypes des patients ayant des mutations d'*ECEL1* avec des critères communs pour chaque évaluateur. Un outil est mis en place : le score de sévérité. Celui-ci a été établi en prenant en compte l'ensemble des données cliniques des patients dont les mutations ont été identifiées au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire. La quantification a montré que le score des patients avec une mutation faux-sens (n=3) est plus élevé que les scores des

supérieurs et inférieurs, fente labiopalatine, variants morphologiques faciaux, retard psychomoteur, ptosis bilatéral, hyperlordose, scoliose, atteintes ophtalmologiques, atrophie musculaire, limitation active de la flexion des genoux, atrophie linguale) permettent, sans pouvoir calculer le score de sévérité, de situer la patiente au minimum au centre du spectre. L'étude de l'activité enzymatique de p.Ala675Thr et l'établissement du score de sévérité permettraient de corroborer l'analyse effectuée avec la mutation p.Cys70Arg d'une part et de confirmer la corrélation génotype-phénotype susmentionnée.

Si l'hypothèse de différence de sévérité entre les mutations faux-sens et non-sens est confirmée par l'analyse d'une cohorte plus importante, une sévérité majeure pourra orienter la recherche moléculaire vers une mutation faux-sens, tandis qu'une atteinte beaucoup moins sévère pourra orienter la recherche initiale vers des mutations non-sens et d'épissage.

Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : Poreau Brice

TITRE : Mécanisme physiopathologique et spectre clinique liés aux mutations d'*ECELI*, un gène majeur d'arthrogrypose

Une collaboration entre le service de Génétique Médicale, le laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble et l'équipe « Muscle et Pathologies » du Grenoble-Institut des Neurosciences a permis d'associer le gène *ECELI*, endothelin converting enzyme like 1, à une forme spécifique d'arthrogrypose distale autosomique récessive (Dieterich et al, 2013). Au cours de ces investigations, des mutations non-sens, d'épissage et faux sens ont été identifiées. L'objectif de ce travail de thèse était donc double : biologique et clinique.

1) Objectif biologique : mieux connaître les mécanismes physiopathologiques sous-jacents

J'ai mis au point pour la première fois un test d'activité enzymatique, technologie qui pourra être transférée au Laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble pour aider à déterminer la pathogénicité de nouveaux variants. J'ai démontré que la mutation faux-sens p.Cys760Arg du gène *ECELI* entraîne une forte diminution d'activité enzymatique. Le mécanisme physiopathologique de cette mutation est donc similaire à celui des mutations non-sens et d'épissage par son caractère perte de fonction. Deux mutations faux-sens, situées en dehors du domaine catalytique de la protéine p.Leu165Pro et p.Gln308Pro, mais associées à un phénotype caractéristique, n'entraînaient pas de baisse d'activité enzymatique. D'autres mécanismes physiopathologiques entrent donc en jeu. Pour les caractériser, ce travail ouvre sur deux voies de recherche. D'une part, étudier l'expression, la localisation et l'activité dans des modèles différents des modèles cellulaires que j'ai utilisés tels les neurones en culture. D'autre part, identifier d'autres domaines fonctionnels de la protéine notamment par cristallographie.

2) Objectif clinique : établir le spectre de sévérité

J'ai recueilli l'ensemble des données cliniques disponibles des patients dont les mutations ont été identifiées. J'ai élaboré un score de sévérité pour ce tableau d'arthrogrypose distale. Les patients avec les scores les plus élevés avaient des mutations faux-sens, alors que ceux ayant un score faible avaient des mutations non-sens et d'épissage.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

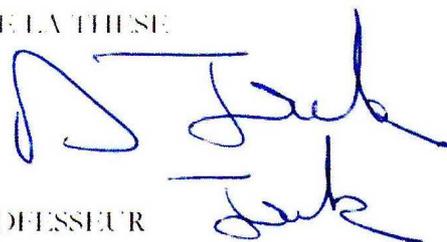
Grenoble, le 4/8/2014

LE DOYEN



J.P. ROMANET

LE PRESIDENT DE LA THESE



PROFESSEUR

Bibliographie

Bamshad M, Jorde LB, Carey JC (1996) A revised and extended classification of the distal arthrogyposes. *Am. J. Med. Genet.* 65:277-81.

Bamshad M, Van Heest AE, Pleasure D (2009) Arthrogyposis: a review and update. *J. Bone Joint Surg.*, 91(Suppl 4):40-46.

Barnett CP, Todd EJ, Ong R, Davis MR, Atkinson V, Allcock R, Laing N, Ravenscroft G (2014) Distal arthrogyposis type 5D with novel clinical features and compound heterozygous mutations in ECEL1. *American Journal of Medical Genetics Part A.* doi 10.1002/ajmg.a.36342. [Epub ahead of print]

Benoit A, Vargas MA, Desgroseillers L, Boileau G (2004) Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECEL1) is present both in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 380:881-8.

Bombardier C, Tugwell P (1982) A methodological framework to develop and select indices for clinical trials: statistical and judgmental approaches. *J. Rheumatol.*, 9:753-757.

Darin N, Kimber E, Kroksmark AK, Tulinius M (2002) Multiple congenital contractures: birth prevalence, etiology, and outcome. *J. Pediatr.*, 140(1):61-7.

Dieterich K, Quijano-Roy S, Monnier N, Zhou J, Fauré J, Avila Smirnow D, Carlier R, Laroche C, Marcotelles P, Mercier S, Mégarbane A, Odent S, Romero N, Sternberg D, Marty I, Estournet B, Jouk PS, Melki J, Lunardi J (2013) The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with a distinct form of recessive distal arthrogyposis. *Human Molecular Genetics*, 22(8):1483-1492.

Dieterich K (2013) *Arthrogyposes multiples congénitales neuromusculaires : identification d'un nouveau gène, ECEL1, et recherche des mécanismes physiopathologiques liés au complexe de relâchement du calcium.* Thèse de l'université de Grenoble. Grenoble. 246 pages.

Dohrn N, Le VQ, Petersen A, Shokbo P, Pedersen IS, Ernst A, Krarup H, Petersen MB (2013) *Whole exome sequencing in two fetuses with centronuclear myopathy of consanguineous parents from Sudan suggests ECEL1 as the candidate gene.* Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Boston.

Hall JG, Reed SD, Driscoll EP, Part I (1983) Amyoplasia: a common, sporadic condition with congenital contractures. *Am. J. Med. Genet.*, 15(4):571-90.

Hall JG (1997) Arthrogryposis multiplex congenita: etiology, genetics, classification, diagnostic approach, and general aspects. *J. Pediatr. Orthop.*, B(6):159 – 166.

Hall JG (2014) Arthrogryposis (multiple congenital contractures): diagnostic approach to technology, classifications, genetics, and general principles. *Eur. J. Med. Genet.* 57(8):464-472.

Kiryu-Seo S, Sasaki M, Yokohama H, Nakagomi S, Hirayama T, Aoki S, Wada K, Kiyama H (2000) Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 4345 – 4350.

Lowry RB, Sibbald B, Bedard T, Hall JG (2010) Prevalence of multiple congenital contractures including arthrogryposis multiplex congenita in Alberta, Canada, and a strategy for classification and coding. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, 88(12):1057-61.

McMillin MJ, Below JE, Shively KM, Beck AE, Gildersleeve HI, Pinner J, Gogola GR, Hecht JT, Grange DK, Harris DJ, Earl DL, Jagadeesh S, Mehta SG, Robertson SP, Swanson JM, Faustman EM, Mefford HC, Shendure J, Nickerson DA, Bamshad MJ (2013) Mutations in ECEL1 cause distal arthrogryposis 5D. *Am. J. Hum. Genet.*, 92(1):150-6.

Moessinger A (1983) Fetal akinesia deformation sequence: an animal model. *Pediatrics*, 72(6):857-863.

Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H. (2010) Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuromuscular junctions. *J. Neurosci.*, 30:6954-62.

Nagata, K., Kiryu-Seo, S. and Kiyama, H. (2006) Localization and ontogeny of damage-induced neuronal endopeptidase mRNA-expressing neurons in the rat nervous system. *Neuroscience*, 141: 299-310.

Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Mühlemann O (2010) Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 67(5):677-700.

Patil SJ, Rai GK, Bhat V, Ramesh VA, Nagarajaram HA, Matalia J, Phadke SR (2014) Distal arthrogryposis type 5D with a novel *ECEL1* gene mutation. *Am. J. Med. Genet.*, 9999:1-6.

Shaaban S, Duzcan F, Yildirim C, Chan WM, Andrews C, Akarsu N, Engle E. (2013) Expanding the phenotypic spectrum of ECEL1-related congenital contracture syndromes. *Clin Genet.* doi: 10.1111/cge.12224. [Epub ahead of print]

Shaheen R, Al-Owain M, Khan A, Zaki M, Hossni H, Al-Tassan R, Eyaid W, Alkuraya F. (2013) Identification of three novel ECEL1 mutations in three families with distal arthrogryposis type 5D. *Clin Genet*. doi: 10.1111/cge.12226. [Epub ahead of print]

Valdenaire O, Richards JG, Faull RLM, Schweizer A (1999) XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Mol. Brain Res.*, 64:211-221.

Weinreb NJ, Cappellini MD, Cox TM, Giannini EH, Grabowski GA, Hwu WL, Mankin H, Martins AM, Sawyer C, Dhal S, Yeh MS, Zimran A (2010) A validates disease severity scoring system for adults with type 1 Gaucher disease. *Genetics in medicine*, 12(1):44-51.

Site internet :

www.umd.be/HSF

www.uniprot.org

<http://evs.gs.washington.edu>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

<http://gvs.gs.washington.edu/GVS138/>

<http://www.1000genomes.org/>

Annexes

Cahier clinique : phénotype des patients avec mutations d'*ECEL1*

Le tableau ci-dessous reprend les signes observés pour des patients avec mutations d'*ECEL1*. Il suffit de mettre un X s'il est présent ou absent. Si l'information n'est pas fournie, ajouter NSP dans l'une des cases. La dernière colonne permet d'ajouter des informations complémentaires plus précises concernant la sémiologie en question. Dans les signes, nous recherchons particulièrement l'amyotrophie de la langue. Par ailleurs, nous essayons de distinguer si certains patients ont un phénotype plus sévère que d'autres. Cette sévérité peut être appréciée par la multiplicité des signes cliniques, mais également par la prise en charge et le retentissement sur la vie personnelle et familiale. Le questionnaire comprend trois pages, à la fin du tableau sont insérées des questions sur les examens complémentaires.

Signes cliniques	Présent	Absent	Commentaires (dont précisions comme âge d'apparition du symptôme, angle d'hyperlordose etc...)
Ante-natal (préciser le terme auquel le signe a été observé la première fois)			
Diminution des mouvements fœtaux			
RCIU			
Genoux en extension			
Accouchement par siège			
Détresse respiratoire à la naissance			
Oligoamnios			
Hydramnios			
Autres éléments			
Post-natal			
Neuromusculaire			
Posture et rachis			
amyotrophie des membres inférieurs			
hyperlordose			
scoliose			
corset - arthrodèse			
syndrome restrictif pulmonaire			

Autres éléments			
Limitations articulaires			
Membres supérieurs			
camptodactylie			
atteinte des index			
limitations articulaires des coudes			
limitations articulaires des épaules			
Membres inférieurs			
luxation congénitale de hanche			
limitation congénitale de hanche			
pieds valgus convexes			
pieds varus			
limitation active des genoux en flexion			
Autres signes neuromusculaires			
ROT normaux			
amyotrophie de la langue			
ptosis			
difficultés articulaires			
troubles oculomoteurs (Duane ou autre)			
troubles de la succion-déglutition			
Pterygia (préciser localisation)			
déficits sensitifs			
Autres signes			
Lagophtalmie			
pseudo-exophtalmie			
Evaluation fonctionnelle (test de marche, fatigabilité)			
Prise en charge			
kinésithérapie (si oui,			

nombre d'heures par semaine)			
ergothérapie (si oui, nombre d'heures par semaine)			
orthophonie (si oui, nombre d'heures par semaine)			
Autre type de prise en charge			
Evolution			
Des limitations articulaires			
Des capacités motrices fonctionnelles			
Retentissement sur la vie personnelle et familiale			
Aspect psychologique du patient (prise en charge par professionnel)			
Difficultés scolaires			
Ressenti familial difficile			

Examens complémentaires effectués :

IRM musculaire : *date – préciser les types de séquence réalisés (T1, T2, T2 fat sat ?) – conclusion*

EMG : *date – préciser les types d'examen réalisés (conduction, électromyogramme, fibre unique, stimulation répétée ?) – conclusion*

Examen ophtalmologique : *date - conclusion*

Score de sévérité de la maladie de Gaucher (Weinreb et al., 2010)

Gaucher Disease Type 1 Severity Scoring System (GD-DS3)

Patient ID _____
 Assessment Date _____

DISEASE DOMAINS	ASSESSMENTS	DISEASE SEVERITY SCORE										Assessment Score	Average Domain Score	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9			10
BONE	Lytic Lesions, AVN, or Pathological Fractures*	Absent								Present			8	8.0
	Bone / Joint Pain (past 30 days)	None to very mild pain  	Mild pain 			Moderate pain 			Severe pain 	Extreme pain 		10		
	# Bone Crisis in Past 12 Months	0 to 1	≥ 2										2	
	Bone Marrow Infiltration**	0 to 4 (mild)							5 to 8 (moderate)	9 to 16 (marked to severe)			10	
	Bone Mineral Density Z-score†	> -1	> -2 to ≤ -1									≤ -2	10	
HEMATOLOGIC	Thrombocytopenia	≥ 120 x10 ⁹ /mm ³	21 to 119 x10 ⁹ /mm ³			< 20 x10 ⁹ /mm ³							5	6.0
	Bleeding	None to mild tendency; bruising	Moderate; no transfusions						Severe; transfusion needed				8	
	Anemia	> 12 g/dL (male), > 11 g/dL (female)	8 to 12 g/dL (male), 8 to 11 g/dL (female)			< 8 g/dL							5	
VISCERAL	Splenomegaly‡ (Volume as MN)	≤ 5	> 5 to ≤ 15			> 15 or Splenectomized							5	5.0
	Hepatomegaly‡ (Volume as MN)	≤ 2.5	> 2.5										2	
	Gaucher-related Pulmonary Disease	None							Any				8	
Total Gaucher DS3 Score											19.0			

Classifications des différents types d'arthrogryposes distales (Hall et al., 1983 ; Bamshad et al., 1996 ; Dieterich, 2013)

Nom	Hall	Bamshad	Signes cliniques distinctifs
Arthrogrypose distale de type 1	DA type I	DA1	
Syndrome de Freeman-Sheldon ou FSS		DA2A	Petite bouche en "siffleur", plis nasogéniens proéminents
Syndrome de Sheldon-Hall ou SHS		DA2B	Intermédiaire entre DA1/ DA2A
Syndrome de Gordon	DA type IIA	DA3	Petite taille, fente palatine
Arthrogrypose avec scoliose sévère	DA type IID	DA4	Scoliose
	DA type IIC		Fente labiale
Arthrogrypose avec troubles oculomoteurs et anomalies rétiniennes	DA type IIB	DA5	Ptosis, limitation des mouvements oculo-moteurs
Arthrogrypose et surdité neurosensorielle		DA6	Surdité neurosensorielle
Syndrome de Hecht ou syndrome trismus pseudocamptodactylie	DA type IIE	DA7	Trismus, pseudocamptodactylie
Syndrome des pterygia multiples autosomique dominant		DA8	Pterygia multiples
Syndrome de Beals ou Congenital Contractural Arachnodactyly (CCA)		DA9	Pavillons des oreilles dysplasiques, doigts longs et effilés
Short calcaneus tendon		DA10	Limitations articulaires des chevilles en flexion plantaire

Première étude fonctionnelle de mutations d'ECEL1, un nouveau gène d'arthrogrypose distale

Inserm

Institut des Neurosciences
GRENOBLE



Brice Poreau^{1,2,3}, Klaus Dieterich^{1,2}, Nicole Monnier³, Isabelle Marty², Julien Fauré³

¹ Equipe Muscle et Pathologies, INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, 38042 Grenoble Cedex 09, France

² Service de Génétique Clinique, Département de Génétique et Procréation, Hôpital Couple Enfant, CHU Grenoble, 38700 Grenoble, France

³ Institut de Biologie et Pathologie – Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie Laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09, FRANCE



1) Introduction

L'arthrogrypose est une limitation articulaire en position anormale. C'est un signe clinique. L'arthrogrypose congénitale multiple est définie comme une limitation articulaire d'au moins deux niveaux d'articulations et présente dès la naissance.

En 2013, au laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble, un nouveau gène a été associé à une forme spécifique d'arthrogrypose distale, autosomique récessive, il s'agit du gène *ECEL1*. La protéine endothelin-converting enzyme like 1 (*ECEL1*) est une enzyme de la famille des endopeptidases.

Le but de ce projet est de mieux connaître la physiopathologie de l'arthrogrypose distale liée à *ECEL1*, par une étude fonctionnelle de variants faux-sens : p. L165P, p. Q318P, p. R702L et p. C760R (Figure 1)

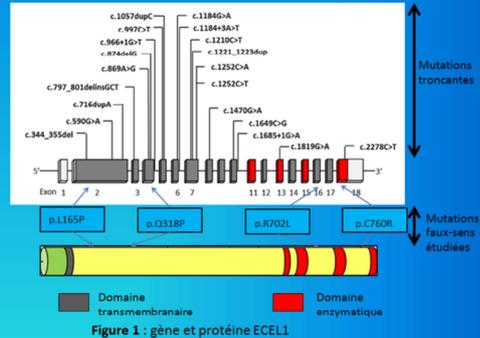


Figure 1 : gène et protéine ECEL1

2) Méthode

Modèle cellulaire de sur-expression:
Hek 293
Transfection : phosphate de calcium
Lysat : RIPA
Western-blot

Modèle cellulaire de sur-expression:
COS-7
Transfection : Polyéthylèneimine
Immunofluorescence avec Ac anti-Flag
et Ac anti-tubuline 2.1

Modèle cellulaire de sur-expression:
Hek 293
Transfection : phosphate de calcium
Lysat : CHAPS
Test enzymatique : clivage d'un peptide, lecture de l'absorbance à 405nm

3) Résultats

L'expression n'est pas altérée

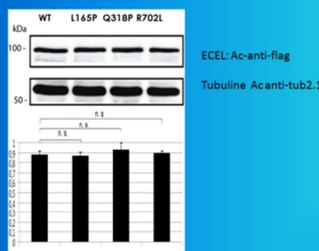


Figure 2 : Western-blot et quantification anticorps anti-flag/anticorps anti-tubuline. Moyenne (n=4). n.s. : Non Significatif.

La localisation n'est pas modifiée

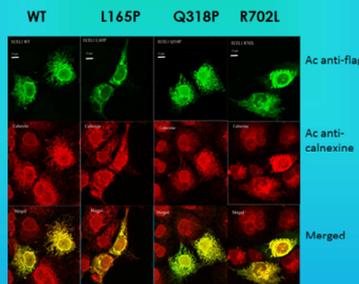


Figure 3 : Immunofluorescence. En vert, protéine ECEL1, en rouge, tubuline, images du bas, colocalisation au niveau du reticulum endoplasmique

Forte diminution de l'activité enzymatique pour la mutation C760R

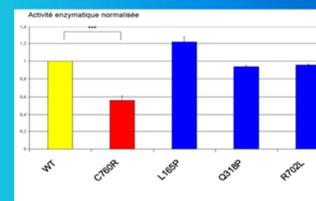
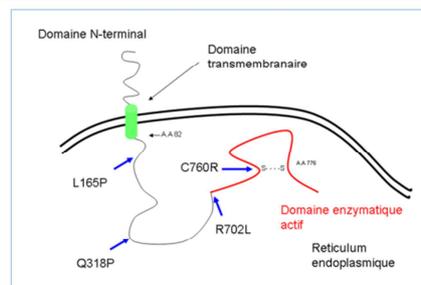


Figure 4 : test enzymatique (n=4 pour p. C760R). La différence est significative entre le WT et ECEL1 muté p.C760R. *** p<0,001

4) Discussion - Conclusion

- Ce travail a permis la mise au point pour la première fois d'un test de l'activité enzymatique d'ECEL1.
- Nous avons démontré un mécanisme physiopathologique par forte diminution de cette activité pour la mutation p. C760R.
- Ces résultats contribuent à une étude ultérieure phénotype des patients/génotype.
- D'autres mécanismes concernant la pathogénicité des mutations p.L165P, p.Q318P et p.R702L sont à rechercher.

Figure 5 : Schéma représentant les mutations au sein de la protéine. La mutation p. C760R se trouve dans une zone qui contribue au repliement du domaine enzymatique, en présence d'un pont disulfure.



Novel *ECELI* mutations and associated distal arthrogryposis phenotypes

International Congress on Neuromuscular diseases – Nice – July 2014

Brice Poreau (1, 3, 4), Klaus Dieterich (1, 3, 4), Nicole Monnier (1, 2, 3), Isabelle Marty (1), Pierre-Simon Jouk (3, 4), Joël Lunardi (1, 2, 3), Julien Fauré (1, 2, 3)

1 Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Muscle et Pathologie, Grenoble, France

2 Laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire, Département de Biochimie, Pharmacologie, Toxicologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France

3 Centre de Référence des Anomalies du Développement Embryonnaire, Arthrogryposes, CHU de Grenoble, Grenoble, France

4 Service de Génétique Médicale, Département de Génétique et Procréation, CHU de Grenoble, Grenoble, France

Endothelin-converting enzyme like 1 (*ECELI*) is a member of the neutral endopeptidase (neprilysine, NEP) family with a critical role in intramuscular axon branching of motor neurons during development. Recently we identified *ECELI* mutations in an autosomal recessive form of distal arthrogryposis with a recognizable phenotype including camptodactily, absent flexion of the knee, ptosis, tongue atrophy and muscle atrophy and fatty infiltration especially of the biceps femoris. Most of *ECELI* mutations are splice site or non-sense mutations and predicted to yield truncated proteins and mRNA decay. The pathophysiological mechanism of false sense mutations is less well known. Our in vitro studies show that all missense mutations we have identified so far do not modify protein expression. Review of the clinical data of all patients furthermore confirms that *ECELI* mutations yield a homogeneous phenotype but expands the spectrum of severity.

Novel *ECEL1* mutations and associated distal arthrogryposis phenotypes



Krist Dietrich^{1,2,7}, Brice Fournier^{1,2,7}, Nicole Monnier^{1,3,7}, Claude Cance⁴, Sandra Whalen⁵, Susana Quijano-Roy⁶, Isabelle Marty¹, Pierre-Simon Jouk^{1,7}, Joël Lunard^{1,4,7}, Julien Saurat^{1,4,7}

¹ Service Muscle et Pathologies, INSERM U1036, Département des Neurosciences, Grenoble, France
² Service de Génétique Clinique, Département de Génétique et Prévention, Hôpital Cochin Enfants, CHU Grenoble, Grenoble, France
³ Service de Génétique Clinique, Hôpital Nord CapSanté, AP-HP, Paris, France
⁴ Service de Pédiatrie, CHU Toulouse, France
⁵ Service de Médecine Pédiatrique et Neurosciences pédiatriques, Hôpital Sacrément Pédiatrique, AP-HP, Cochin, France
⁶ Laboratoire Biologie Génétique et Moléculaire, Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble, Grenoble, France
⁷ Centre de Référence des Anomalies du Développement, Arthrogryposes, CHU Grenoble, Grenoble, France



1) Introduction

Distal arthrogryposis is the second most frequent subgroup of arthrogryposis multiplex congenita, also called multiple congenital contractures. Distal arthrogryposis is characterized by contractures affecting especially but not exclusively the distal part of the extremities. Establish a precise clinical and molecular diagnosis in patients with distal arthrogryposis is still challenging due to overlapping and variable phenotypes and the lack of specific clinical hallmarks. We identified *ECEL1* mutations in an autosomal recessive form of distal arthrogryposis (Dietrich et al, 2013).

Endothelin-converting enzyme like 1 (*ECEL1*) is a member of the neutral endopeptidase (wepitylsin, NEP) family with a critical role in intramuscular axon branching of motor neurons during development. Most of *ECEL1* mutations are splice site or non-sense mutations and predicted to yield truncated proteins and mRNA decay. The pathophysiological mechanisms of false sense mutations is less well known. Here we review the clinical, cellular and molecular data of our cohort that expands the spectrum of severity of *ECEL1* related distal arthrogryposis and suggests new physiopathological mechanisms.

2) Method

Coding exons and splice junctions of the *ECEL1* gene [NM_004626.2] were analyzed by bidirectional Sanger sequencing of proband's DNA using an ABI 3130 XL DNA analyser. Immunocytochemistry analyses were carried out on COS-7 cells transfected with *ECEL1* WT, c.953A>C, and c.694T>C sequences cloned in DNA3.1+ plasmids.

3) a) Results : Novel *ECEL1* mutations

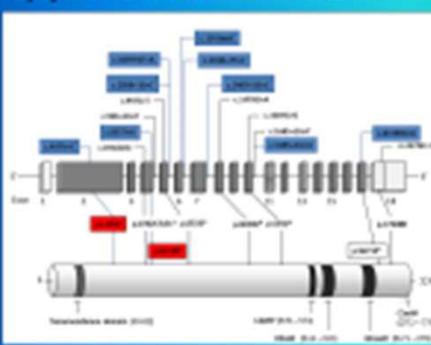


Figure 1 : Schem and protein structure of *ECEL1*. Novel mutations are indicated in blue rectangles. Antisynch changes of novel splice site mutations are highlighted in red. Splice site non-sense mutation, all novel mutations are located on the 5' end with respect to the catalytically active domain (exons 13, 14, 15, 16). Unlike p.C790K, the two novel false sense mutations p.L165P and p.Q338P are near the N-terminal end of the catalytic domain of *ECEL1*, devoid of any known function to date.

3) b) Results : In vitro expression of novel missense mutations

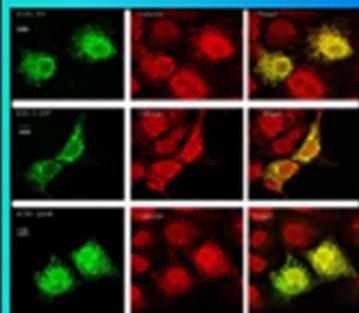


Figure 2 : Wild-type *ECEL1* (green) expression colocalizes with actinin (red), a marker of the microfilament structure (MF). *ECEL1* L165P and Q338P (green) are expressed in similar amounts compared to *ECEL1* WT (green+red) and localize colocalize with actinin.

3) c) Results : Spectrum of associated phenotypes



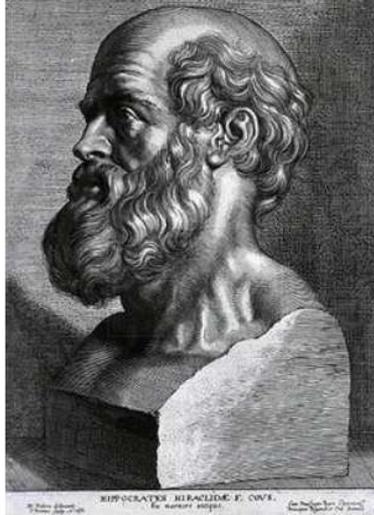
Table 1 - Clinical findings in our cohort. Distal upper limb involvement (hand/ fingers) and distal lower limb involvement (feet/ ankles) were absent in respectively 2/9 and 1/9 of all cases. Pterygia (78%) was the most frequent associated anomaly. Oculomotoric anomaly was only found in patients with false sense mutations (3/14, 21%). Pterygia were rare (2/14, 14%), n.s. = not declared.

Family	Ref	Mutation	Hand/Finger	Foot	Hand	Foot/Ankle	Other	Oculomotoric	Pterygia
13	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
14	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
15	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
16	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
17	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
18	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
19	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
20	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
21	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
22	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
23	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
24	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
25	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
26	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
27	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
28	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
29	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
30	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
31	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
32	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
33	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
34	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
35	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
36	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
37	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
38	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
39	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
40	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
41	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
42	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
43	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
44	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
45	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
46	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
47	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
48	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
49	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
50	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
51	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
52	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
53	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
54	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
55	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
56	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
57	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
58	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
59	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
60	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
61	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
62	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
63	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
64	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
65	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
66	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
67	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
68	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
69	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
70	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
71	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
72	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
73	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
74	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
75	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
76	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
77	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
78	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
79	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
80	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
81	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
82	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
83	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
84	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
85	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
86	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
87	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
88	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
89	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
90	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
91	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
92	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
93	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
94	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
95	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
96	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
97	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
98	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
99	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
100	2013	c.1088G>A	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Figure 3 : Variable severity. Though all patients had limited knee flexion, flexion angles varied from less than 30° to 90°. And despite some patients having very severe muscle atrophy (e.g. P32), all required ambulation probably due to the extended position of the knees allowing an upright stance. The most severe muscle atrophy and joint limitations were observed in patients harbouring nonsense mutations (P1, sibling P33, P35). Non-sense, splice site or small indel mutations were phenotypically more moderate as illustrated by P8.

4) Discussion - Conclusion

Our data confirm that *ECEL1* mutations yield a homogeneous phenotype. Clinical variability is moderate. Limited knee flexion and ptois are clinical hallmarks in our cohort (100% and 78% respectively) and when compared with all published cases (32/36, 89% and 26/36, 72% respectively). Oculomotor abnormalities may also guide the diagnosis when present because this is a rare finding in other distal arthrogryposis. Pterygia are rare and often limited to a single joint level, but might misled the diagnosis in these individual cases to multiple pterygia syndrome. We found that the expression and localization of *ECEL1* false sense mutants do not differ from that of wild-type *ECEL1*. The two novel false sense mutations p.L165



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerais jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Résumé

L'arthrogrypose congénitale multiple est définie comme une limitation articulaire congénitale de deux niveaux d'articulations au minimum. Une personne sur 3000 à 12000 en est atteinte. Elle est la conséquence d'une réduction des mouvements fœtaux. Récemment des études du laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble ont élargi le répertoire de mutations d'*ECEL1* (endothelin-converting enzyme like 1) associées à un type d'arthrogrypose distale spécifique. Ce gène a été découvert en 2013 par Dieterich et al. (GIN INSERM U836 et CHU de Grenoble). Nous avons entrepris la première étude fonctionnelle des mutations faux-sens d'*ECEL1*. Une diminution de l'activité de la mutation p.Cys760Arg (n=4, p<0,001), située au niveau du domaine d'activité enzymatique, a été détectée. Un test d'activité enzymatique de l'endopeptidase ECEL1 a été mis au point. Une très forte diminution de l'activité enzymatique a été retrouvée *in vitro* confirmant l'étiologie de l'arthrogrypose chez ce patient par un mécanisme perte de fonction. Il s'agit de la première étude aboutissant à ce résultat. Les autres mutations n'affectent pas l'activité enzymatique *in vitro*. D'autres mécanismes physiopathologiques doivent être recherchés pour expliquer leur effet pathogène. Nous avons également analysé la corrélation phénotype-génotype. Pour cela, nous avons élaboré un score de sévérité en 8 items. Les patients ayant un phénotype sévère, selon ce score, ont des mutations faux-sens alors que ceux ayant des scores plus modérés ont des mutations non-sens ou d'épissage.

Mots-clés : arthrogrypose, ECEL1, endopeptidase, test enzymatique, score de sévérité, corrélation génotype-phénotype

Summary Arthrogryposis multiplex congenita is a large family of disorders characterized by multiple congenital joint limitations due to reduced fetal movements. The prevalence is estimated between 1/3000 and 1/12000 births. Molecular investigations by Dieterich et al. at the university Hospital of Grenoble/France and at Grenoble Institute of Neurosciences INSERM U836 revealed mutations of ECEL1 (endothelin-converting enzyme like 1) associated with a new and recognizable phenotype of distal arthrogryposis (Dieterich et al., 2013). In this study, we tested the enzymatic activity of missense mutations. We performed experiments to test their expression and their cellular localization. We developed a new enzymatic peptidase assay for ECEL1. A decrease of the activity was found for one mutation p. C760R, located inside the catalytic domain (p<0,001, n=4), confirming loss of function mechanism. All other missense mutations, located outside the catalytic domain, did not diminish the enzymatic activity of ECEL1 *in vitro* heralding a different pathological mechanism. Furthermore, we analyzed the phenotype-genotype correlation, using a severity score specifically designed for ECEL1 related arthrogryposis. We found that missense mutations yielded higher severity scores than non-sense and splice site mutations.

Keywords : arthrogryposis, ECEL1, endopeptidase, enzymatic peptidase assay, severity score, genotype-phenotype correlation