

# Identification de nouveaux variants ERF responsables de craniosynostoses : pathogènes ou non telle est la question

Yvan Marc<sup>1</sup>, Lucie Peyrat<sup>1</sup>, Mila Jovanovic<sup>1</sup>, Assia Amazit<sup>1</sup>, Corinne Collet<sup>1</sup>, Giovanna Paternoster<sup>2</sup>, Laurence Legeai-Mallet<sup>1</sup>, Emilie Dambroise<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire bases moléculaires et physiopathologiques des ostéochondrodysplasies, Université Paris Cité, INSERM UMR 1163, Institut Imagine, Paris  
<sup>2</sup> Service de neurochirurgie pédiatrique, Hopital Necker, Paris

## Résumé:

Les craniosynostoses (CS), se caractérisent par une fusion prématurée des sutures crâniennes, entraînant des déformations du crâne. Environ 3 % des cas de CS sont liés à des mutations de l'inhibiteur de transcription ETS2 Repressor Factor (ERF), régulé par ERK1/2 phosphorylé dont la fixation entraîne l'export d'ERF du noyau vers le cytoplasme. Récemment, deux nouvelles mutations ERF<sup>R386C</sup> et ERF<sup>P458H</sup>, situées entre le domaine d'interaction avec la protéine ERK1/2 et le domaine répresseur, ont été identifiées chez des patients atteints de CS, l'objectif de ce projet est de déterminer la pathogénicité de ces variants.

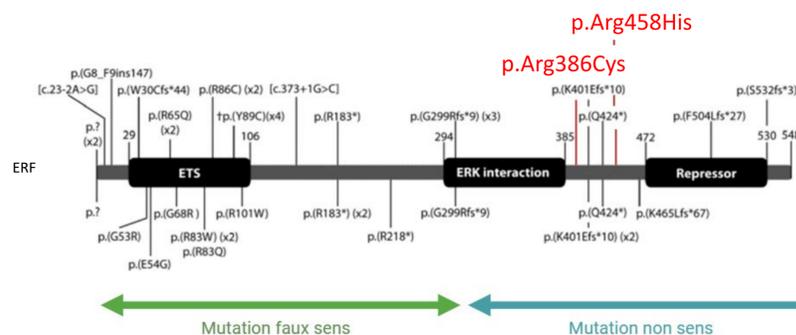
L'impact des mutations ERF<sup>R386C</sup> et ERF<sup>P458H</sup> sur l'interaction ERF/ERK1/2 a été évalué en transfectant des cellules HEK293T avec des plasmides ERF<sup>wt</sup>-GFP, ERF<sup>R386C</sup>-GFP ou ERF<sup>P458H</sup>-GFP et en analysant la localisation cellulaire de la GFP lorsque ERK1/2 est phosphorylé ou non. Les résultats révèlent une légère augmentation de la localisation cytoplasmique de ERF chez les mutants par rapport aux contrôles.

L'impact des mutations sur l'activité de ERF a été évalué grâce à la réalisation d'un test luciférase permettant d'étudier l'inhibition de la transcription du gène Runx2 en présence d'ERF sauvage ou mutée. Les résultats obtenus ont montré que les mutations d'intérêts n'affectent pas l'activité répressive d'ERF.

Actuellement, nous mettons en place un protocole de différenciation ostéoblastique à partir de biopsie de peau de patients afin de tester l'impact de ces mutations sur l'ostéogénèse.

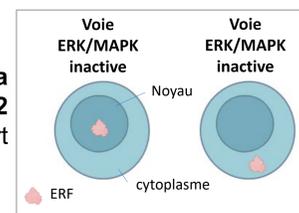
En conclusion, bien que les mutations ERF<sup>R386C</sup> et ERF<sup>P458H</sup> semblent affecter sensiblement l'interaction d'ERF avec ERK1/2, elles n'ont pas montré d'impact sur son activité transcriptionnelle. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou non leur pathogénicité.

## Introduction:



- Les variants **ERF p.Arg386Cys** et **ERF p.Arg458His** ont été trouvés respectivement chez des patients atteints d'une **craniosténose** complexe (fusion des sutures: lambdaïdoïde, sagittal et bicoronaux) et d'une scaphocépalie simple au sein de la cohorte du service de neurochirurgie de l'Hopital Necker.

- Le gene **ERF** code pour un **inhibiteur de la transcription régulé par ERK1/2 phosphorylé** dont la fixation entraîne l'export d'ERF du noyau vers le cytoplasme



- Au cours de l'ostéogénèse **ERF régule** l'expression du facteur de transcription **Runx 2 impliqué dans la différenciation ostéoblastique**

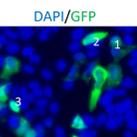
**Objectif du projet :** Etude de l'impact des variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His sur 1) l'interaction d'ERK1/2 avec ERF, 2) sur l'activité de ERF, et 3) sur la différenciation ostéoblastique.

## 1/ Impact des variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His sur la localisation cellulaire de ERF lorsque la voie MAPK/ERK est activée

### Matériels et méthodes:



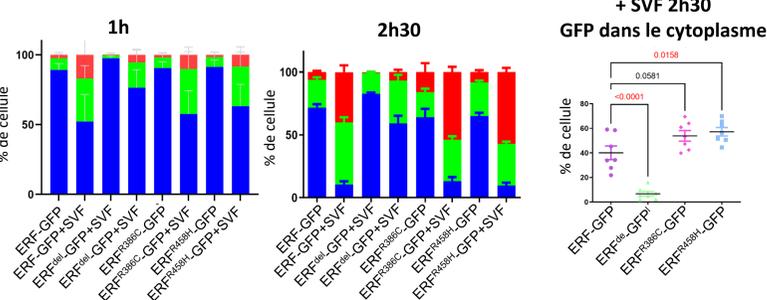
- Mutagenèse dirigée pour l'obtention des plasmides suivants:  
 p.CMV6-ERF<sup>del</sup>-GFP => délétion du domaine d'interaction avec ERK  
 p.CMV6-ERF<sup>R386C</sup>-GFP  
 p.CMV6-ERF<sup>P458H</sup>-GFP



- Transfection de cellules HEK293VNR
- Activation ou non de la voie ERK/MAPK grâce à l'ajout de Sérum de vœux foetal (SVF)
- Analyse de la localisation cellulaire de la GFP par microscopie et Western Blot (extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires) après stimulation avec du SVF pendant 1h ou 2h30.

1- Cytoplasme  
2- Ubiquitaire  
3- Noyau

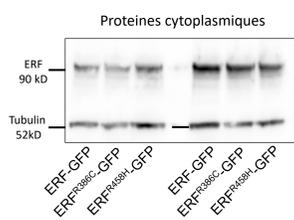
### Analyse de la localisation cellulaire de la GFP par microscopie :



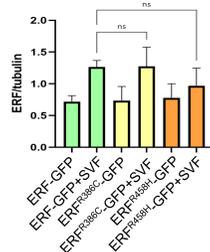
Transfection par plasmide n=7, Nombre de cellules analysées par transfection >100 Analyses statistiques: ANOVA

Les variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His semblent induire une augmentation de l'expression de la GFP dans le cytoplasme.

### Analyse de la localisation cellulaire de ERF par western blot :



n=4 par conditions, Analyse statistique: ANOVA



Aucune différence significative n'est observée concernant l'expression de ERF en présence des variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His dans le cytoplasme lorsque ERK/MAPK est activée.

## 2) Impact des variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His sur l'activité répressive d'ERF

### Matériels et méthodes :

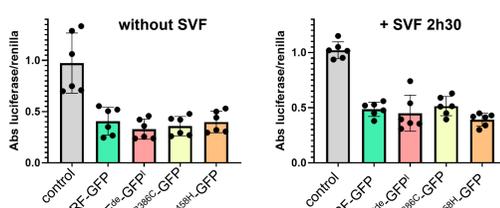
#### Mise en place d'un test luciférase



- Construction plasmidique pGL3.Runx2-luciférase
- Transfection de cellules HEK-293VNR :  
 p.CMV6-GFP  
 p.CMV6-ERF<sup>del</sup>-GFP  
 p.CMV6-ERF<sup>R386C</sup>-GFP  
 p.CMV6-ERF<sup>P458H</sup>-GFP

- + p. GL3Runx2-Luciférase
- Analyse de l'activité de la luciférase après stimulation ou non avec du SVF

#### Analyse de l'activité de la luciférase sous contrôle du promoteur Runx2 en présence des variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His



Les variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His ne semblent pas avoir d'effet sur l'activité répressive d'ERF.

## 3) Impact des variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His sur la différenciation ostéoblastique

### Matériels et méthodes:

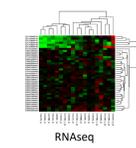
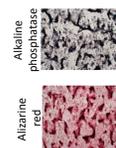
Obtention d'osteoblastes à partir de biopsies de peau des patients

Etude de la différenciation et de l'activité ostéoblastique



Protocole adapté de Yamamoto et al 2018

DMEM + bêta glycérol phosphate 10mM + dexaméthasone 100 nM + Alk5i II 4µM + ascorbic acid 5µg/mL



Protocole mis en place au laboratoire

Collectes des biopsies et analyses en cours

En conclusion, grâce à ce projet, nous avons mis en place des tests *in vitro* au sein du laboratoire pour évaluer l'impact des nouveaux variants d'ERF sur sa localisation et son activité. Cependant, les résultats obtenus pour les variants ERF p.Arg386Cys et ERF p.Arg458His n'ont pas permis de démontrer leur pathogénicité. Des analyses génétiques plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats. Par ailleurs, si l'obtention d'ostéoblastes à partir de biopsies de peau constitue une avancée importante car elle pourrait permettre de surmonter les difficultés liées à l'obtention de prélèvements osseux.