

Université de Montréal

**Études protéomiques et fonctionnelles des variants rares
responsables de la scoliose idiopathique de l'adolescent
(SIA)**

Par

Hélène MATHIEU

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

En Sciences Biomédicales

Option Médecine Expérimentale

Octobre 2021

© Hélène Mathieu, 2021

Université de Montréal
Unité académique : Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Études protéomiques et fonctionnelles des variants rares
responsables de la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent
(SIA)**

Présentée par
Hélène Mathieu

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Antonio Nanci
Président-rapporteur

Florina Moldovan
Directeur de recherche

Valérie Marcil
Membre du jury

Vincent Cunin
Examineur externe

Résumé

La scoliose est une déformation de la colonne vertébrale dans les trois plans de l'espace (frontal, sagittal et transverse), et la forme la plus fréquente est la scoliose idiopathique (SI) dont la cause est encore très mal comprise. La scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une forme de SI qui se développe au cours de la puberté, plus souvent chez les filles, et présente une importante hétérogénéité phénotypique. Les très nombreuses recherches afin de comprendre les mécanismes qui entrent en jeu dans le développement de cette maladie et afin de déterminer l'étiologie ont permis de mettre en évidence un très grand nombre de théories regroupant des facteurs endocriniens et métaboliques, des facteurs biomécaniques et musculosquelettiques, des facteurs neurologiques et vestibulaires ainsi que des facteurs génétiques et épigénétiques. L'identification du gène candidat *POC5* dans la SI par notre laboratoire, un gène crucial dans la formation du cil primaire, a été un tournant majeur apportant la première pièce d'un puzzle plaçant le cil primaire au centre des hypothèses concernant la mise en place de la maladie.

Le cil primaire est une organelle non-motile retrouvée à la surface de la totalité des cellules du corps humain à l'exception des cellules sanguines. Grâce à son axonème formé de tubuline capable de subir des modifications post-traductionnelles appelées « code tubuline » et sa membrane ciliaire ultra spécialisée, le cil primaire joue un rôle mécanosenseur important tout au long de la vie, dès le développement embryonnaire. Il prend part à de nombreux mécanismes dont la formation et l'homéostasie osseuse et a déjà été mis en cause dans les maladies osseuses. En effet, lorsque le cil primaire est défectueux, il est responsable de syndromes complexes regroupés sous le nom de ciliopathie dont un des symptômes est la scoliose.

L'hypothèse générale de la présente thèse est que des variants rares dans des gènes ciliaires, particulièrement le gène *POC5* et le gène *TLL11*, agissent sur les mécanismes cellulaires responsables de la mise en place de la SIA faisant d'elle une maladie appartenant à la grande

famille des ciliopathies. L'objectif de cette thèse a été de documenter l'implication et la pathogénicité des gènes *POC5* et *TLL11* dans la SIA. Nous avons d'abord déterminé la prévalence des variants du gène *POC5* dans une cohorte de patients d'origine franco-canadienne ou britannique atteints de SIA (*Manuscrit 1*). Ensuite, nous avons créé trois modèles de souris Knock-in pour l'équivalent des variants du gène *POC5* humain afin d'analyser la pathogénicité et le phénotype éventuel de ciliopathie (*Manuscrit 2*). Finalement, la pathogénicité du gène *TLL11* muté a été analysée dans des cellules issues de patients atteints de SIA et dans un modèle animal, le poisson zèbre (*Manuscrit 3*).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont montré que les deux gènes ciliaire *POC5* et *TLL11* sont des gènes candidats probablement impliqués dans les mécanismes cellulaires fondamentaux induisant la mise en place de la SIA et ont permis d'identifier un mécanisme, la polyglutamylation du cil primaire, comme étant relié à la SIA.

Mots-clés : *TLL11*, *POC5*, cil primaire, glutamylation, scoliose, ciliopathie

Abstract

Scoliosis is a 3D spinal curvature, in the frontal, sagittal and transverse plans, and the most common form is the idiopathic scoliosis (IS) with a cause that remains very poorly understood. Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS) is a subtype of IS that develops during the puberty, most commonly in girls, and has a significant phenotypic heterogeneity. To date, a large amount of research on scoliosis etiology highlighted various hypotheses based on endocrine and metabolic factors, biomechanical and musculoskeletal factors, neurological and vestibular factors, as well as genetic and epigenetic factors. The identification of the IS candidate gene *POC5* by our laboratory, a crucial gene in the formation of the primary cilium, was a major turning point bringing the first piece of a puzzle where the primary cilium is a central hypothesis concerning the onset of the disease.

The primary cilium is a non-motile organelle found at the cell surface of all the human body cells, except for blood cells. The primary cilium plays an important mechano-sensor role throughout life, from embryonic development through its axoneme composed by tubulin that hosted post-translational modifications called “tubulin code”, and its ultra-specialized ciliary membrane. It is involved in many mechanisms including bone formation and homeostasis and has already been implicated in bone diseases. Indeed, the defective primary cilium is responsible for human ciliopathy syndromes that are associated with scoliosis.

The main hypothesis of this thesis is that rare variants in ciliary genes, especially the *POC5* gene and the *TLL11* gene, participate on cellular mechanisms responsible for the onset of AIS supporting the idea that scoliosis is a form of ciliopathy. The specific objective of this thesis was to document the involvement and pathogenicity of the *POC5* and *TLL11* genes in AIS. We first determined the prevalence of *POC5* gene variants in a cohort of French-Canadian and British AIS patients ([Manuscript 1](#)). Then, we created three knock-in mouse models carrying the equivalent of the human *POC5* gene variants to analyze the pathogenicity and the possible phenotype of ciliopathy ([Manuscript 2](#)). Finally, the pathogenicity of the mutated *TLL11* gene

was analyzed in cells extracted from AIS patients and in an animal model, the zebrafish (*Manuscript 3*).

The work presented in this thesis showed that the two ciliary genes *POC5* and *TLL11* are candidate genes probably involved in the fundamental cellular mechanisms inducing the onset of AIS and allowed us to identify the primary cilium polyglutamylation, as a mechanism being related to AIS.

Keywords: *TLL11*, *POC5*, Primary cilia, glutamylation, scoliosis, ciliopathy

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	15
Liste des figures	16
Chapitre I. Introduction Générale.....	19
I.1. Le squelette humain.....	19
I.2. La Scoliose Idiopathique.....	20
I.2.1. La Scoliose idiopathique de l'adolescent	21
I.2.1.1. Les facteurs endocriniens et métaboliques.....	23
L'œstrogène	24
La mélatonine et la calmoduline.....	25
L'hormone de croissance	26
La leptine et l'adiponectine	26
La ghréline.....	27
I.2.1.2. Les facteurs biomécaniques et musculosquelettiques	29
I.2.1.3. Les facteurs neurologiques et vestibulaires	33
Anomalie du cerveau	33
Système vestibulaire	34
I.2.1.4. Les facteurs génétiques et épigénétiques.....	35
Les facteurs génétiques	36
Les facteurs épigénétiques	38
I.2.2. La Scoliose idiopathique de l'adolescent et les gènes ciliaires	40
I.2.2.1. Le gène <i>Kif6</i> (Kinesin family member 6).....	40
I.2.2.2. Le gène <i>Ptk7</i> (protéine tyrosine kinase-7).....	41
I.2.2.3. Le gène <i>TBX6</i> (T-box transcription factor 6).....	42

I.2.2.4. Le gène <i>FGFR3</i> (Fibroblast Growth Factor Receptor 3)	42
I.2.2.5. Le gène <i>LBX1</i> (ladybird homeobox 1)	43
I.2.2.6. Le gène <i>POC5</i> (Protein centriolar 5)	43
I.3. Le cil	45
I.3.1. Le cil primaire	45
I.3.1.1. Composition du cil primaire	46
I.3.1.2. Le transport intraflagellaire	47
I.3.1.3. Formation du cil primaire : la ciliogenèse	48
I.3.1.4. Fonction du cil primaire	49
I.3.3. Le code tubuline	50
I.3.4. Cil primaire et tissu osseux/maladies osseuses	53
I.4. Les modèles animaux de scoliose idiopathique	54
I.4.1. Modèles mécaniques et neuroendocriniens	55
I.4.1.1. Animaux quadrupèdes	55
I.4.1.2. Animaux bipèdes	56
I.4.2. Modèles génétiques et manipulation du génome	57
I.5. Hypothèses et objectifs	61
I.5.1. Hypothèses de recherche	61
I.5.2. Objectifs de recherche	61
Chapitre II. Matériels et méthodes	65
II.1. Analyses génétiques humaines	65
II.1.1. Recrutement des patients	65
II.1.2. Séquençage d'exome	65
II.2. Études des tissus humains	66
II.2.1. Culture cellulaire, RT-qPCR et Western Blot	66
II.2.2. Immunofluorescence	66
II.3. Études animales	67
II.3.1. Approbation des études animales	67
II.3.2. Chez la souris	67

Création de souris génétiquement modifiées	67
Analyse du phénotype osseux des souris	68
Extraction des ostéoblastes des colonnes vertébrales des souris	68
Caractérisation des ostéoblastes.....	69
Extraction des organes ciliaires et analyse histologique	69
II.3.3. Chez le poisson zèbre	70
Maintenance et création des poissons zèbres mutants.....	70
Phénotypage	70
II.4. Analyses statistiques	71
Chapitre III. Premier article scientifique - Genetic Prevalence of POC5 Mutations in AIS French-Canadian and British Cohort	72
III.1. Description de l'article et contribution des auteurs	72
III.2. Abstract	74
III.3. Introduction.....	74
III.4. Materials and Methods	75
III.4.1. Patients.....	75
III.4.2. Targeted Exome Sequencing	76
III.4.3. Whole-Exome Sequencing.....	76
III.4.4. Validation with Sanger Sequencing.....	77
III.4.5. Statistics.....	77
III.5. Results	78
III.5.1. Patient Enrolment	78
III.5.2. <i>POC5</i> Variants Prevalence Using Next-Generation Sequencing	78
III.5.3. Segregation Analysis of <i>POC5</i> Coding Variants With AIS	79
III.6. Discussion	81
III.7. Conclusion	82
III.8. Acknowledgments	83
III.9. References.....	84

Chapitre IV. Second article scientifique - Phenotypic Characterisation of POC5 Mutant Mice

Models of Adolescent Idiopathic Scoliosis.....	88
IV.1. Description de l'article et contribution des auteurs.....	88
IV.2. Abstract	91
IV.3. Introduction	91
IV.4. Material and Method.....	93
IV.4.1. Animal Study Approval.....	93
IV.4.2. Mutant Mice Line Generation.....	93
IV.4.3. DNA Extraction and Genotyping	95
IV.4.4 Bone phenotype analysis	96
IV.4.5. Spinal Osteoblast Extraction and Culture	96
IV.4.6. Alkaline Phosphatase Assay	97
IV.4.7. Alizarin Red Assay.....	97
IV.4.8. Cell Proliferation Assay	98
IV.4.9. Immunofluorescence assay.....	98
IV.4.10. Ciliary Organs Extraction and Histology.....	98
IV.4.11. Statistical Analysis	99
IV.5. Results.....	99
IV.5.1. Mutant Mice Line.....	99
IV.5.2. The mutant mouse line showed modified bone phenotype compared to control mice.	99
IV.5.3. <i>Poc5</i> Mutant Spinal Osteoblasts Showed an Impaired Osteoblastic Activity, Proliferation and Ciliogenesis.....	100
IV.5.3. Histological Analysis of the Ciliary Organs isolated from the <i>Poc5</i> Mutant Mice Lines Showed Tissue Alteration Compared to the WT Mice.....	101
IV.6. Discussion.....	101
IV.7 Acknowledgments.....	106
IV.8. References	106
IV.9. Figures legends	110

IV.10. Figures.....	112
IV.11. Supplementary data.....	116
Chapitre V. Troisième article scientifique - Genetic Variant of <i>TLL11</i> Gene and Subsequent Ciliary Defects Are Associated With Idiopathic Scoliosis in a 5-Generation UK Family.....	117
V.1. Description de l'article et contribution des auteurs.....	117
V.2. Abstract.....	120
V.3. Introduction	120
V.4. Material and Methods	122
V.4.1. Patients.....	122
V.4.2. Whole Exome Sequencing.....	122
V.4.3. Sanger Sequencing	123
V.4.4. <i>TLL11</i> -Exome Sequencing.....	123
V.4.5. Validation With Sanger Sequencing.....	124
V.4.6. Cell Culture	124
V.4.7. Genomic DNA Extraction.....	124
V.4.8. RNA Isolation and RT-qPCR.....	125
V.4.9. Protein Extraction and Western Blot	125
V.4.10. Immunofluorescence	126
V.4.11. Zebrafish Maintenance	126
V.4.12. <i>Tll11</i> knockdown in Zebrafish	126
V.4.13. <i>Tll11</i> Mutant Zebrafish.....	127
V.4.14. Three-Dimensional Imaging and Reconstruction	127
V.4.15. Retinal Histology and Immunostaining.....	128
V.4.16. Statistical Analysis	128
V.4.17. Study Approval	128
V.5. Results.....	129
V.5.1. Identification of a Rare Variant in <i>TLL11</i> Gene.	129
V.5.2. <i>TLL11</i> Localisation and Ciliogenesis	130
V.5.3. <i>TLL11</i> is Required for Proper Long Glutamate Side Chains.....	131

V.5.4. <i>Ttll11</i> Is Implicated in Zebrafish Spinal Development.....	132
V.5.5. <i>Ttll11</i> Is implicated in Retinal Integrity in Zebrafish	133
V.6. Discussion.....	133
V.7. Acknowledgements.....	138
V.8. References	139
V.9. Figures Legends.....	150
V.10. Figures.....	154
V.11. Supplementary Data	161
Chapitre VI. Discussion.....	169
Limites et Perspectives	180
Conclusion.....	184
Références Bibliographiques	187
<i>Annexe 1.</i> Arbres généalogiques des familles atteintes de SIA recrutées par notre laboratoire en collaboration avec les médecins orthopédistes du CHU Sainte-Justine, QC.....	210
<i>Annexe 2.</i> L'élongation des cils primaires requiert les longues chaînes de polyglutamate générées par TLL11	216

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1. Liste des gènes identifiés par analyse de GWAS ou par analyse de liaison chez des individus atteints de SIA..... 37

Chapitre III

Table III.1. *POC5* Coding Variant Distribution Among the French-Canadian and British AIS Cohort Compared to 1268 Controls..... 79

Chapitre IV

Table IV.1. Nucleotide Sequences Used For the Mutant *Poc5* Mutant Mouse Lines..... 94

Chapitre V

Supplementary Table V.1. List of the Rare *TTLL11* SNPs Reported by EVS Database. 163

Supplementary Table V.2. List of the SNPs Identified by AmpliSeq in *TTLL11* Gene From a French-Canadian and British AIS Population. 164

Supplementary Table V.3. Clinical Data of Affected Female Members of IS Patients From Family SC32, Patient SC203 and SC217 (Ocaña et al., 2008)..... 165

Supplementary Table V.4. qPCR Primers and PCR Primers for *TTLL11* mRNA Detection and Sequencing Analysis Respectively..... 166

Liste des figures

Chapitre I

<i>Figure I.1.</i> La scoliose idiopathique.....	20
<i>Figure I.2.</i> Étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent.....	23
<i>Figure I.3.</i> Représentation schématique des principaux mécanismes induits par les facteurs endocriniens et métaboliques chez les patients atteints de SIA.....	29
<i>Figure I.4.</i> Mise en place des courbures rachidiennes.	29
<i>Figure I.5.</i> Zones de la plaque de croissance.	30
<i>Figure I.6.</i> Structure générale du cil primaire.	47
<i>Figure I.7.</i> Représentation schématique du « code tubuline ».	51
<i>Figure I.8.</i> Représentation de la transmission des informations de proprioception.....	55

Chapitre III

<i>Figure III.1.</i> Pedigrees of French-Canadian Families Showing the Co-Segregation of <i>POC5</i> Variants (c. 1286C > T (p.(A429V)) and c.1336G > A (p.(A446T)) With the Disease.	80
--	----

Chapitre IV

<i>Figure IV.1.</i> Alignment of <i>POC5</i> Protein Sequences in Various Species.	110
<i>Figure IV.2.</i> Mutant C57BL/6N ^{-poc5emA413V-A430T} Mice Are Affected by Kyphosis.	110
<i>Figure IV.3.</i> <i>Poc5</i> Mutant Spinal Osteoblasts Showed an Impaired Osteoblastic Activity, Proliferation and Ciliogenesis.	110
<i>Figure IV.4.</i> Hematoxylin and Eosin (H&E)-Stained Ciliary Organs of <i>Poc5</i> Mutant Mice and WT One-Month-Old Mice.....	111
<i>Figure IV.5.</i> Hematoxylin and Eosin (H&E)-Stained Liver of <i>Poc5</i> Mutant Mice and WT One-Month-Old Mice.....	111
<i>Supplementary Figure IV.1.</i> MicroCT Lateral Images of Mutant <i>Poc5</i> Mice, C57BL/6N ^{-poc5emA413V} and C57BL/6N ^{-poc5emA413V-A430T} did not Develop 3D Spine Curvature During the Adolescence Period Compared to C57BL/6N ^{WT} Mice.	116

Supplementary Figure IV.2. Bone Mineral Density of Mutant *Poc5* Mice, C57BL/6N^{-poc5emA413V} and C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T} did not Reveal any Significant Changes Compared to Control Mice. 116

Chapitre V

Figure V.1. Pedigree of UK Family SC32 in Which a Putative Gene Mutation Has Been Found. 150

Figure V.2. WT and Mutant TTLL11 mRNA Expression After Starvation. 150

Figure V.3. WT and Mutant TTLL11 Protein Expression After Starvation. 150

Figure V.4. Cilia Elongation Requires Long Polyglutamate Chain Generated By TTLL11..... 151

Figure V.5. Knockdown of *ttl11* Leads to Scoliosis Phenotype in Zebrafish Larvae. 151

Figure V.6. Effect of *ttl11*-mut in Zebrafish Body Axis and Lethality..... 152

Figure V.7. Hematoxylin and Eosin (H&E)-Stained Retina of WT and Mutant *ttl11* Adult Zebrafish. 152

Figure V.8. Effect of Mutant *ttl11* on Adult Zebrafish Rod and Cone Photoreceptors. 152

Supplementary Figure V.1. Cosegregation of the *9q31.2-q34.2* Locus With AIS in SC32 Family. 161

Supplementary Figure V.2. Pedigree of UK Family SC203 and SC217 in Which Putative Gene Mutations Has Been Found..... 162

Supplementary Figure V.3. Protein Polyglutamylation of Wild Type (DE0194) and Mutant (DE0193) Fibroblasts..... 167

Chapitre I. Introduction Générale

I.1. Le squelette humain

Le corps humain est soutenu et protégé par une charpente osseuse composée de 206 os : le squelette humain. Celui-ci peut être divisé en deux parties : le **squelette appendiculaire** qui regroupe les membres supérieurs et inférieurs ainsi que les ceintures qui les relient au **squelette axial**, lui-même composé par les os du crâne, la colonne vertébrale et la cage thoracique.

La colonne vertébrale est formée d'une alternance entre vertèbre et disque intervertébral soutenue par des tissus mous qui sont principalement les ligaments et les muscles paravertébraux. Elle se compose de 33 vertèbres reliant le crâne au pelvis et qui protègent la moelle osseuse : 7 vertèbres cervicales, 12 vertèbres thoraciques, 5 vertèbres lombaires, 5 vertèbres sacrées (soudées entre elles) et 4 vertèbres coccygiennes (soudées entre elles).

La croissance de la colonne vertébrale se déroule en 3 étapes distinctes : au cours de la période embryonnaire, les éléments qui constituent le rachis se mettent en place. S'en suit la période fœtale au cours de laquelle l'ossification débute, puis en postnatal, principalement entre 0 et 5 ans et au cours de la puberté, l'ossification continue jusqu'à atteindre la maturité osseuse. L'ossification complète du rachis résulte alors de la croissance synchrone de plus de 130 plaques de croissances, aussi appelées cartilages de croissance. Leur croissance est finement régulée par différents facteurs : biomécaniques(1), hormonaux(2), vasculaires(3) et génétiques. Le moindre défaut dans cette régulation peut mener à des déformations complexes de la colonne vertébrale dans les 3 dimensions, que l'on nomme scoliose.

Selon leur étiologie, les scolioses sont classifiées en 3 groupes :

- Les **scolioses congénitales** (SC), dues à des malformations congénitales des vertèbres.
- Les **scolioses neuromusculaires**, secondaires à des défauts du système nerveux et musculaire.
- Les **scolioses idiopathiques** (SI), reconnues pour se développer après la naissance, sans défaut anatomique ou neuromusculaire, et dont l'étiologie est inconnue.

I.2. La Scoliose Idiopathique

La scoliose est une déformation dans les trois dimensions de la colonne vertébrale, soit la combinaison d'une lordose, d'une flexion latérale et d'une rotation axiale des vertèbres(4). La cage thoracique étant étroitement liée avec la colonne vertébrale, la rotation des vertèbres thoraciques induit une rotation des côtes ce qui entraîne une déformation de la cage thoracique, ainsi qu'une bosse dans le dos appelée gibbosité. La gibbosité est le signe clinique caractéristique permettant de suspecter la présence de la scoliose (*Figure I.1.*). Le diagnostic de scoliose est ensuite confirmé radiologiquement, en effet la déviation latérale de la colonne vertébrale est mesurée par l'angle de Cobb(5) qui doit être d'au moins 10°.

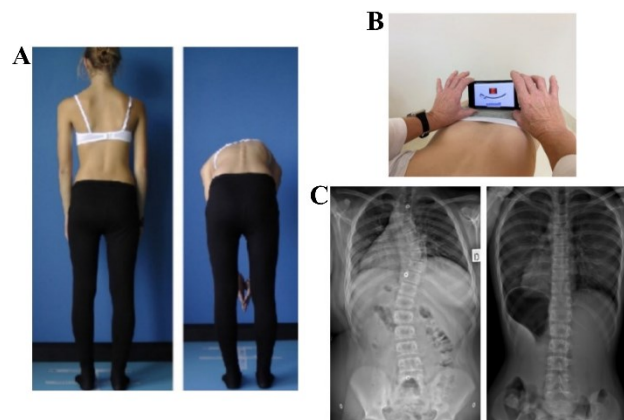


Figure I.1. La scoliose idiopathique.

A. Signes cliniques de la scoliose idiopathique : asymétrie du tronc et déviation latérale de la colonne vertébrale dans le plan frontal, rotation du tronc dans le plan horizontal caractérisée par une gibbosité (Kotwicki et al, 2013(6)). B. Dépistage de la SI à l'aide de l'application

Scolioscreen ou Scoliosis Measurement. C. Radiographie d'une colonne vertébrale avec scoliose et sans scoliose(7).

Dans 80% des cas, les scolioses sont idiopathiques (SI MIM 181800) car leur étiologie est inconnue(8), les 20% restant présentent une origine neuromusculaire, syndromique ou congénitale. Le terme de « scoliose idiopathique » a été proposé pour la première fois en 1922 par Kleinberg(9). Les SI sont classées en fonction de la tranche d'âge où la déformation se manifeste(10). Plus cette déformation se produit dans le jeune âge et plus le risque de progression et de sévérité est élevé. Ainsi nous distinguons les SI :

- **Infantiles**, dont l'âge d'apparition se situe entre 0 et 3 ans
- **Juveniles**, dont l'âge d'apparition se situe entre 4 et 10 ans
- **Adolescentes**, dont l'âge d'apparition se situe entre 11 et 18 ans(11).

I.2.1. La Scoliose idiopathique de l'adolescent

La scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) représente environ 80% des SI diagnostiquées chez les adolescents(12) et possède une prévalence qui varie de 0.47 à 5.2% dans la population générale(13-15), une prévalence de 3% est cependant communément acceptée(8). Cette différence de prévalence peut être expliquée par la grande variabilité des critères d'inclusions des cohortes étudiées ainsi que du design expérimental. La prévalence est notamment fortement reliée aux latitudes. En effet, plus on s'éloigne de l'équateur, plus l'ensoleillement et la production de mélatonine diminuent et plus la prévalence de la SIA augmente(16). De plus, la SIA affecte préférentiellement les filles avec un ratio d'environ 7 filles pour 1 garçon dans le cas de courbures sévères ($>40^\circ$)(15), suggérant un rôle important des hormones pubertaires féminines, dont l'estrogène. La SIA est progressive, elle se développe au cours de la puberté et peut progresser jusqu'à ce que la maturité osseuse soit atteinte (mesurée par le test de Risser). Il a été montré que les jeunes filles atteintes de scoliose étaient plus grandes et leur croissance était plus rapide que la moyenne(17). Ce phénomène s'explique par le fait que la SIA progresse surtout au cours d'un pic de croissance rapide, et les jeunes filles grandissent très rapidement jusqu'à leurs premières règles, après quoi, la croissance ralentit.

Plusieurs facteurs de risques sont décrits pour ce défaut et les 3 principaux sont : le **sexe du patient** (féminin ou masculin), le **potentiel de croissance** ainsi que le **degré de la courbure** à l'âge du diagnostic(18). Les courbures observées chez les individus atteints de SIA sont très hétérogènes et peuvent être classées selon le **type de courbure** (thoracique, thoraco-lombaire par exemple), l'**âge d'apparition**, la **progression de la déformation** et la **sévérité** (angle de Cobb).

La SIA n'est pas seulement un problème esthétique, elle diminue la qualité de vie, notamment au niveau psychologique et financier et elle est associée à différentes complications médicales. En effet, la scoliose présente une évolution arthrosique et lorsqu'elle est non traitée, la SIA peut entraîner une raideur et une perte de mobilité, des douleurs au niveau du dos et dans les cas les plus sévères, des complications respiratoires et cardiaques. Les traitements actuels, orthopédiques ou chirurgicaux, sont très longs et très lourds, ils visent exclusivement les symptômes et non la cause, c'est-à-dire à corriger et ralentir la progression de la courbure. Les thérapies actuelles sont en fonction de la sévérité de la courbure (Fondation Yves Cotrel(19)). En effet, pour des courbures de moins de 30° chez des individus en pleine croissance, la base du traitement orthopédique est le port d'un corset rigide, une contention externe, appliquant des forces dans le but de stopper la progression de la scoliose et, dans le meilleur des scénarios, la corriger. Le port du corset doit se faire pendant toute la période de croissance, 23 heures par jour, ce qui en fait un traitement contraignant et difficilement acceptable pour des adolescents. Dans le cas de courbures trop sévères, ne répondant pas de manière positive au traitement par corset, ou dans le cas d'une maturité osseuse trop avancée, les patients doivent subir une opération chirurgicale lourde et très invasive. Cette opération a longtemps consisté à fusionner les vertèbres grâce à des tiges métalliques qui sont attachées à la colonne vertébrale à l'aide de vis chirurgicales(20). Plus récemment, des techniques chirurgicales moins invasives ont été développées, notamment la chirurgie de modulation de croissance(21). Cette technique consiste à poser des implants sur les vertèbres afin de les relier à l'aide d'un câble, sans fusion. La chirurgie se doit d'être une solution de dernier recours, car malgré les progrès

considérables, il existe des risques de complications plus ou moins graves, notamment au niveau neurologique.

De nombreuses études sont menées pour mieux comprendre la maladie, son évolution et identifier les causes de la SIA. Plusieurs facteurs impliqués dans la physiopathogénèse de cette maladie complexe ont à ce jour été mis en évidence. Malgré le fait qu'ils soient plus ou moins interconnectés, ils peuvent se regrouper en catégories distinctes : **des facteurs endocriniens et métaboliques**, **des facteurs biomécaniques et musculosquelettiques**, **des facteurs neurologiques et vestibulaires**(22, 23), ainsi que **des facteurs génétiques et épigénétiques** (Figure 1.2).

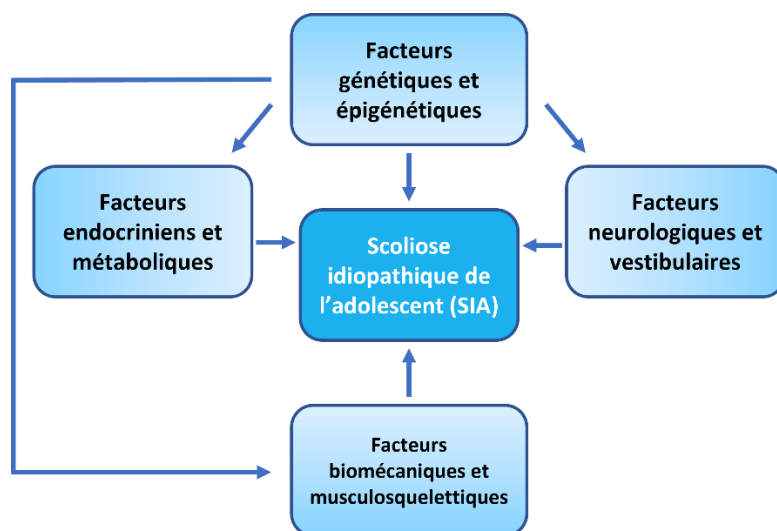


Figure 1.2. Étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent.

De nombreux facteurs ont été associés au développement de la SIA et peuvent être classés en quatre grandes catégories qui sont les facteurs endocriniens et métaboliques, neurologiques et vestibulaires, biomécaniques et musculosquelettiques, ainsi que les facteurs génétiques et épigénétiques. Tous ces facteurs interfèrent les uns avec les autres et sont plus ou moins interconnectés.

1.2.1.1. Les facteurs endocriniens et métaboliques

L'analyse des paramètres hormonaux a permis de mettre en lumière l'implication non négligeable de différentes hormones, tant grâce au dosage chez les patients atteints de SIA en

comparaison à des populations contrôles que par l'identification de polymorphismes dans les gènes codant pour ces hormones, ou bien, les gènes codant pour les récepteurs à ces hormones. En effet, le fait que la SIA touche préférentiellement les jeunes filles a ouvert la piste de l'implication des hormones sexuelles féminines (estrogène). De plus, il est largement connu que les individus atteints de SIA présentent des caractères anthropomorphiques modifiés par rapport à la population générale, ils sont de plus grande taille, ont une plus faible densité osseuse systémique et ils ont un indice de masse corporelle plus faible. Ces caractères sont dépendants d'hormones impliquées dans la croissance et dans l'homéostasie énergétique (la régulation de l'appétit, la sensibilité à l'insuline, la dépense énergétique(24)). L'homéostasie énergétique influence la formation de l'os et la densité osseuse(25) *via* différentes hormones, notamment la leptine, l'adiponectine, les hormones gastro-intestinales(26) comme l'hormone de croissance, et la ghréline. Enfin, des études sur les modèles animaux ont permis d'identifier l'implication de la mélatonine, la calmoduline et la vitamine D dans le développement de la SIA.

L'œstrogène

De nombreuses recherches ont été menées pour tenter de comprendre le rôle de l'œstrogène dans le développement de la SIA, notamment du fait que la maladie touche significativement plus les filles que les garçons au cours d'une période cruciale : la puberté. Une déficience en œstrogène induit d'une part une ménarche tardive, retardant le développement osseux, et d'autre part, affecte directement le métabolisme et le remodelage osseux induisant une croissance osseuse anormale qui pourrait être impliquée dans le développement de la SIA. En effet, les cellules issues de patientes atteintes de SIA présentent une réponse altérée à l'œstrogène ce qui induit un retard de menstruation et de l'ostéopénie, impactant la maturation osseuse(27, 28). Cet effet est médié par la régulation de l'expression des facteurs ostéoprotégérine (OPG) et RANKL (Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire Kappa-B) (*Figure 1.3*). Certaines études ont rapporté des taux d'estrogène sanguins plus faibles chez les patientes atteintes de SIA(29, 30), alors que d'autres analyses n'ont observé aucune différence par rapport à la population contrôle(31). Il a aussi été proposé que le récepteur à

l'œstrogène pourrait être impliqué dans le développement des plaques de croissance et donc dans la formation de l'os. De plus, des polymorphismes dans le gène du récepteur à l'œstrogène *ESR1* ont été associés à la SIA(32-34). Malgré les preuves du rôle de l'œstrogène et de son récepteur dans la croissance saine de la colonne vertébrale, les mécanismes qui entrent en jeu doivent toujours être clairement identifiés.

La mélatonine et la calmoduline

La mélatonine a été pour la première fois décrite dans la SIA en 1983 par Dubousset et al(35), dont l'équipe a démontré qu'une pinéalectomie chez le poulet induisait la déformation de la colonne vertébrale. Ce modèle animal est historiquement le premier modèle de scoliose qui a été créé(36). En effet, la mélatonine est une hormone sécrétée par la glande pinéale selon un cycle circadien et est impliquée dans la prolifération des ostéoblastes. Par conséquent, elle joue un rôle dans la réduction de la prolifération des ostéoclastes *via* la sécrétion de l'ostéoprotégérine par les ostéoblastes(37). Suite à ces expériences, il a été démontré que les patients atteints de SIA avaient un taux de mélatonine circulant plus faible qu'une population contrôle(38). L'implication d'un déficit en mélatonine dans la physiopathogénèse de la SIA est controversée, car difficilement reproductible(39, 40). Les expériences de pinéalectomie juste après l'éclosion chez la poule ont montré une augmentation du taux de scolioses(36, 41-43), même si Man et al(44), suspectait que la chirurgie pouvait être à l'origine de la scoliose. Il a ensuite été proposé qu'une perturbation du cycle de sécrétion de la mélatonine induite par un déséquilibre de l'activité du noyau suprachiasmatique/glande pinéale serait en cause plutôt qu'une déficience en mélatonine(45). De plus, des anomalies dans le gène codant pour le récepteur à la mélatonine 1B (*MT2*) ont été identifiées comme étant des facteurs de risque pour la SIA(46). En plus d'affecter la prolifération des ostéoblastes, une diminution de l'expression du récepteur *MT2* à la surface des chondrocytes des plaques de croissance altère leur capacité de prolifération et de différenciation pouvant induire une ossification endochondrale anormale(47). La mélatonine est aussi connue pour diminuer l'ostéoclastogénèse et augmenter l'apoptose des ostéoclastes *via* la régulation de l'expression des facteurs OPG et RANKL (*Figure 1.3*).

Des anomalies de l'expression des ATPases calciques à la surface des plaquettes et des ostéoblastes de patients atteints de SIA ont été rapportées. Ceci suggère un défaut de la différenciation cellulaire impliquant la caspase-3, et ce système est régulé par la calmoduline(48). La calmoduline est une hormone qui participe à différents systèmes biologiques, notamment au sein des systèmes contractiles, grâce à son habilité à lier les ions calcium, et participe à l'agrégation plaquettaire. C'est aussi un inhibiteur de la mélatonine(37). Cette hormone pourrait être impliquée dans le développement de la SIA *via* son rôle au niveau des muscles paraspinaux et de la formation osseuse. De plus, le taux de calmoduline plaquettaire est relié à la progression de la courbure(49-51) mais les différentes études montrent une grande variabilité, et les mécanismes en jeu sont encore flous, semant la controverse(52).

L'hormone de croissance

Chez les patients atteints de SIA, il a été montré que le taux de GH (hormone de croissance) était supérieur à la normale(53), et il est maintenant largement accepté que ces patients sont plus grands que la moyenne(54, 55). De plus, des polymorphismes dans le gène codant pour le récepteur de l'hormone de croissance ont été associés à la SIA(56, 57). La GH est essentielle à la croissance en général et des défauts dans la voie de signalisation de cette hormone entraînent une croissance anormale du squelette et de la colonne vertébrale.

La leptine et l'adiponectine

Comme pour les hormones précédentes, l'implication de la leptine au sein de la SIA est mal comprise. Cette hormone, sécrétée par les adipocytes, régule la prise alimentaire, le métabolisme énergétique, le stockage des graisses et elle joue un rôle central et périphérique dans la régulation de la formation de l'os(52), sous le contrôle des noyaux hypothalamiques et du système nerveux sympathique(58). La leptine régule la fonction des chondrocytes et la différenciation ostéogénique des cellules souches *via* sa liaison avec son récepteur, le LEP-R présent notamment au niveau des nerfs sympathiques. En effet, une diminution du taux de leptine diminue la tension du nerf sympathique et augmente la résorption osseuse(59) (*Figure*

1.3). Chez les individus atteints de SIA, le taux de leptine circulant est diminué (60), la voie de signalisation de la leptine est perturbée, et une hyposensibilité à cette hormone est observée. Cependant, la diminution de leptine circulante serait probablement un résultat secondaire à la plus faible adipogénèse des patients(61). L'hyposensibilité à la leptine pourrait s'expliquer par la diminution de ses récepteurs à la surface des cellules, notamment au niveau des chondrocytes, induite par un déséquilibre entre l'endocytose et l'insertion de récepteurs nouvellement synthétisés au niveau de la membrane plasmique(62). La leptine est aussi impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique, fortement suspecté comme étant anormal chez les patients atteints de SIA(63). Enfin, la leptine est impliquée dans le développement musculaire et pourrait jouer un rôle dans le développement asymétrique des muscles paraspinaux favorisant ainsi la progression de la scoliose(64).

L'adiponectine est une hormone qui est également sécrétée par le tissu adipeux et elle possède des fonctions anti-inflammatoires, antiathérogènes ainsi que sensibilisantes à l'insuline(65). Similairement à la leptine, l'adiponectine joue un rôle dans la régulation de la balance énergétique et elle est aussi reliée à la formation du muscle. Jiang et al, ont rapporté une expression différentielle de l'adiponectine dans les muscles paraspinaux(66) de patients atteints de SIA, ce qui jouerait un rôle dans le développement asymétrique des muscles paraspinaux entre le côté concave et convexe. De plus, l'adiponectine prend part à la régulation de l'ostéoclastogénèse et de la résorption osseuse *via* son rôle dans la régulation de l'expression des deux facteurs OPG et RANKL (*Figure 1.3*). Ainsi, Zhang et al ont montré que l'adiponectine sérique était augmentée chez les patients atteints de SIA de leur cohorte, ce qui contribuerait à la diminution de la densité osseuse(67).

La ghréline

La ghréline est sécrétée à jeun par l'estomac et régule le métabolisme énergétique, l'appétit(68-70), la sécrétion d'hormone de croissance, les sécrétions gastriques et la motilité gastro-intestinale ainsi que l'homéostasie du glucose(71). La ghréline possède également des fonctions cardiovasculaires, anti-inflammatoires, reproductives, et dans la formation de

l'os(71, 72). Plusieurs études ont montré une augmentation du taux de ghréline chez les patients atteints de SIA(64, 73-75). Yu et al(74) ont pu observer que les taux de ghréline étaient proportionnellement reliés à la sévérité de la courbure. Cependant, les mécanismes par lesquels cette hormone entrerait en jeu dans le développement de la SIA sont hypothétiques. Liang et al, ont mis en évidence la corrélation entre un taux élevé de ghréline et le développement anormal du cartilage chez les patients atteints de SIA(76). En effet, cette hormone joue un rôle dans l'ossification endochondrale et la différenciation des chondrocytes hypertrophiques(77, 78). Cette hormone entre en jeu dans l'activation de la voie Akt et NF-κB et dans l'expression de protéine de la matrice cartilagineuse(79). Il a aussi été démontré récemment que la ghréline active la prolifération des chondrocytes primaires *via* l'activation de la voie de signalisation ERK/STAT3 chez les patients atteints de SIA(76) ainsi que la réduction de la différenciation ostéogénique *via* son rôle dans la voie de signalisation OPG/RANKL(80) (*Figure I.3*). Plus d'analyses doivent être menées pour élucider les mécanismes par lesquels la ghréline aurait un impact sur le développement du cartilage et la densité osseuse dans le cadre de la SIA.

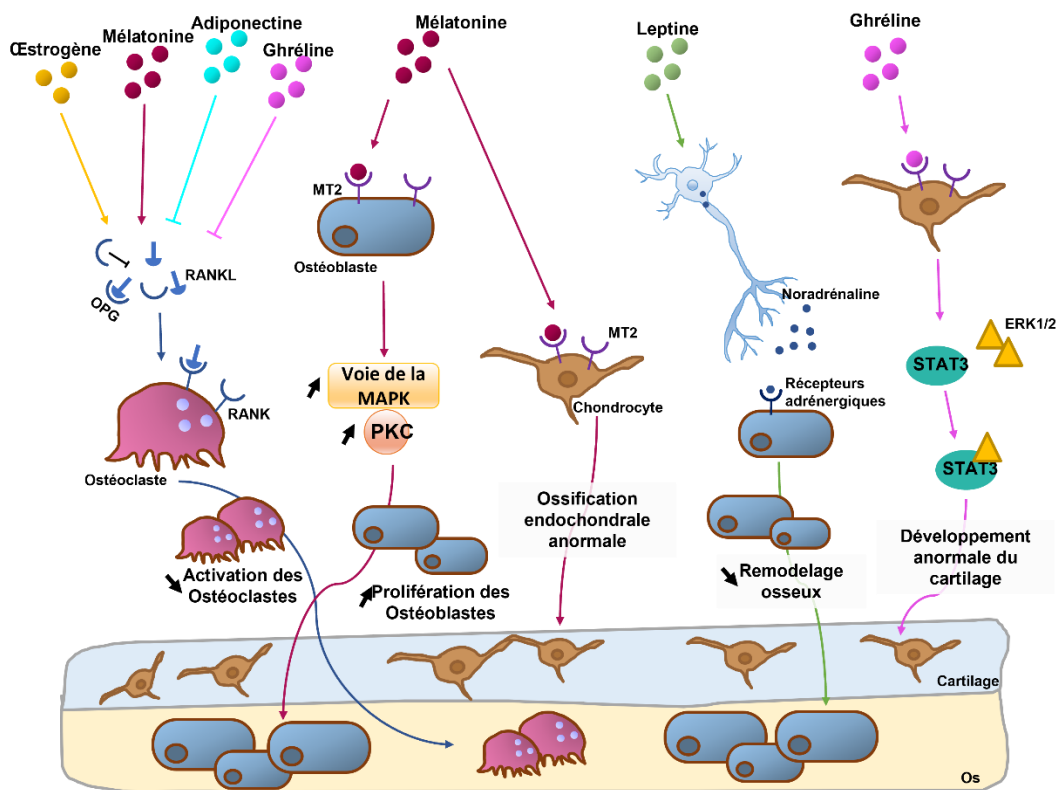


Figure 1.3. Représentation schématique des principaux mécanismes induits par les facteurs endocriniens et métaboliques chez les patients atteints de SIA.

Adapté de Liang et al, 2021(64)

I.2.1.2. Les facteurs biomécaniques et musculosquelettiques

La SIA est considérée comme une maladie spécifiquement due à la posture érigée de l'Homme(81-83) qui engendre des charges biomécaniques sur l'axe vertical du corps. À la naissance, l'enfant possède une seule courbure, comme nos ancêtres primates, caractérisée par l'angle sacro-vertébral qui sépare la région sacrée de la région lombaire (Figure 1.4). La lordose cervicale se développe lorsque l'enfant commence à soutenir sa tête et la lordose lombaire se développe lorsque l'enfant commence à marcher (Figure 1.4). Ces deux dernières courbures sont spécifiques de la posture érigée de l'Homme et elles permettent une plus grande flexibilité et stabilité du rachis. Ainsi, une quelconque asymétrie peut engendrer une déformation de la colonne vertébrale.

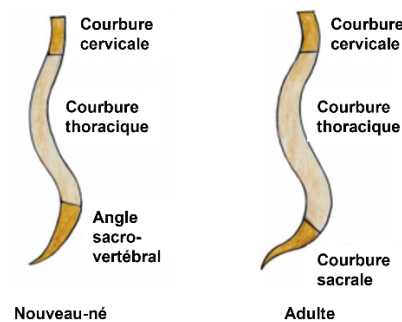


Figure 1.4. Mise en place des courbures rachidiennes.

Les courbures cervicale et thoracique sont acquises au cours des premières années de vie, suite au port de tête et de la marche. (Adapté de Dimeglio et al, 1990(84))

Une des principales théories biomécaniques est basée sur la loi d'Hueter-Volkman. Cette théorie décrit une vitesse de croissance endochondrale des cartilages de croissance qui est diminuée sous une forte pression, alors qu'elle est augmentée sous des forces de pression plus faibles(85, 86). Selon cette théorie, la SIA serait initiée par des charges asymétriques s'exerçant sur la colonne vertébrale, ou encore une asymétrie du tonus musculaire des muscles

paravertébraux, engendrant une croissance asymétrique des vertèbres(87) et des disques intervertébraux(88).

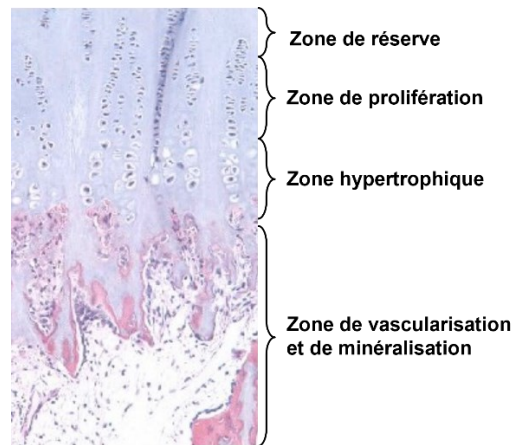


Figure 1.5. Zones de la plaque de croissance.

Représentation histologique des différentes zones de croissance illustrant l'évolution de la forme et la taille des chondrocytes. (Adaptée de Cobetto, 2017(89))

Au niveau des plaques de croissance (*Figure 1.5*), la croissance en longueur dépend du taux de prolifération des chondrocytes de la zone proliférative ainsi que de l'étalement et de l'activité des chondrocytes hypertrophiques. Cependant, la modulation de la croissance *via* les charges biomécaniques explique uniquement la réduction de la quantité d'hypertrophie chondrocytaire au niveau de la zone hypertrophique(86). Cette croissance asymétrique amplifie alors les charges asymétriques et engendre un « cercle vicieux » propice à la progression de la déformation de la colonne vertébrale(90). Cette asymétrie entraîne un décalage latéral par rapport à l'axe du rachis en direction de la plus faible résistance, c'est-à-dire en direction du côté convexe de la courbure(91), accompagné de la rotation des vertèbres autour de l'axe du rachis. Le corps vertébral se déplace alors du côté convexe et les processus épineux se déplacent du côté concave de la courbure(8).

Les disques intervertébraux sont une autre source d'asymétrie, en effet des défauts de la cunéiformisation des disques intervertébraux contribuent au développement de la scoliose, principalement au début du pic de croissance(92). De plus, la taille des disques intervertébraux

a été montrée comme impactant la surcroissance antérieure de la colonne vertébrale(93), donc une croissance plus rapide du rachis antérieur(94). En effet, la partie antérieure de la colonne vertébrale croît en longueur grâce à l'ossification endochondrale jusqu'à la maturité osseuse alors que la partie postérieure croît en longueur jusqu'à environ 10 ans, puis elle continue de croître en largeur grâce à l'ossification membranaire. La croissance postérieure, moins rapide, limiterait la croissance de la colonne antérieure ce qui induit la courbure du rachis suivie de la rotation des vertèbres(95). La sévérité de la courbure semble être reliée à l'ampleur de cette disproportion. D'autre part, les patients atteints de SIA ont un canal rachidien plus court que le corps vertébral(96), confirmant un déséquilibre de la croissance antéro-postérieure de la vertèbre et de la colonne vertébrale.

Parallèlement, les tissus mous présents au niveau de la colonne vertébrale postérieure, comme la moelle épinière, les ligaments ainsi que les muscles sont aussi concernés par cette différence de croissance(97, 98). Les muscles intervertébraux ont été rapportés comme étant plus courts du côté de la concavité de la courbure, de même que pour les ligaments longitudinaux antérieurs et postérieurs. De plus, la longueur de la moelle osseuse par rapport à la longueur de la colonne vertébrale chez les patients atteints de SIA est plus courte que la population contrôle(99-101). Le mécanisme responsable de la disproportion de croissance antéro-postérieure pourrait être un défaut de l'ossification membranaire responsable de la croissance de la partie postérieure de la vertèbre. La faible croissance de la colonne postérieure entrainerait donc un ralentissement de la croissance des tissus mous environnants. Cependant, une autre possibilité serait que la croissance disproportionnelle antéro-postérieure soit le résultat d'un retard de croissance des tissus mous par rapport à la croissance de la colonne vertébrale, ce qui empêcherait sa croissance uniquement en arrière. Roth et al(97), ont émis l'hypothèse qu'un problème de croissance de la moelle épinière pourrait engendrer des défauts de croissance du rachis. Cette différence de croissance entre moelle épinière et colonne vertébrale est appelée « croissance neuro-osseuse asynchrone ». En effet, un des rôles de la colonne vertébrale étant de protéger la moelle épinière, la vertèbre postérieure s'adapte à la taille en longueur de la moelle épinière qui serait plus courte chez les

individus atteints de SIA. Somerville(4) a, quant à lui, postulé que le mécanisme responsable pourrait être un défaut de croissance au niveau des ligaments postérieurs par rapport à la colonne vertébrale, ralentissant sa croissance en arrière.

D'autre part, une asymétrie de la longueur des côtes pourrait avoir un impact sur le développement de la SIA. Cette théorie avance qu'un défaut au niveau du système nerveux sympathique induit une asymétrie dans la vascularisation, soit une augmentation du côté gauche entraînant une vitesse de croissance des côtes plus rapide de ce même côté. Ceci a été confirmé cliniquement lorsqu'une jeune fille a vu sa scoliose, notamment sa cyphose thoracique, diminuer à la suite d'un rétrécissement chirurgical de trois de ses côtes du côté concave de la déformation(102). Ces données sont controversées, car aucune asymétrie de vascularisation n'a pu être prouvée dans d'autres cohortes. Des études ont confirmé que les patients atteints de SIA avaient les côtes 3% plus longues du côté gauche par rapport au côté droit(85). Enfin, l'emplacement et la gravité du cœur et de l'aorte, ainsi que le fait d'être droitier ou gaucher pourraient jouer un rôle dans le type de courbure(103). En effet, les droitiers auraient tendance à développer une flexion et une rotation vers la droite, alors que la tendance pour les gauchers, ou ambidextres, est beaucoup plus aléatoire. L'emplacement du cœur dans la cage thoracique : lévocardie du côté gauche (normal) *versus* dextrocardie du côté droit (anormal) a été associé à une convexité vers la gauche ou vers la droite, respectivement(104).

Comme pour les facteurs hormonaux, les nombreuses théories sur le rôle des facteurs biomécaniques et musculosquelettiques dans l'étiopathogenèse de la SIA sont basées sur des observations cliniques et morphologiques. Cependant, les mécanismes pathogéniques restent inexpliqués et aucun de ces facteurs ne semble être prédominant et suffisant pour expliquer la maladie.

I.2.1.3. Les facteurs neurologiques et vestibulaires

Anomalie du cerveau

Différents types d'anomalies du cerveau ont pu être observés chez les patients atteints de SIA, au niveau du corps calleux, de l'épaisseur corticale du cerveau, des asymétries de la moelle ou du pont ventral du tronc cérébral. Malgré ces observations, il n'existe pas encore de preuves évidentes que ces déformations sont une cause primaire dans la physiopathogénèse de la SIA, ni qu'elles affectent les fonctions neurologiques des patients(52). Des ectopies amygdaliennes cérébelleuses(105, 106) et des élargissements du cervelet(107) ont été associés à une plus forte prévalence de courbure sévère chez les individus atteints de SIA. Une étude de Chau et al(108) a mis en lumière le mécanisme fonctionnel reliant des malformations du cervelet avec la physiopathogénèse de la SIA. Ils ont en effet montré que 58% des jeunes filles atteintes de SIA et d'anomalies de potentiels évoqués somatosensoriels (facteur neurologique mesurable, jouant un rôle dans l'équilibre postural) étaient aussi atteintes de malformations du cervelet(108). De plus, une étude de Liu et al, a permis de mettre en évidence un épaississement du corps calleux chez les patients atteints de SI(109), ou encore des anomalies dans le splénium du corps calleux(110), alors que des analyses sur une autre cohorte ne montraient aucune différence notable(111). Au niveau fonctionnel, des analyses IRM ont révélé une réponse de l'aire motrice supplémentaire anormale chez les patients atteints de SIA, accompagnée d'un indice d'asymétrie plus important dans cette aire motrice qui est responsable de la préparation et de l'exécution des mouvements. De plus, l'aire motrice supplémentaire participe au contrôle de la posture(112). Joly et al(113) ont plus particulièrement étudié la microstructure de la substance blanche du corps calleux chez des patientes atteintes de SI par la technique d'imagerie en tenseur de diffusion permettant de déterminer l'orientation des fibres de la matière blanche. Les résultats ont mis en évidence une diminution de l'anisotropie fractionnelle (décrit la direction de la diffusion des molécules d'eau à travers un tissu donné) au niveau du tronc du corps calleux des patientes atteintes de SI qui relie les cortex moteur et prémoteur des deux hémisphères suggérant l'implication de la synchronisation du myélinisation et de l'élagage axonale.

Système vestibulaire

Le système vestibulaire, localisé dans l'oreille interne, est responsable du contrôle de l'équilibre postural avec le système proprioceptif et visuel. Des anomalies de ce système induisent des asymétries corporelles et sensitives, notamment des asymétries dans le tonus musculaire des muscles paraspinaux, pouvant participer au développement de la SIA. En effet, des déformations morphologiques du système vestibulaire, des asymétries du canal semi-circulaire latéral et des défauts de connexion entre les canaux lymphatiques latéral et postérieur, ont été reportés chez 50 à 85% des individus atteints de SIA(114, 115). Le système vestibulaire est localisé au niveau de l'oreille interne, aussi appelé labyrinthe, et est composé de 3 canaux semi-circulaires (latéral, médian et postérieur) qui s'abouchent au niveau des otolithes. Les deux otolithes sont l'utricule et le saccule. Les canaux semi-circulaires s'abouchent au niveau de l'utricule, lui-même relié au saccule *via* le canal endolymphatique. Les canaux semi-circulaires permettent de détecter les mouvements de rotation de la tête alors que les otolithes détectent les mouvements linéaires. Les mouvements corporels induisent des flux liquidiens au niveau des structures vestibulaires qui sont détectés par les cellules ciliées, tapissant ces structures, qui envoient ensuite les informations au niveau du noyau vestibulaire central et de ses sous-unités. Les informations sont ensuite transmises par la voie efférente vestibulo-spinale qui est responsable du contrôle de la posture et de l'équilibre chez l'Homme. Elle est composée de trois faisceaux, dont le faisceau vestibulo-spinal médian excitateur des motoneurones axiaux des muscles paravertébraux. Ce serait par l'intermédiaire de cette voie que se ferait le lien entre le système vestibulaire et le développement normal ou scoliotique de la colonne vertébrale. Ce lien entre le système vestibulaire et la SIA a souvent été évoqué depuis de nombreuses années et notamment depuis 1979 grâce aux études de Sahlstrand et al(116, 117). Par ces deux études, les auteurs ont montré d'une part que les patients scoliotiques présentaient un déséquilibre postural plus important suite à la stimulation calorique du labyrinthe du côté convexe de leur courbure par rapport à la stimulation du côté concave de la courbure. D'autre part, ils ont mis en évidence la présence de nystagmus spontané ou positionnel (réflexe vestibulo-oculaire qui témoigne

d'une asymétrie vestibulaire) chez environ 50% de leurs patients atteints de SIA. Une étude plus récente a montré qu'un déficit du système vestibulaire pourrait induire un défaut dans la perception de la verticalité, contribuant à la formation de la SIA(118). Les patients atteints de SIA présentent une asymétrie des canaux semi-circulaires qui pourrait résulter en une activité efférente anormale des muscles posturaux(119). D'un point de vue fonctionnel, l'analyse du contrôle de l'équilibre et de la dynamique électrocortical en réponse à un changement soudain de la proprioception de la cheville a démontré que les patients atteints de SIA présentaient une activité du cortex sensorimoteur modifiée afin de maintenir leur équilibre par rapport à des individus contrôles(120). De plus, des valeurs de pic de fréquence alpha plus élevées ont été observées chez des individus atteints de SIA en position debout classique, ce qui peut traduire un mécanisme de compensation de la dysfonction sensorimoteur chez ces patients(121). Enfin, des prédispositions génétiques à des anomalies des canaux semi-circulaires pourraient être fortement reliées au développement de la SI(122, 123). L'équilibre postural est aussi assuré par la vision, et les patients atteints de SIA pourraient avoir des défauts de vision(124) reliés à des mouvements oculaires anormaux.

I.2.1.4. Les facteurs génétiques et épigénétiques

Depuis l'avènement des technologies de séquençage haut débit et l'avancée des connaissances de la communauté scientifique sur le génome en général, les facteurs génétiques sont les plus étudiés dans le cadre de la SIA. Cependant, Burwell et al(125) ont récemment proposé que des facteurs épigénétiques modulés par des facteurs environnementaux (exposome) tels que la nutrition, l'exposition à certains virus, drogues, toxines, l'activité physique, entraînent en jeu dans la physiopathogénèse de la SIA. Ces facteurs génétiques et épigénétiques sont d'autant plus importants qu'ils nous informent sur les mécanismes et voies de signalisation en cause dans la mise en place et le développement de la SIA, mais aussi car ils sont de potentiels biomarqueurs pour la prévention et des cibles thérapeutiques pour la prise en charge de la maladie.

Les facteurs génétiques

La génétique a été démontrée pour la première fois comme prenant part dans l'étiologie de la SIA au cours des années 1920. En effet, des études sur des jumeaux ont montré une plus forte concordance chez les jumeaux monozygotes que les jumeaux dizygotes(126) et de nombreuses familles porteuses de SIA ont été décrites par la suite (127)(128)(129). Depuis, de très nombreux travaux ont confirmé l'implication de la génétique, en effet, environ 40% des individus atteints de SIA ont une histoire familiale(130, 131) et plusieurs modes de transmission ont été décrits : récessif, dominant et lié au chromosome X. Dans chacun des cas, la pénétrance peut être complète ou incomplète. Ainsi, la SIA serait une maladie complexe polygénique avec l'implication d'un ou plusieurs gènes interagissant entre eux et avec l'environnement(132, 133). Un gène majeur responsable de la mise en place de la déformation de la colonne vertébrale serait accompagné de plusieurs gènes associés à l'évolution de cette courbure et à ses caractères(134). Historiquement, les premières analyses génétiques dans le cadre de la SIA étaient des analyses de liaison, pour lesquelles le nombre de méioses est plus pertinent que le nombre de familles incluses dans l'analyse, ce qui rend le recrutement de patients beaucoup plus facile et nécessite beaucoup moins de patients que pour les études d'associations. Ce choix semblait des plus logique du fait de la nature familiale de cette maladie, mais est beaucoup plus efficace dans le cas de maladies rares. Des approches paramétriques et non paramétriques ont été utilisées et ont permis d'identifier de nombreux loci. Parmi eux nous pouvons citer les loci 9q31.2-q34.2 et 17q25.3-qtel(135), 18q12.1-q12.2(136), 3q12.1 et 5q13.3(137), 19p13.3(138), 12p(139), 17p11(140), Xq22.3-q27.2(141), et enfin 8q12(142). Les études d'associations sont apparues plus tard, mais cette technique est beaucoup plus couteuse, génère une très grande quantité de données et permet d'identifier des gènes associés à la scoliose plutôt que des gènes impliqués dans la mise en place de la maladie. Une étude sur les gènes identifiés chez les patients atteints de SIA a permis d'établir une liste des 16 variants les plus convaincants en se basant sur la qualité et la fiabilité des résultats de GWAS (Genome-wide association study) (taille, stratification, différence ethnique et facteurs environnementaux de la population étudiée) depuis 2019(23). Un très grand

nombre de gènes a été jusqu'à aujourd'hui associé à la SIA, ces gènes sont énumérés dans le [tableau I.1.](#)

Symbole du gène	Nom du gène	Symbole du gène	Nom du gène
ACAN	Aggrecan	IL6	interleukin 6
ADGRG6	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G6	IL17RC	Interleukin 17 Receptor C
AJAP1	Adherens Junctions Associated Protein 1	KCNJ2	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 2
AKAP2	A-Kinase Anchoring Protein 2	LBX1	ladybird homeobox 1
BCN2	basonuclin-2	LEPR	Leptin receptor
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator	MATN1	Matrillin 1
COMP	cartilage oligomeric matrix protein	MMP3	matrix metalloproteinase-3
CNTNAP2	Contactin Associated Protein 2	MTRN1B	melatonin receptor type 1b
COL11A2	collagen type XI alpha 2 chain	MAPK7	mitogen-activated protein kinase 7
CALM1	calmodulin 1	MAG11	Membrane Associated Guanylate Kinase 1
CDH7	cadherin 7	MEIS1	Meis Homeobox 1
CHL1	Cell Adhesion Molecule L1 Like	MTNR1A	melatonin receptor 1A
C17orf67	chromosome 17 open reading frame 67	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1
DOT1L	disruptor of telomeric silencing 1-like	POC5	POC5 centriolar protein
DSCAM	DS Cell Adhesion Molecule	PAX1 et PAX3	paired box 1
ESR1	estrogen receptor alpha	PITX1	paired like homeodomain 1
ESR2	estrogen receptor beta	SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9
EPHA4	EPH Receptor A4	TNIK	TRAF2 And NCK Interacting Kinase
FBN1	fibrillin-1	TPH1	tryptophan hydroxylase 1
FBN2	fibrillin-2	TNFRS11B	tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b
FAM101A	regulator of filamin protein A	TGFB1	transforming growth factor beta 1
FGF3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3	TIMP2	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2
GPR126	G-protein coupled receptor 126	TBX6	T-Box Transcription Factor 6
GPER	G protein-coupled estrogen receptor 1	VDR	vitamin D receptor
HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2	VANGL1	VANGL Planar Cell Polarity Protein 1
HOXB7, HOXB8, HOXA13, HOXA10	homeobox genes	ZIC2	zinc finger protein ZIC 2
IGF1	insulin-like growth factor 1		

Tableau I.1. Liste des gènes identifiés par analyse de GWAS ou par analyse de liaison chez des individus atteints de SIA.

La SIA présente une très forte hétérogénéité génétique ce qui rend les mécanismes biologiques en jeu difficilement identifiables, mais la découverte de différents gènes ciliaires dans de grandes familles semble pointer l'implication de cette organelle, que nous discutons dans le chapitre suivant (I.2.2. La Scoliose Idiopathique de l'Adolescent et les gènes ciliaires).

Les facteurs épigénétiques

L'implication des facteurs génétiques est de plus en plus étudiée, mais les mécanismes biomoléculaires sont encore loin d'être compris. Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle important dans la régulation de la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans de nombreuses voies de signalisation comme l'homéostasie osseuse, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle épinière(23). Les facteurs épigénétiques rassemblent la méthylation de l'ADN, la modification des histones, les longs ARNs non codant (LncRNA) et les micro-ARNs.

Plusieurs cas d'hyper ou hypométhylation de différents gènes ont été identifiés comme étant reliés à la sévérité et/ou à la progression de la SIA. En effet, une hyperméthylation du promoteur du gène *COMP* (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) a été associée à la sévérité de la courbure chez les patients atteints de SIA(143), tout comme la méthylation du promoteur du gène *PITX1* (Pituitary homeobox 1)(144), ainsi que du gène *PCDH10* (Protocadherin 10 protein)(145). C'est au contraire une hypométhylation du gène *HAS2* (hyaluronan synthase 2) qui a été associée avec la progression de la SIA par Meng et al(146). Une étude de plus grande envergure de séquençage du génome au bisulfite (identification des régions de méthylation différentielles (DMRs)) au sein d'une cohorte de jumelles monozygotes atteintes de SIA a permis d'identifier trois voies de signalisation majeures, les voies de la MAPK, de la PI3K-Akt et de la Rap1(147). De plus, cette étude a permis d'identifier que l'hypométhylation du gène *PAX1* (paired box 1) était aussi associée au risque de développer la SIA(147) alors que des SNPs dans ce même gène ont déjà été associés à cette maladie.

La modification des histones est largement connue comme jouant un rôle non négligeable dans la régulation de l'expression génique. Makki et al, ont démontré la présence de pic du marqueur de chromatine active (l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac)) proche des sites d'initiation de transcription de nombreux gènes associés à la SIA pour les patients atteints de SIA(148). Le taux d'histone H4, qui est un composant central du nucléosome été

rapportée comme diminuée dans les disques intervertébraux issus de patients scoliotiques(149). L'étude de la modification des histones chez les patients atteints de SIA reste cependant très récente et le nombre d'études disponibles est très limité.

Les micro-ARNs, courts ARNs non codants, sont maintenant largement connus comme étant impliqués dans la régulation de la différenciation ostéogénique, dans la formation des ostéoclastes(150) et ils ont été reliés à des défauts de l'os(151). Dans le cadre de la SIA, les micro-ARNs ont été analysés dans différents types cellulaires (ostéoblastes, cellules des disques intervertébraux, cellules souches mésenchymateuses) et du sang circulant. Il a été démontré que le micro-ARN miR-145 était surexprimé dans les ostéoblastes primaires issus de patients atteints de SIA(152). Les auteurs ont aussi suggéré que le miR-145 puisse potentiellement être utilisé comme biomarqueur spécifique de la progression de la SIA. D'autres analyses ont permis de mettre en évidence l'implication de l'expression du microARN miR-221 au niveau des disques intervertébraux, notamment au niveau de l'anneau fibreux(153, 154). Une expression anormale du miR-21 a été associée à une modification de la prolifération des cellules du noyau pulpeux du disque intervertébral chez des patients atteints de SI(155). Dans le cas des cellules souches mésenchymateuses de la moelle épinière, c'est l'expression anormale de 7 micro-ARNs qui a été identifiée chez des patients atteints de SIA, tous impliqués dans la régulation de la voie PI3K/Akt, qui a un rôle dans la formation et la maturation de l'os(156). D'autres analyses de l'expression des micro-ARNs dans le sang circulant de patients atteints de SIA a permis d'identifier des défauts dans la régulation de micro-ARNs reliés à la voie de signalisation Wnt/ β -caténine(157), PI3K-Akt, mTOR, EGFR, WNT, proteoglycans (chondroïtine sulfatée), RAP1(23). Ces défauts correspondent aux anomalies de la synthèse des protéines dans les plaques de croissance du corps vertébral(158).

Les longs ARNs non codants jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique, et ces transcrits, d'une longueur supérieure à 200 nucléotides, sembleraient prendre part dans la physiopathogénèse de la SIA. À ce jour, il existe très peu d'études mais en 2015, Liu et al(159) reportait pour la première fois une expression différentielle de longs ARNs non codants dans des échantillons sanguins de patients atteints de SIA en comparaison à une population

contrôle. Ces longs ARNs non codants participent à la régulation de voies biologiques telles que la formation du squelette, la minéralisation osseuse, et les jonctions neuromusculaires. Plus récemment, une étude a démontré une dérégulation du long ARN non codant ENST00000453347 dans les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle épinière de patients atteints de SIA par rapport aux cellules souches d'une population contrôle(160). Ce long ARN non codant est d'autant plus intéressant du fait qu'il contribue à la transcription du gène *RUNX2* (différenciation ostéogénique) *via* ses interactions dans les cellules contrôles et que ces interactions sont perdues dans les cellules des patients atteints de SIA(160).

I.2.2. La Scoliose idiopathique de l'adolescent et les gènes ciliaires

Depuis l'avènement des techniques de séquençage à haut débit, de nombreux gènes ont été identifiés comme étant associés à la SIA(161), mais pour la plupart, avec un faible impact(162). Les gènes qui ont été associés à la SIA peuvent se classer en différentes catégories : les gènes du **tissu conjonctif**, les gènes de **formation** et du **métabolisme de l'os**, les gènes codant pour différentes **hormones**, les gènes de **puberté et de croissance**. Malgré l'identification d'un grand nombre de loci associés à la SI, très peu de gènes ont été identifiés dans les mécanismes déclencheurs de la SIA et le lien entre génotype et phénotype n'a pas encore été clairement établi. En 2015, un des premiers gènes causatifs, *POC5* a été identifié au sein de notre laboratoire(163) ouvrant la piste de l'implication du cil primaire dans le développement de la SIA. De plus, la majorité des gènes qui ont été confirmés comme étant impliqués dans le développement de la SIA sont des gènes prenant part à la formation, la structure ou encore la fonction du cil(164). Ce sont notamment les gènes *TBX6*, *FGF3*, *LBX1*. Les gènes *Kif6* et *Ptk7* sont quant à eux des gènes ciliaires qui ont été associés à la scoliose chez le poisson zèbre.

I.2.2.1. Le gène *Kif6* (Kinesin family member 6)

Le gène *Kif6* est connu comme étant impliqué dans le développement de la colonne vertébrale chez le poisson zèbre(165). En effet, l'étude du poisson zèbre *skolios* (modèle animal de SI) a pu mettre en évidence qu'une mutation dans ce gène induit une déformation de l'axe du corps

de manière récessive. Cette protéine appartient à la famille des kinésines et son rôle est encore mal compris, mais elle est impliquée dans la régulation de la ciliogenèse *via* sa régulation par la protéine FoxJ1 (Forkhead box J1, nécessaire au cil motile)(166). De plus, la protéine Kif6 est impliquée dans le transport des corps basaux à la surface de la cellule épendymaire nécessaire à la ciliogenèse. Ainsi, un défaut à son niveau interférerait dans la ciliogenèse notamment au niveau des cellules épendymaires induisant une altération du flux cérébrospinal et donc une asymétrie gauche-droite à l'origine de la déformation de la colonne vertébrale. Un défaut dans le gène *Kif6* engendre un phénotype scoliotique chez le poisson zèbre, *skolios*, très similaire aux déviations observées chez les patients atteints de SI. Cependant, aucun individu atteint de cette pathologie n'a, à ce jour, été identifié comme porteur de mutation dans ce gène.

1.2.2.2. Le gène *Ptk7* (protéine tyrosine kinase-7)

Le gène *Ptk7* a été identifié comme étant associé à la SI chez le poisson zèbre et à ce jour chez un unique individu atteint de SI(167). Ce gène code pour le récepteur tyrosine kinase 7 qui est impliqué dans la voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine et dans la voie non canonique Wnt/PCP par son interaction avec les ligands Frizzled 7 et LRP6(168-170). La polarité cellulaire planaire (PCP) est nécessaire à la polarisation des cellules et à leur mobilité notamment au cours du développement embryonnaire et de l'axe du corps. Plus récemment, la même équipe a pu mettre en évidence que les poissons zèbres déficients en *Ptk7* présentaient un défaut au niveau de la ciliogenèse ainsi que du flux cérébrospinal. Ce défaut serait responsable de l'asymétrie corporelle gauche-droite dont la déformation de la colonne vertébrale(171). Ces résultats sont cohérents, car la voie Wnt/PCP est connue comme étant impliquée dans la ciliogenèse(172). De plus, la restauration de la fonction ciliaire chez ces poissons zèbres arrête la progression de la courbure. Ces données suggèrent que la protéine de polarité *Ptk7* altérée n'a pas d'effet sur la division cellulaire, mais qu'elle induirait, *via* la voie Wnt/PCP, un défaut au niveau de la ciliogenèse qui impacterait la motilité des cils. Ce défaut de motilité au niveau des cellules épendymaires induit un flux du liquide cérébrospinal anormal responsable d'une asymétrie droite-gauche au niveau de l'embryon incluant la déformation du rachis.

I.2.2.3. Le gène *TBX6* (T-box transcription factor 6)

Le gène *TBX6* a récemment été identifié dans une famille chinoise atteinte de SIA(173). Il code pour un facteur de transcription T-box important dans la spécification du mésoderme, la formation des somites ainsi que l'asymétrie gauche-droite(174). En effet, il a été démontré que *TBX6* avait un rôle dans la régulation de la voie de signalisation NOTCH *via* une activité synergique avec la voie de signalisation Wnt(175). Ce défaut d'asymétrie gauche-droite chez les souris mutantes *Tbx6* serait dû à un défaut dans la structure et dans la motilité du cil nodal(176). Des travaux plus récents ont montré que *Tbx6* muté impacte l'asymétrie gauche-droite en affectant la fonction des cils des cellules du nœud primitif, en éliminant la signalisation Ca^{2+} asymétrique (stimulé par le flux nodal) ainsi qu'en impactant l'expression de Nodal (protéine d'induction mésodermique)(177).

I.2.2.4. Le gène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3)

Le gène *FGFR3* a lui aussi été rapporté comme étant relié à la scoliose(178). Ce gène appartient à la famille des récepteurs au facteur de croissance des fibroblastes. Il inhibe la prolifération cellulaire ainsi que l'hypertrophie des chondrocytes faisant de lui un acteur clé de la plaque de croissance cartilagineuse(179). La famille des FGFRs a été à plusieurs reprises impliquée dans la ciliogenèse. Récemment, Martin et al(180), a démontré l'implication du *FGFR3* dans la taille des cils primaires ainsi que dans le transport de protéines ciliaires impactant la prolifération et la différenciation des chondrocytes au sein de la plaque de croissance expliquant alors la déformation de la colonne vertébrale. Les FGFRs déterminent la longueur (court ou long) du cil primaire en fonction de leur durée d'activation, *via* leur impact sur la vitesse du transport intraflagellaire (IFT)(181). Les auteurs ont aussi démontré que l'altération de l'élongation du cil primaire par *FGFR3* impactait la voie Hh (Hedgehog) or, celle-ci contrôle la prolifération cellulaire et notamment Indian hedgehog (*Ihh*) qui régule la prolifération des chondrocytes ainsi que leur différenciation dans les plaques de croissance(182). *FGFR3* serait donc un gène de polarité cellulaire jouant un rôle sur la division cellulaire *via* la régulation des mécanismes ciliaires et donc de la voie Hh.

I.2.2.5. Le gène *LBX1* (ladybird homeobox 1)

Le polymorphisme rs11190870 a été identifié comme étant associé à la SIA(183, 184). Ce SNP se situe à 7.5kb du gène *LBX1* et serait responsable de sa surexpression induisant une susceptibilité à la SIA(185). Le gène *LBX1* fait partie de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine. Chez les vertébrés, cette famille de protéine se trouve au niveau de la moelle épinière, des cellules de la crête neurale, des précurseurs musculaires et au niveau des cellules satellites impliquées dans la régénération musculaire(186-189). Chez le poisson zèbre, la surexpression de *Lbx1* engendre des défauts de mouvement d'extension et de convergence au cours de la gastrulation *via* l'altération de la voie de signalisation Wnt/PCP(185). Cette voie de signalisation est impliquée au cours du développement dans la polarité cellulaire, elle-même impliquée dans la mobilité cellulaire notamment *via* la régulation des protéines RhoGTPases(190). De plus, Guo et al(185) a montré chez le poisson zèbre que l'expression accrue de *Lbx1* pouvait engendrer une légère déformation de l'axe cranio-caudal responsable d'une croissance anormale du tronc devenant visible au moment du pic de croissance de la puberté, en accord avec la cinétique de la SIA.

I.2.2.6. Le gène *POC5* (Protein centriolar 5)

En 2015, Patten et al, reportait trois SNPs dans le gène *POC5* fonctionnellement liés à la SI(163). L'analyse de liaison sur quatre générations d'une famille d'origine française a permis d'isoler deux loci candidats : 5q13.3 et 3q12.3 (137), puis le séquençage de ces loci a permis d'identifier le variant c.G1336A (p.(A446T)) dans l'exon 10 du gène *POC5*. Aucun gène candidat n'a, à ce jour, été identifié sur la région 3q12.3. Ce variant a ensuite été identifié dans 3 familles supplémentaires ainsi que dans des cas de scolioses idiopathiques sporadiques. Le variant c.G1363C (p.(A455V)) a été identifié dans une famille de la même cohorte et le variant c.C1286T (p.(A429V)) a été retrouvé uniquement dans des cas sporadiques de SI. Afin de valider l'implication fonctionnelle de ces variants dans la SI, Patten et al, a montré qu'une invalidation du gène *Poc5* chez le poisson zèbre entraîne une déformation de l'axe du corps des larves. De plus, les injections distinctes des différents ARNs messagers de *POC5* humain

mutés induisent une déformation de l'axe du corps contrairement à l'injection de l'ARNm de *POC5* sauvage qui rétabli un phénotype normal(163). L'analyse de l'expression spatiotemporelle de *Poc5* a révélé chez le poisson zèbre une expression ubiquitaire au cours de la somitogenèse suggérant un rôle dans le développement antéro-postérieur précoce. Plus récemment, un quatrième variant, rs6892146, a été identifié au sein d'une cohorte d'origine chinoise, avec une expression de l'ARNm augmentée de 1.5 fois par rapport aux contrôles(191). Chez l'Homme, le gène *POC5* code pour une protéine centriolaire qui est exprimée ubiquitairement. POC5 est retrouvée au niveau des centrioles où elle forme un complexe avec les protéines POC1B, FAM161A et la centrine 2 afin d'assurer la cohésion des microtubules(192) et l'assemblage de la partie distale des centrosomes(193). POC5 est aussi impliquée dans des mécanismes cellulaires reliés à la polarité telles que la division et la mobilité cellulaire(194-196).

Des études menées au sein de notre laboratoire ont pu mettre en évidence qu'une altération du gène *POC5* entraîne une rétraction du cil primaire ainsi qu'un défaut dans le cycle cellulaire, en effet, les cellules porteuses de la mutation p.(A429V) demeureraient « bloquées » en phase S(196). De plus, Hassan et al, a montré que la protéine mutante perd une grande partie de ses partenaires protéiques en comparaison à la protéine POC5 sauvage(196). Ces résultats ont permis de proposer un modèle où, dans des conditions normales, la protéine POC5 interagit avec ses partenaires afin d'assurer l'élongation du cil primaire ainsi que la progression au travers du cycle cellulaire. Lorsque la protéine est mutée, elle ne peut alors plus interagir avec ses partenaires et se localise dans le noyau cellulaire, la taille du cil ainsi que la progression dans le cycle cellulaire sont alors altérées.

Le gène *POC5* a récemment été identifié comme responsable de rétinite pigmentaire, une maladie caractérisée par une dégénération des photorécepteurs de la rétine(197). En effet, les auteurs ont montré que la protéine POC5 était présente au niveau du cil primaire des cellules photoréceptrices et que l'inactivation du gène *POC5* induit une altération du développement et de la fonction des photorécepteurs. Les auteurs ont invalidé le gène *POC5* par injection d'un morpholino chez le poisson zèbre et ont montré une diminution de la taille du segment externe

des photorécepteurs. De plus, ils ont identifié, chez les poissons zèbres mutants, une diminution de la réponse motrice suite à un stimulus lumineux, témoignant de l'altération de la fonction rétinienne. Bien que le développement de la rétine soit en partie dû à des divisions asymétriques de cellules précurseurs(198), le mécanisme par lequel la protéine POC5 mutante engendre un défaut de la rétine ne semble pas être relié à un défaut de division cellulaire, mais plutôt à un défaut fonctionnel des cils primaires.

I.3. Le cil

Le cil est une organelle de structure cylindrique présente à la surface de la plupart des cellules où il s'apparente à une antenne qui se projette dans l'espace extracellulaire. Les cils ont de nombreux rôles sensori-moteurs, tant au niveau physiologique qu'au niveau du développement d'un organisme. Lorsqu'ils sont défectueux, les cils sont à l'origine de maladies syndromiques rares appelées ciliopathies(199, 200), caractérisées par des défauts au niveau de nombreux organes comme les reins, le cerveau, les yeux, les voies respiratoires, l'oreille interne, ainsi que des défauts au niveau du squelette (incluant de la scoliose).

Chez les mammifères, on distingue deux grands types de cils en fonction de leur motilité : le cil motile et le cil primaire, non-motile. Ils sont tous deux composés de trois parties : **le corps basal** ancré à la membrane plasmique (qui provient du centriole mère), **l'axonème** (qui possède une membrane ciliaire spécialisée) ainsi que la **zone de transition** (qui relie l'axonème au corps basal). L'axonème résulte de l'assemblage cylindrique de 9 doublets de microtubules périphériques, reliés ou non par des ponts de dynéine contractiles et une paire de microtubules centrale, ou non.

I.3.1. Le cil primaire

Le cil primaire, non-motile, répond à la conformation 9+0 et ne présente pas de ponts contractiles de dynéine. Cette organelle se trouve en copie unique à la surface de la quasi-totalité des types cellulaires, excepté les cellules sanguines. Il est une structure dynamique et

transitoire qui se rétracte lorsque la cellule entre en phase G1 et se forme à nouveau à la surface des cellules résultantes, en phase G0(201).

I.3.1.1. Composition du cil primaire

Le cil primaire est divisé en trois parties distinctes qui sont le corps basal, l'axonème et la zone de transition.

- L'**axonème**, composé de 9 doublets de microtubules (MT) et réduit à 9 singulets de microtubules à son extrémité distale, est le squelette du cil primaire. Les doublets de microtubules sont formés par un cercle plein de tubuline alpha (13 protofilaments) et d'un cercle incomplet de tubuline bêta (10 protofilaments)(202, 203) (*figure 1.6*). Les microtubules sont reliés entre eux par des bras de nexine et sont dépourvus de dynéine(204). La partie distale de l'axonème est une zone particulière, en effet c'est le site d'élongation et de dissociation du cil. C'est aussi la zone de transition entre le transport intraflagellaire (IF) antérograde et rétrograde. De nombreux récepteurs ciliaires se trouvent au niveau de cette extrémité distale de l'axonème.
- Le **corps basal** est la base du cil primaire, à partir duquel celui-ci est érigé. Il dérive de la maturation du centriole mère qui, relié perpendiculairement au centriole fille, forme le centrosome. Les centrioles sont composés de 9 triplets de microtubules et le centrosome est entouré de la matrice péricentriolaire. Les pieds basaux dérivent des appendices subdistaux du centriole mère et relient la partie proximale du corps basal au microtubule cytoplasmique, donc au cytosquelette de la cellule(205). Les fibres de transition dérivent des appendices distaux du centriole mère et relient la zone distale du corps basal à la membrane ciliaire. Elles marquent la transition entre la membrane plasmique et la **membrane ciliaire**, qui se différencie par sa composition protéique et lipidique (*Figure 1.6*).
- La **zone de transition** débute après les fibres de transition. C'est au niveau de cette zone que les doublets de microtubules sont reliés à la membrane ciliaire par des projections en Y, formant le collier ciliaire ou « necklace ». La zone de transition forme

ainsi une zone d'association forte entre les microtubules et la membrane ciliaire. Du fait que le cil n'est pas complètement externalisé, cela résulte en la formation d'une poche ciliaire recouverte par l'invagination de la membrane plasmique(206) (*Figure 1.6*). C'est au niveau de cette poche que se fait le trafic de vésicules de la membrane ciliaire vers le cytoplasme, et inversement(207). Enfin, un réseau d'actine est connecté à cette poche ciliaire assurant l'orientation appropriée du cil.

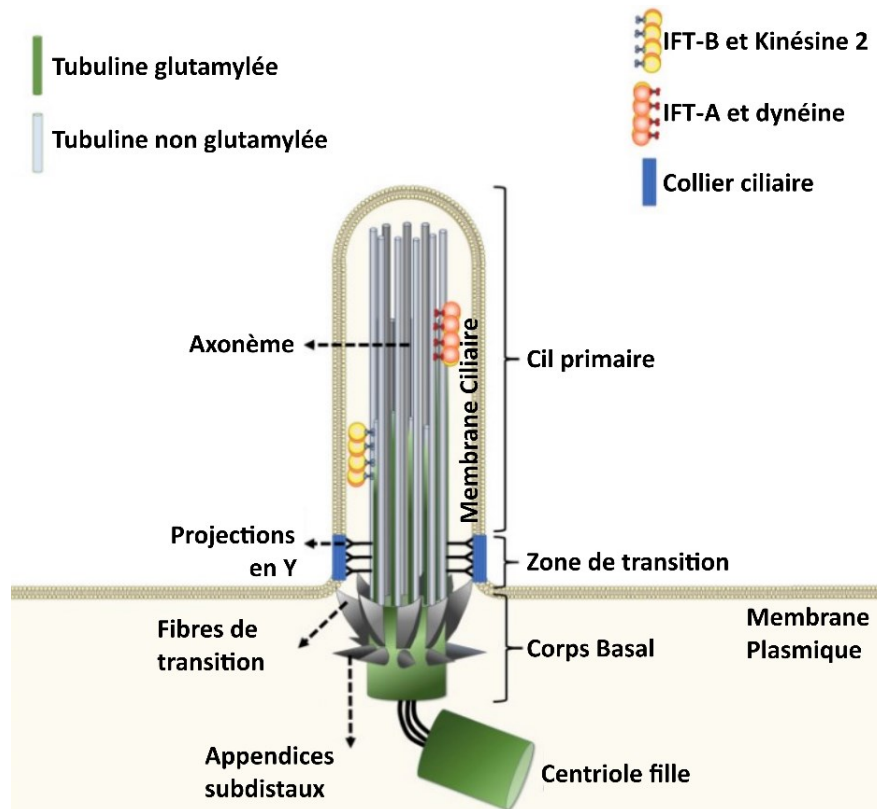


Figure 1.6. Structure générale du cil primaire.

Le cil primaire est une organelle formée du corps basal, d'une zone de transition et d'un axonème composé de 9 doublets de microtubules délimités par la membrane ciliaire ultra spécifique. Adapté de Yang et al, 2021(208).

1.3.1.2. Le transport intraflagellaire

Le transport intraflagellaire (IF) est un phénomène qui est conservé au travers de l'évolution(209). Il est essentiel à la ciliogenèse ainsi qu'à la fonction du cil primaire. En effet,

l'aspect dynamique du cil primaire nécessite un mécanisme efficace et finement articulé permettant l'assemblage et le désassemblage du cil au cours de sa formation (à l'entrée de la cellule en quiescence), de sa résorption (avant l'entrée de la cellule en mitose) et le maintien de sa taille une fois formé. De plus, les protéines ciliaires sont produites dans le cytoplasme de la cellule puis elles sont transportées à la base du cil primaire où elles seront acheminées le long des doublets de MT l'axonème jusqu'à l'extrémité distale *via* un transport antérograde, grâce aux protéines motrices Kinésine 2 associées au complexe IFT-B. Un transport rétrograde assure le retour des protéines de l'extrémité distale vers la base du cil, grâce aux protéines motrices Dynéine 2 associées au complexe IFT-A. Le transport IF est responsable du maintien de la longueur du cil qui joue un rôle crucial dans sa fonction (*Figure 1.6*).

I.3.1.3. Formation du cil primaire : la ciliogenèse

La première étape de la ciliogenèse est la maturation du centriole mère en corps basal, suivi de sa migration à proximité de la membrane plasmique, lorsque la cellule entre en phase de quiescence, G0. Le corps basal s'ancre alors à la membrane plasmique et la dernière étape est la croissance du cil et notamment de l'axonème qui est entouré de la membrane ciliaire spécialisée, possédant des récepteurs de différentes voies de signalisation(210).

La maturation du centriole mère en corps basal nécessite la formation des pieds basaux et des fibres de transition à partir des appendices subdistaux et des appendices distaux, respectivement. Cette étape permet ensuite l'assemblage du corps basal à une vésicule ciliaire et l'ancrage à la membrane plasmique grâce aux fibres de transitions(211). De plus, les pieds basaux permettent de lier le corps basal aux MT cytoplasmiques et donc au cytosquelette, permettant ainsi le trafic protéique du cytoplasme au cil primaire(212). Une fois que le corps basal est associé à la vésicule ciliaire, la croissance du cil commence en intracellulaire, approximativement au moment où la zone de transition se forme. La croissance des MT de l'axonème entraîne la formation d'une invagination de la vésicule ciliaire créant ainsi une double membrane. La face interne formera la membrane ciliaire une fois que la vésicule aura fusionné avec la membrane plasmique.

La synthèse protéique n'ayant pas lieu au sein du cil primaire, les protéines doivent être amenées sur place et transportées le long du cil primaire grâce au transport intraflagellaire. Ainsi, la croissance du cil primaire se fait grâce à la polymérisation de la partie distale de l'axonème par ajout de sous unités α - et β -tubuline disponibles.

I.3.1.4. Fonction du cil primaire

Le cil primaire a longtemps été considéré comme un vestige dépourvu de rôle au sein des cellules, mais plusieurs études ont finalement prouvé son implication dans divers mécanismes cellulaires, autant au cours du développement embryonnaire que dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, celui-ci est désormais largement décrit comme étant une antenne cellulaire qui a pour fonction de reconnaître les signaux environnants, de les capter *via* les nombreux récepteurs et canaux transmembranaires présents sur la membrane ciliaire afin de les transduire au niveau cellulaire et activer différentes cascades de signalisation. Ceci permet donc à la cellule de répondre adéquatement aux signaux de son microenvironnement.

Ainsi, le cil primaire entre en jeu dans la polarité planaire, la migration cellulaire, la différenciation cellulaire ou encore dans le maintien du pool de cellules non différenciées et le développement embryonnaire. Celui-ci a un rôle donné selon le type cellulaire afin de répondre spécifiquement au besoin du tissu concerné. Au sein d'un organisme, des cils primaires plus ou moins spécialisés sont retrouvés au niveau des organes senseurs notamment au sein de la rétine où les photorécepteurs sont des cils primaires modifiés. Ces cils spécialisés sont capables de capter et de répondre à la lumière(213), la température(214), l'osmolarité(215), ou encore la gravité(216). Le cil primaire est principalement sensible aux stimuli chimiques, notamment *via* la détection de ligands spécifiques et aux stimuli mécaniques, comme les forces dues au flux environnant. En effet, le cil primaire à un rôle de mécanosenseur, il est capable de se courber sous l'action du flux environnant et convertit le signal sous forme de courant ionique. Le cil primaire possède sur sa membrane des polycystines formant des canaux perméables au Ca^{2+} , qui une fois stimulés, vont activer les voies de signalisation du Ca^{2+} (217). Ce système de mécanosenseur a notamment été mis en

évidence dans les ostéocytes(218). D'autre part, les cils primaires des cellules n'étant pas en contact direct avec le flux environnant ont un rôle de chémosenseur. En effet, le cil primaire est l'hôte de voies de signalisation des plus connues comme la voie Sonic Hedgehog (Shh)(201, 219), la voie Wnt/PCP (Planar Cell polarity)(220, 221) et la voie du PDGF (Platelet-derived Growth Factor)(222).

I.3.3. Le code tubuline

Les MT sont formés par l'assemblage d'hétérodimères très conservés au cours de l'évolution d'alpha et bêta tubuline. Ils sont capables d'assurer plusieurs fonctions spécifiques au sein de la cellule grâce à leurs interactions avec différentes protéines associées aux MT (MAPs, microtubule associated proteins). Ces protéines agissent sur les MT en régulant leur association/dissociation, en jouant un rôle de moteur ou encore en liant les MT à d'autres structures cellulaires, notamment d'autres composants du cytosquelette. Les MAPs permettent la régulation des propriétés des MT.

Les microtubules peuvent varier dans la combinaison de polymères d'alpha et bêta-tubuline et ceux-ci peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles (MPT) qui constituent ce qu'on appelle le « code tubuline », en référence au « code histone ». En effet la tubuline peut subir des réactions de tyrosination/detyronisation, glutamylation, glycylation, mais aussi d'acétylation, méthylation, et phosphorylation (*Figure 1.7*). D'autres modifications moins connues peuvent être observées comme la palmylation, glycosylation, arginilation, SUMOylation(223-227). Les différentes combinaisons de MPT créent alors une identité spatiotemporelle ultra spécialisée afin d'assurer un large spectre de fonctions.

Du fait que les MAPs entrent en jeu dans la modulation des propriétés des MT et que le transport IF permet la formation et le maintien du cil primaire, l'hypothèse principale est que les MPT sont importantes dans la régulation de la structure et de la fonction du cil primaire(208, 223, 225).

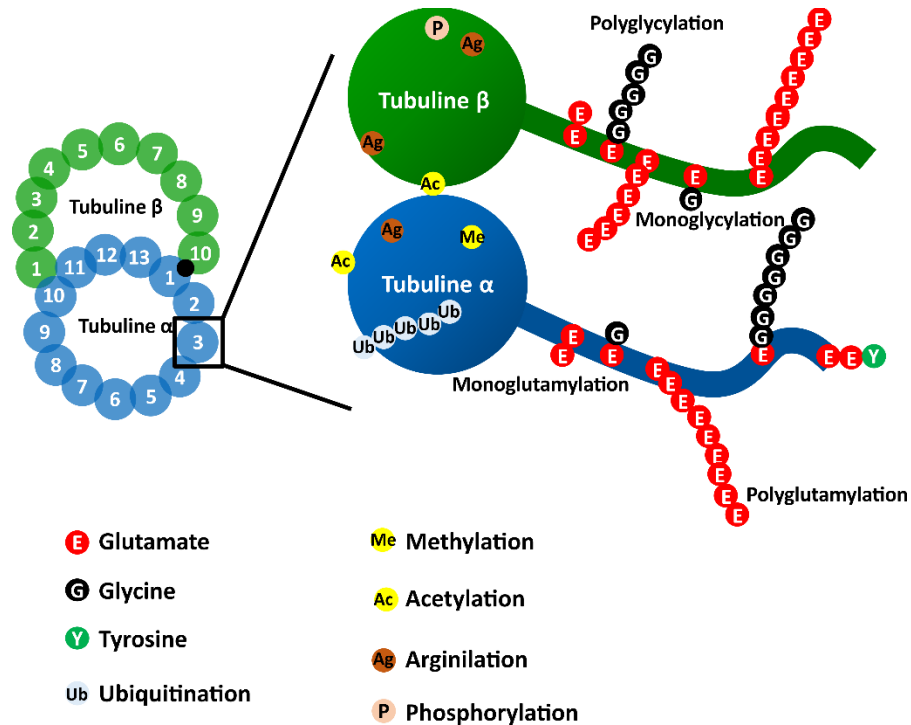


Figure I.7. Représentation schématique du « code tubuline ».

Partie gauche : Représentation schématique de la coupe d'un doublet de microtubules composé de 13 protofilaments de tubuline alpha et 10 protofilaments de tubuline bêta. Partie droite : Représentation des modifications post-traductionnelles subies par les dimères de tubuline. Certaines MPTs sont plus spécifiques de la partie globulaire comme l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la méthylation et l'arginilation, alors que la glycylation, la glutamylation et la tyronisation sont plus spécifiques de la queue en C-terminal. Adapté de Yang et al, 2021(208).

La glutamylation et la polyglutamylation sont caractéristiques des cellules différenciées(228) et font partie des MPT les plus étudiées. Elles consistent en l'ajout d'une chaîne d'un à 20 résidus de glutamate en C-terminal de la tubuline alpha ou bêta(229). La formation de cette chaîne débute par une phase que l'on appelle « initiation », résultant de la liaison covalente du groupe amine du glutamate avec le groupe γ -carboxyle de la tubuline, et une phase d'« élévation »(230).

Cette réaction enzymatique est assurée par des enzymes appartenant à la famille des « tubulin tyrosin ligase-like », ou TTLL, formées d'un domaine TTL (tubulin tyrosine ligase) hautement conservé et d'un domaine cationique « microtubule-binding » (c-MTBD). Ces domaines permettent à l'enzyme de se lier en C-terminal des monomères de tubuline *via* le domaine TTL et aux MT *via* le domaine c-MTBD(231). Cette famille regroupe 13 membres chez l'Homme incluant 9 glutamylases : TTLL1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11 et 13; des glycyllases et des tyrosinases(232). Les différentes glutamylases possèdent des préférences pour la tubuline alpha ou bêta, et aussi pour la réaction d'initiation ou l'élongation. La glutamylation de la tubuline de l'axonème du cil primaire se fait dans un premier temps par le recrutement de l'enzyme spécifique suivi par l'activation de son activité enzymatique. Cette réaction a été démontrée comme étant induite par un stimulus du milieu environnant comme les changements de température, l'osmolarité ou encore la privation en nutriments(233). La glutamylation est une réaction réversible et le retrait des groupements glutamates est assuré par les membres de la famille des CCPs (cytosolic carboxypeptidases).

Les études menées pour comprendre le rôle de la glutamylation ont montré que celle-ci joue un rôle crucial dans l'architecture du cil primaire, dans le transport IF ainsi que dans la signalisation du cil primaire. En effet, l'ajout de groupement glutamate *via* la réaction de glutamylation ajoute des charges négatives aux MT, ce qui permet le recrutement d'enzymes telles que la spastine ou son homologue, la katanine, toutes deux appartenant à la famille des AAA ATPase. Ces enzymes sont responsables de la fragmentation des MT, et leur efficacité est reliée à la longueur de la chaîne de glutamate(234). Le recrutement de la spastine ou la katanine est dépendant du type de glutamylase ayant procédé à l'ajout de groupement glutamate, ce qui suggère un mécanisme de régulation très élaboré(234). Lacroix et al(234), ont montré que la katanine est préférentiellement recrutée au niveau des MT modifiés par l'enzyme TTLL6, alors que la spastine est préférentiellement recrutée par les MT modifiés par l'enzyme TTLL11 dans des cellules #U2OS. La glutamylation et la polyglutamylation des MT jouent un rôle significatif dans le transport IF du cil primaire. En effet, la processivité et la vélocité des protéines motrices le long des MT, notamment la kinesine-2, dépendent du taux

de glutamylation(235). Du fait que la glutamylation impacte le transport IF et que les voies de signalisations du cil primaire dépendent de ce transport, la glutamylation joue aussi un rôle au niveau de ces voies de signalisation(234). Hong et al(236) ont démontré que l'hypoglutamylation des MT diminue la translocation de Gli3 affectant la voie de signalisation Sonic hedgehog (*Shh*), ainsi que la liaison des protéines PKD1 et 2, affectant la voie de la polycystine.

I.3.4. Cil primaire et tissu osseux/maladies osseuses

Le cil primaire est l'hôte d'un grand spectre de voies de signalisation qui entrent en jeu au cours de l'embryogenèse ainsi que dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. De ce fait, un défaut dans la formation, la structure ou la fonction du cil primaire engendre une famille de syndromes multi-systémiques complexes rares, regroupés sous le terme de ciliopathie. Le cil primaire étant largement ubiquitaire chez l'Homme, ces syndromes partagent des symptômes communs, notamment des dysfonctions des reins et du foie, des anomalies du cerveau, de la rétine et du squelette. Plusieurs études ont démontré l'implication du cil primaire dans les maladies osseuses. Le cil primaire a été observé pour la première fois dans les chondrocytes il y a environ 45 ans et depuis il a pu être décrit dans les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes ainsi que les ostéocytes(237).

Parmi les différentes voies de signalisation que le cil primaire abrite, nombreuses sont essentielles au développement de l'os, comme la voie de signalisation Hedgehog (Indian Ihh et Sonic Shh), la voie Wnt canonique et non canonique, la voie du facteur de croissance FGF, ainsi que la voie NOTCH. Le cil primaire a été démontré comme régulant la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse(238), et des cellules souches dérivées du tissu adipeux(239), mais aussi des chondrocytes, des ostéoblastes et ostéocytes. De manière plus précise, plusieurs études ont pu mettre en évidence l'implication des protéines du transport IF (IFT80 notamment), des protéines motrices du transport IF (KIF3A) et d'autres protéines ciliaires dans la régulation de l'ostéogenèse et de la formation du tissu osseux(237, 240).

Le cil primaire est aussi impliqué dans le développement du squelette *via* son rôle de mécanosenseur et chémosenseur notamment au niveau des zones de prolifération des plaques de croissance(241, 242). En effet, l'application de charges mécaniques induit la rétraction du cil primaire afin de limiter la surcharge mécanique(243).

I.4. Les modèles animaux de scoliose idiopathique

Malgré les efforts de la communauté scientifique dans la recherche sur la SIA, les études génétiques et les diverses observations, données cliniques, biologiques, biomécaniques, métaboliques, n'expliquent pas la physiopathologie de la maladie. Les études sont principalement observationnelles, ou encore *in vitro* dans des modèles cellulaires. Un cercle vicieux existe entre l'absence de cause évidente de la SIA et l'absence de modèles animaux, ce qui est une limitation importante pour les études sur l'étiopathogénèse de la maladie. Il y a donc un besoin urgent de créer des modèles animaux de SIA.

La scoliose est reconnue comme étant une maladie reliée à la condition bipède de l'Homme. La posture érigée de l'Homme ainsi que les charges biomécaniques s'appliquant sur la colonne vertébrale dans le sens crânio-caudal contribuent à sa déformation. Le modèle animal idéal devrait modéliser les causes génétiques, le phénotype associé à la maladie, les mécanismes sous-jacents ainsi qu'être un outil de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Malheureusement, ce type de modèle n'existe pas, d'autant plus que ces paramètres sont encore très mal compris dans le cas de la SIA. La posture érigée de l'Homme est un obstacle majeur pour avoir un bon modèle animal, car la majorité des animaux utilisés en laboratoire sont quadrupèdes. Cette condition quadrupède induit une différence majeure avec l'humain, tant au niveau de la structure du squelette que des charges que subit leur colonne vertébrale. Ces différences rendent ces animaux largement moins sujets à développer des déformations de la colonne vertébrale similaire à la SI(244). C'est pourquoi de nombreux modèles animaux ont été développés, autour de 200 modèles différents ont été testés à ce jour(245) chez différents types d'animaux. Il existe des modèles mécaniques, des modèles neuroendocriniens et des modèles génétiques/épigénétiques. La SIA est une maladie complexe, et le

développement de cette maladie étant encore très mal compris, les modèles animaux obtenus ne reflètent qu'une partie de ses caractéristiques.

I.4.1. Modèles mécaniques et neuroendocriniens

I.4.1.1. Animaux quadrupèdes

Malgré les limitations dues à la condition quadrupède mentionnées précédemment, ces animaux sont les plus utilisés pour modéliser la scoliose et obtenir des pistes de traitement. Ils sont obtenus par la création d'une asymétrie mécanique de la colonne vertébrale sans altération de l'intégrité du corps vertébral. Pour ce faire, différentes approches ont été utilisées depuis de nombreuses années, celles-ci sont principalement : l'excision ou la dénervation de muscles paraspinaux; la résection des côtes; la fixation des côtes ou des vertèbres ensemble(246). Bien que ces techniques engendrent une asymétrie de forces au niveau de la colonne vertébrale, la nature exacte de ces forces est mal comprise(247). Un autre type de modèle résulte de l'ablation du ganglion de la racine dorsale(248), responsable de la transmission des informations de proprioception (*Figure 1.8*). Cette technique est d'autant plus intéressante que des analyses post-mortem chez des individus atteints de SIA ont révélé des anomalies au niveau du ganglion de la racine dorsale(249).

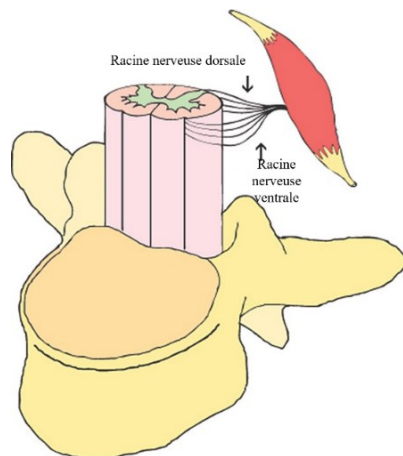


Figure 1.8. Représentation de la transmission des informations de proprioception.

Les informations issues de la proprioception sont acheminées du muscle à la moelle épinière *via* la racine nerveuse dorsale. Adaptée de Bobyn et al(247).

La méthode la plus utilisée est sans conteste la fusion unilatérale des vertèbres entre elles au stade juvénile de la colonne vertébrale. Cette technique est pratiquée chez un large spectre

d'animaux tels que le rat, le lapin, le chien, le cochon ou encore le veau(247). Il est aussi possible d'attacher le pelvis à la scapula du côté ipsilatérale *via* une tige métallique. Cette technique est la plus répandue, car elle a été démontrée comme étant une technique fiable et reproductible pour la modélisation mécanique de la scoliose et l'étude de redressement de la courbure.

1.4.1.2. Animaux bipèdes

Le choix de modèles animaux bipèdes est beaucoup moins étendu que pour les animaux quadrupèdes et se limite principalement à la poule et aux primates non humains. La gravité engendre les mêmes forces sur la colonne vertébrale de ces animaux que les humains.

Chez la poule, la technique la plus utilisée est la résection des côtes : la sévérité de la courbure est inversement proportionnelle à l'âge de l'animal au moment de la chirurgie, et est proportionnelle au nombre de côtes retirées(250). Cette technique fonctionne cependant beaucoup moins bien chez le primate non humain. En effet, Robin et al(251) n'ont observé de déformation de la colonne vertébrale chez aucun des 10 babouins ayant subi une résection de 4-5 côtes, et ce jusqu'un an post-opératoire. Une autre étude de Thomas et al(252) a mis en évidence que la méthode la plus efficace pour induire une scoliose sévère chez le primate non humain est de procéder à l'ablation de l'extrémité dorsale des 6 côtes les plus basses du côté droit dans un premier temps, et 6 semaines plus tard, celles du côté gauche.

Les modèles neuroendocriniens sont principalement des modèles bipèdes, en effet il s'est avéré que cette condition était un prérequis à la déformation de la colonne vertébrale. Ces modèles endocriniens sont plus informatifs quant à l'étiopathogénèse de la scoliose que les modèles mécaniques. À ce jour, la méthode la plus courante est l'induction d'un déficit en mélatonine, le plus souvent *via* l'ablation de la glande pinéale. Cette technique donne de très bons résultats chez la poule, mais n'a pas été reproductible chez le primate non humain(253) et ceci peut s'expliquer par le fait que la colonne vertébrale de la poule est très différente de celle des primates, notamment au niveau des disques intervertébraux(92). L'induction de scoliose a ensuite été réalisée chez des rongeurs suite à une pinéalectomie ou directement

dans les lignées déficientes en mélatonine. Ces rongeurs sont au préalable rendus bipèdes grâce à une opération chirurgicale consistant à amputer les pattes avant et la queue(82). La réussite de ce type d'expériences conforte le fait que la scoliose est une maladie de stature érigée.

I.4.2. Modèles génétiques et manipulation du génome

Contrairement aux modèles mécaniques de scoliose, les modèles génétiques visent à étudier l'étiopathogénèse de la maladie, soit l'identification des gènes, des mécanismes biomoléculaires ainsi que des voies de signalisation responsables ou prédisposant à la déformation de la colonne vertébrale. Ces modèles sont d'autant plus importants qu'ils peuvent fournir des outils de prédiction, ainsi que de nouvelles voies thérapeutiques ciblant l'origine de la maladie. En plus d'avoir une colonne vertébrale similaire à celle de l'Homme, les modèles génétiques doivent avoir un génome similaire à celui de l'Homme. Les deux principales manipulations génétiques sont la création de Knock-out et Knock-in. Le knock-out d'un gène consiste à insérer une mutation, souvent une insertion ou délétion, qui va engendrer un décalage du code de lecture et donc un codon STOP prématuré. L'ARNm ainsi produit va être reconnu comme anormal par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (nonsense-mediated decay (NMD)) et être dégradé. Ce mécanisme permet d'éviter la production de protéine tronquée. Le résultat d'un knock-out est donc la suppression totale de la production de la protéine cible. Le knock-in consiste quant à lui à insérer une mutation précise, souvent un SNPs (single nucleotide polymorphism) au niveau du gène cible afin d'engendrer la production d'une protéine mutante dont la fonctionnalité sera probablement altérée. Les modèles génétiques étant arrivés plus récemment, le concept que le bipédisme est un prérequis dans le développement de la scoliose a fait en sorte que les recherches se sont concentrées sur les animaux bipèdes ou sur des animaux rendus bipèdes par chirurgie afin de recréer les forces dues à la gravité sur la colonne vertébrale. Il s'avère que les souris sont peu utilisées pour modéliser la scoliose, cependant, différentes souches de souris mutantes présentant des défauts dans la formation ou dans l'homéostasie du tissu conjonctif et du cartilage modélisent certains caractères de la scoliose. Ces lignées sont notamment : la

souris *Col2a1CreERT2* déficiente en *Shp2* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11)(254), la souris *Agc1-CreERT2* déficiente en *Sox9* spécifique au cartilage(255), le double mutant *Gdf5/Gdf6* (growth differentiation factors 5 and 6) (256), la souris déficiente en *Fgfr3* (Fibroblast growth factor receptor 3) (257, 258), la souris *Col2Cre* déficiente en *Gpr126* (G Protein-Coupled Receptor 126) (259). Cependant, il faut noter que ces modèles sont tous des modèles perte de fonction, et par conséquent, ils montrent d'autres anomalies associées à la scoliose. Ils ne sont donc pas des modèles idéals à l'analyse de la génétique de la SIA. À ce jour, il n'existe aucun modèle de souris résultant d'un Knock-in, c'est-à-dire de l'insertion d'une mutation précise au sein d'un gène cible induisant la production d'une protéine mutante.

Le poisson zèbre s'avère être un excellent modèle afin de vérifier la pathogénicité de gènes candidats et explorer les mécanismes impliqués. En effet, des courbures similaires à la SIA ont été observées chez les poissons osseux (téléostes). Ces poissons peuvent développer des malformations de la colonne vertébrale avec l'âge, ou suite à une infection mycobactérienne(260). Ceci est dû au fait que la colonne vertébrale des poissons subit des charges mécaniques dans le sens crânio-caudale similairement à l'Homme, non pas dues à la gravité, mais à la nage. En effet, ces forces sont générées par la propulsion faite au niveau de la queue à l'origine de la nage dans un milieu dense (l'eau). Ces caractéristiques sont donc des avantages dans la modélisation animale de la scoliose. Différentes espèces de poissons sont utilisées dans le domaine de la recherche scientifique, mais le plus commun est le poisson zèbre (*Danio rerio*). Les gènes qui régulent le développement du squelette de ce petit poisson tropical sont conservés chez l'Homme. Le poisson zèbre est facile à entretenir, il possède un petit cycle de vie et le fait que les embryons de poisson zèbre soient translucides est un avantage pour l'étude du développement et notamment du développement de la colonne vertébrale. La colonne vertébrale du poisson zèbre et de l'Homme présentent quelques similarités : les vertèbres sont espacées de manière régulière, elles possèdent des arcs osseux sur le côté ventral et dorsal et les vertèbres précaudales du poisson sont associées avec les segments de la cage thoracique similairement aux vertèbres thoraciques de l'Homme. Chez l'Homme et le poisson zébré, la moelle épinière est protégée par les corps vertébraux.

Pour étudier la cause génétique de la SIA, il est nécessaire d'étudier un modèle animal génétiquement modifié. De nombreuses approches de manipulation du génome ont été utilisées pour répondre à cette demande, mais seulement 3 principaux systèmes ont été utilisés : les nucléases à doigt de zinc (ZFNs), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs), et CRISPR-Cas9 qui est désormais le plus répandu. Jinek et al(261) ont décrit pour la première fois le système CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) qui est devenu l'outil d'édition du génome le plus répandu dans la communauté scientifique. Ce système est décrit pour la première fois chez *Escherichia coli* par Ishino et al(262) en 1987 comme étant un mécanisme de défense adaptative bactérien contre les virus et les bactériophages. Son mécanisme repose sur un complexe composé d'un ARN appelé crARN, qui permet la reconnaissance d'un site spécifique, et d'un ARN transactivateur, permettant de faire le lien entre le crARN et l'enzyme Cas (CRISPR associated). Il est maintenant possible de fusionner les deux ARNs en un ARN chimérique appelé ARN guide. Celui-ci va guider l'endonucléase, composée de deux domaines catalytiques, au niveau de la séquence cible flanquée par des motifs adjacents proto-spacer (PAM) et induire une cassure double brin. Cette cassure est ensuite réparée grâce aux mécanismes de réparation de l'ADN propre à chaque cellule. Dans le cas où un ADN homologue à la séquence ayant subi la cassure est présent, c'est la recombinaison homologue (RH) qui aura lieu et résultera en une insertion, une délétion ou une substitution précise d'un ou plusieurs nucléotides. S'il n'y a pas d'ADN homologue, c'est le mécanisme de jonction d'extrémité non homologue (non-homologous end joining, NHEJ) qui entre en jeu et induit des insertions ou délétions non contrôlées. Il existe trois classes distinctes de système CRISPR-Cas, elles-mêmes subdivisées en sous-groupes. Les systèmes de classe I et II reposent sur un effecteur multiprotéique alors que ceux de classe III ont une protéine effectrice unique(263). Ces dernières sont celles les plus utilisées par la communauté scientifique pour l'édition du génome, l'enzyme la mieux caractérisée et la plus utilisée est la Cas9 de *Streptococcus pyrogenes*. Le principal avantage de cette technologie est que la seule variable se trouve au niveau du guide ARN, qui est spécifique de chaque séquence cible. Le design de l'ARN guide est devenu très simple grâce à de nombreux logiciels en ligne (CRISPR-scan(264), CRISPOR(265) par exemple). CRISPR-Cas9 est donc l'outil d'édition du

génomique le plus simple, le moins dispendieux et le plus rapide. Ces avantages ont engendré un engouement pour cette technologie qui connaît une croissance exponentielle depuis sa mise au point. Cette technologie a beaucoup évolué depuis sa découverte et est maintenant utilisée dans divers domaines afin d'éditer le génome de nombreux organismes, de moduler la transcription et les mécanismes épigénétiques, ainsi que de cribler le génome.

I.5. Hypothèses et objectifs

I.5.1. Hypothèses de recherche

Les recherches sur la génétique de la SIA menées par la communauté scientifique ont permis d'identifier plusieurs gènes codants pour des protéines impliquées dans la structure et le fonctionnement du cil primaire. Plus spécifiquement, notre laboratoire a identifié le gène *POC5*(163) et plus récemment, nos collaborateurs de Londres, sous la supervision du Dr Anne Child, ont isolé un autre gène candidat pour la SIA dans une famille britannique de 5 générations (locus 9q31.2-q34.2(135)), le gène *TLL11*. Ce gène est responsable de la glutamylation de la tubuline de l'axonème du cil primaire. C'est pourquoi l'hypothèse générale de la présente thèse est que des variants rares dans des gènes ciliaires, particulièrement le gène *POC5* et le gène *TLL11*, agissent sur les mécanismes cellulaires responsables des mécanismes de mise en place de la SIA faisant d'elle une maladie appartenant à la grande famille des ciliopathies.

Hypothèse 1 : Les variants du gène *POC5* initialement identifiés dans une cohorte française affectent aussi les populations franco-canadienne et britannique atteintes de SIA.

Hypothèse 2 : La SIA est une condition qui implique d'autres organes ciliaires et les mutations du gène *Poc5* provoquent chez la souris des défauts au niveau des organes ciliaires, semblables à ceux retrouvés dans les ciliopathies.

Hypothèse 3 : Le gène ciliaire *TLL11* est un gène candidat causatif de la SIA et contribue au développement de la maladie *via* son rôle au niveau du cil primaire.

I.5.2. Objectifs de recherche

L'objectif général des travaux présentés dans cette thèse est de valider la contribution fonctionnelle du gène *TLL11* dans la déformation de la colonne vertébrale et de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et tissulaires responsables de la mise en place et du

développement de la SIA *via* l'analyse protéomique et fonctionnelle de deux gènes ciliaires : les gènes *POC5* et *TLL11*. Ces travaux ont été réalisés au niveau cellulaire et au niveau de l'animal entier, dans deux modèles animaux différents : la souris C57BL/6N (pour le gène *POC5*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*, pour le gène *TLL11*). Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la SI est cruciale afin de développer de nouvelles stratégies de prise en charge rapide et précoce des adolescents atteints de cette maladie.

Objectif 1 : Étude de la prévalence des variants du gène *POC5* dans la population atteinte de SIA.

Les études sur la génétique de la SIA ont identifié un très grand nombre de gènes plus ou moins associés ou reliés à la maladie cependant très peu ont été reliés avec le déclenchement de la maladie. Parmi les gènes candidats, le gène *POC5* a été identifié dans notre laboratoire(163) dans une famille multiplex composée de nombreux membres atteints de SI. Le gène *POC5* est un gène crucial dans la formation du cil primaire, ce qui a été un tournant majeur apportant la première pièce d'un puzzle plaçant le cil primaire au centre des hypothèses concernant l'initiation de la maladie. Afin de déterminer la prévalence des variants du gène *POC5*, nous avons composé une cohorte de patients d'origine franco-canadienne ou britannique atteints de SIA ayant une histoire familiale connue ou inconnue (identifiés comme cas sporadiques). Nous avons alors réalisé le criblage du gène *POC5* par différentes techniques que sont le séquençage du génome entier ou bien le séquençage ciblé des 10 exons de ce gène candidat afin de détecter un des trois variants précédemment identifiés chez des individus atteints de SI, p.(A429V), p.(A446T), et p.(A455P) ou encore d'identifier de nouveaux variants et ainsi appréhender l'importance de ce gène et du cil primaire dans la physiopathogenèse de la maladie. Ce premier objectif est décrit dans le manuscrit 1, publié dans la revue *Genes*, édition spéciale « Genetic Conditions Affecting the Skeleton: Congenital, Idiopathic Scoliosis and Arthrogryposis ».

Objectif 2 : Étude du phénotype de différents modèles de souris mutantes pour le gène *Poc5*.

La pathogénicité des variants du gène ciliaire *POC5* identifiés chez l'Homme a été précédemment démontrée chez le poisson zèbre (modèle animal de prédilection pour l'étude de la SIA). En effet, des déformations rotationnelles de la colonne vertébrale ont pu être observées ainsi que des anomalies dans les couches des photorécepteurs de la rétine, c'est pourquoi le second objectif de cette thèse (manuscrit 2) était d'analyser le phénotype de modèles de souris Knock-in pour l'équivalent des variants du gène *POC5* humain dans l'éventualité d'identifier des symptômes de ciliopathie. Ce second objectif est présenté sous forme de manuscrit en préparation pour être soumis dans la revue PLOS One.

Depuis l'identification des variants dans le gène *POC5* ((p.(A429V), p.A446T) et p.(A455P)), nous avons étudié les fonctionnalités du gène *POC5* et l'impact des variants identifiés, notamment chez le poisson zèbre et au niveau de cellules de patients et de cellules transfectées avec le gène muté (163, 196). Dans le but d'élucider les mécanismes pathogéniques biologiques sous-jacents liant ces variants à la scoliose, en collaboration avec l'équipe du Dr Dugué de l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS) à Paris, nous avons créé des lignées de souris mutantes pour le gène *Poc5* (CRISPR-Cas9) afin d'en étudier le phénotype et d'étudier les rôles de ce gène chez le mammifère. Pour cela nous avons créé 2 lignées Knock-in : C57BL/6N^{-poc5emA430T} (équivalent de la mutation humaine p.(A446T)) ; C57BL/6N^{-poc5emA413V} (équivalent de la mutation humaine p.(A429T)). Et le double mutant C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T}, obtenu par croisement entre les deux lignées Knock-in. Afin de caractériser ces modèles génétiques de SIA, nous avons analysé les colonnes vertébrales de nos animaux, les tissus ciliaires (œil, cerveau, foie, rein, cœur, poumons), et les ostéoblastes issus de la colonne vertébrale de ces souris. Ces analyses nous ont permis de vérifier si les variants dans le gène ciliaire *Poc5* entraînent des défauts de la colonne vertébrale chez ces souris et des défauts au niveau d'autres organes ciliaires afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu. De plus, des analyses de micro-CT et du système vestibulaire sont en cours en France et complèteront ce travail ultérieurement.

Objectif 3 : Étude de la pathogénicité du gène *TTLL11* muté au niveau cellulaire et de l'organisme entier chez le poisson zèbre.

En tant que maladie multifactorielle complexe, avec une expressivité et une pénétrance variables, il est maintenant évident que la SIA implique plus d'un gène. Il est fort probable que ces gènes interagissent et/ou partagent des fonctions biologiques similaires. Sur la base des données récentes publiées par notre groupe et d'autres, plusieurs gènes associés avec la scoliose jouent un rôle dans la fonction du centrosome, la polarité cellulaire, le guidage des axones et causent des anomalies des cils primaires. L'équipe de nos collaborateurs à Londres avait identifié le locus candidat 9q31.2-q34.2 dans une famille de 5 générations atteinte de SIA. Le séquençage de ce locus a permis d'identifier le gène candidat *TTLL11*, un gène ciliaire. Ce gène est fonctionnellement relié avec les microtubules centrosomiques et/ou extra-centrosomiques (organisation des cils). En effet, un variant rare dans le gène *TTLL11* a été identifié, le variant c.1569_1570insTT. Nous avons donc validé l'implication de ce gène dans la formation de la colonne vertébrale chez le poisson zèbre, analysé la fonctionnalité de la protéine dans des cellules issues de patients et investigué notre cohorte de familles atteintes de SIA afin de rechercher de potentielles familles supplémentaires porteuses de variants dans ce même gène. L'identification de ce gène ciliaire représentait une opportunité unique d'identifier un mécanisme biomoléculaire à l'origine du développement de la SIA. Ce troisième objectif est décrit dans le manuscrit 3, publié dans la revue Scientific Report.

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Analyses génétiques humaines

II.1.1. Recrutement des patients

Les patients qui ont été recrutés afin de réaliser les analyses présentées dans cette thèse (manuscrit 1 et 3) sont des patients atteints de SIA présentant un angle de Cobb d'au moins 10° avec ou sans histoire familiale. La cohorte que nous avons rassemblée est composée d'individus d'origine franco-canadienne et d'origine britannique, grâce à notre collaboration avec la Dre Anne Child de Londres. Nos protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique du centre hospitalier universitaire Sainte Justine (#3704), un consentement éclairé écrit a été reçu de la part des participants et du représentant légal des participants mineurs lors du recrutement. Pour le manuscrit 1, nous avons utilisé une cohorte contrôle interne d'individus d'origine identique, qui n'ont pas été dépistés pour la SIA. Pour le manuscrit 3, la population contrôle est composée de 3000 individus de même origine qui n'ont pas été dépistés pour la SI.

II.1.2. Séquençage d'exome

Différentes techniques de séquençage ont été utilisées. En effet, nous avons réalisé le séquençage de l'exome entier (WES) grâce à la technologie de séquençage illumina. Afin de réduire les coûts, nous avons utilisé la technologie de séquençage ciblée AmpliSeq (Illumina technology) grâce à la création d'une micropuce ciblant les gènes *POC5* et *TLL11*. Les variants génétiques identifiés ont ensuite été analysés et filtrés grâce à des outils bio-informatiques, notamment ANNOVAR et VarAFT. Les variants candidats ont ensuite été validés par amplification PCR suivie de la technique de séquençage Sanger grâce à l'analyseur ABI 3730xl (Applied Biosystems).

II.2. Études des tissus humains

II.2.1. Culture cellulaire, RT-qPCR et Western Blot

Les fibroblastes humains mutants (DE0193) et contrôle (DE0194) ont été fournis par le Dr Anne Child (Département de cardiologie, St George's Medical School, University of London, UK) et maintenues dans du milieu HAM'S F10 supplémenté en FBS et en antibiotiques et à 37°C et 5% CO₂. L'ADN génomique a été extrait des cellules grâce au kit « Purelink Genomic DNA mini kit » (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) afin de confirmer le génotype par séquençage Sanger.

L'ARNm a été isolé des cellules mutantes et contrôles par la méthode au TRIzol suivant les recommandations du fournisseur afin d'être rétro-transcrit en ADNc et analysé par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) grâce aux amorces spécifiques du transcrit 1 (NM_001139442) et du transcrit 2 (NM_194252) du gène *TLL11*. Les réactions ont été réalisées en triplicatas et normalisées par rapport au gène de ménage *GAPDH*. Les taux relatifs d'ARNm ont été calculés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Le lysat de protéine cellulaire a été obtenu pour les cellules DE0193 et DE0194 grâce au tampon RIPA (Pierce, Thermo-Fisher Scientific) afin de réaliser la migration des protéines sur une membrane de nitrocellulose suivie de la réalisation de Western Blot. Pour cela, nous avons utilisé les anticorps primaires TLL11 (#PA-46070, Thermo-Fisher Scientific 1/500), GT335 (Adipogen #AG-20B-0020 1/1000), PolyE (Adipogen #IN105 1/1000) et β -actine (Santa Cruz Biotechnology #sc-47778) et des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase). Les membranes ont été révélées par chimiluminescence.

II.2.2. Immunofluorescence

Les cellules mutantes et contrôles ont été cultivées dans des chambres de cultures montées sur lame de microscope et ont subi une privation en sérum pendant 24 heures afin de synchroniser les cellules en phase G₀. Les cellules sont ensuite fixées à l'éthanol 70% et perméabilisée dans une solution de PBS 0.1% triton avant l'incubation avec les anticorps

primaires suivant : GT335 (Adipogen #AG-20B-0020 1/1000), PolyE (Adipogen #IN105 1/1000), anti-TTL11 (Thermofisher cat #PA5-46070 1/250) et anti α -tubuline acétylée (Sigma Aldrich cat #T7451 1/2000). Les anticorps secondaires fluorescents utilisés sont le Alexa fluor 488 anti-rabbit (life technologies cat #A11008 1/500) and Alexa fluor 555 anti-mouse (Life technologies cat #A21422 1/500). Les images ont été prises par un microscope Leica.

II.3. Études animales

II.3.1. Approbation des études animales

Les études utilisant des animaux (poisson zèbre et souris) de cette thèse ont été approuvées par le comité d'éthique du centre hospitalier universitaire Sainte Justine et réalisées en accord avec les directives du comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA), ainsi que du Conseil canadien de protection des animaux (Canadian Council on Animal Care) et ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

II.3.2. Chez la souris

Création de souris génétiquement modifiées

Nous avons créé deux lignées de souris mutantes C57BL/6N pour le gène *Poc5* grâce à la technologie CRISPR-cas9 : *C57BL/6N-poc5emA430T* et *C57BL/6N-poc5emA413V*. Notre 3^{ème} lignée est un double mutant qui a été obtenu par le croisement des deux premières lignées, *C57BL/6N-poc5emA413V-A430T*. Après l'extraction de l'ADN de la queue des souris par la méthode du laboratoire Jackson, le génotypage de ces trois lignées de souris mutantes a été réalisé par digestion par enzyme de restrictions suite à l'amplification PCR de la région d'intérêt. En effet, la construction génétique utilisée pour l'insertion des mutations dans le gène *Poc5* a permis la création de site de restriction pour les enzymes Sall (*C57BL/6N-poc5emA430T*) et NheI (*C57BL/6N-poc5emA413V*). Une vérification du génotypage a été réalisée par séquençage Sanger.

Analyse du phénotype osseux des souris

Le système d'imagerie utilisé pour obtenir les modèles 3D de la colonne vertébrale des souris est le scanner micro-CT SKYSCAN 1176 (Bruker, Belgium). Les images ont été prises à une résolution de 36 microns (voltage de la source de rayons X, 30 kV, courant de 360 μ A, filtre d'aluminium de 0.2 mm, temps d'exposition 300 ms et un pas de rotation de 0,8 degrés). La reconstruction des images a été réalisée avec le logiciel NRecon (Bruker, version 1.7.4.2). Ensuite, nous avons utilisé le logiciel CTAn (Bruker, version 1.17.7.2+), pour désigner la région d'intérêt tout au long de la colonne vertébrale (VOI, volume d'intérêt). Le modèle 3D a été alors généré en format stl (stéréolithographie) et analysé en utilisant le logiciel CTVol pour des modèles de rendu surfacique (Bruker, version 2.3.2.0). Les scans ont été analysés avec un code (PyMicroCT) pour reconstituer les trajectoires 3D de la colonne vertébrale qui sont ensuite alignées et comparées entre elles. Le rayon de la courbure de la colonne vertébrale est ensuite déterminé.

Afin de calculer la densité minérale osseuse (DMO) dans les régions trabéculaire et corticale du tibia des souris, les images ont été prises par le scanner micro-CT SKYSCAN 1176 (Bruker, Belgium) (voltage de la source de rayons X, 50 kV, courant de 500 μ A, filtre d'aluminium de 0.5 mm, temps d'exposition 100 ms et un pas de rotation de 0,5 degrés). Pour cette acquisition, la grandeur du voxel isotropique était de 9 μ m. Les images ont été reconstruites avec NRecon. Les régions d'intérêt ont été tracées pour l'os trabéculaire et l'os cortical en utilisant le logiciel CTAn et, par la suite, le set d'images a été segmenté en utilisant des seuils de 70-255 et 85-255, respectivement. Après la calibration de CTAn avec des objets de calibration d'hydroxyapatite de calcium (0,250 et 0,750 g/cc), les DMO ont été calculés en utilisant le même logiciel.

Extraction des ostéoblastes des colonnes vertébrales des souris

Nous avons extrait les ostéoblastes de la colonne vertébrale de souris mutantes pour le gène *Poc5* et des souris contrôles par une technique que nous avons mise au point au laboratoire. Les vertèbres, une fois extraites des souris sont coupées en plusieurs petits morceaux et

déposées dans du milieu de culture α -MEM. Dans ces conditions, les ostéoblastes primaires migrent pour aller se fixer sur le fond de la plaque de culture. Les cellules ainsi extraites sont cultivées dans du milieu de culture DMEM-F12 supplémenté en FBS et en antibiotiques à 37°C et 5% de CO₂.

Caractérisation des ostéoblastes

Afin de caractériser les ostéoblastes primaires extraits des colonnes vertébrales des souris mutantes par rapport aux souris contrôles, nous avons mesuré le taux d'alkaline phosphatase qui est un marqueur de la différenciation des ostéoblastes et nous avons réalisé les tests de coloration à l'alizarine rouge afin de mesurer la calcification des ostéoblastes.

Le taux de prolifération cellulaire des ostéoblastes mutants et WT a lui aussi été mesuré par test MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) suivant les recommandations du fournisseur, aux temps 0, 22, 46, 70 et 118 heures.

Extraction des organes ciliaires et analyse histologique

Les organes ciliaires, soit les reins, les poumons, le cœur, le cerveau, les yeux ainsi que le foie ont été extraits lors de la dissection des souris mutantes et contrôles. Les organes ont ensuite été fixés dans la PFA 4% durant toute une nuit et enrobés dans la paraffine. Les blocs obtenus ont ensuite été coupés en sections de 5 μ m d'épaisseur et montés sur des lames de microscopie. Pour les analyses d'histologie, les lames sont déparaffinées dans du xylène puis réhydratées dans une série de bains d'éthanol avant d'être colorées à l'hématoxyline éosine (H&E) en suivant le protocole standard.

II.3.3. Chez le poisson zèbre

Maintenance et création des poissons zèbres mutants

Les embryons, larves et poissons adultes sont élevés à 28.5°C avec un cycle jour/nuit de 14h:10h et suivant les méthodes standard décrites dans le «zebrafish book(266)». Avant toutes procédures, les poissons zèbres ont été anesthésiés dans une solution de tricaine 0.02%.

Dans un premier temps, nous avons réalisé le knock-down du gène *ttl11* par l'injection d'un morpholino antisens qui a été designer et synthétisé par Gene Tools LLC (USA). La séquence du morpholino utilisé était 5'-GGC TGA TTT GTT ATC TCA TCT AGG T-3', et la séquence du morpholino contrôle était 5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'. L'injection a été réalisée dans les embryons de poisson zèbre au stade une cellule. Les larves obtenues ont été observées sous un stéréomicroscope (SZX16 Olympus).

Suite à cela, une lignée de poisson zèbres mutante pour le gène *ttl11* a été créée par la technologie CRISPR-Cas9. Pour cela, le sgRNA taatagactcactataGGG GTA GAT GCC ATC CCC TTgttttagagctagaa a été designer par le logiciel CRISPRscan pour cibler la séquence **GAG** GTA GAT GCC ATC CCCTT **GGG** (with **PAM**, Protospacer Adjacent Motif). L'injection du matériel CRISPR-Cas9 a été réalisée au stade 1 cellule de l'embryon. La sélection des mutants est faite par HRM (High-resolution melting).

Phénotypage

Les poissons zèbres adultes âgées de 3 mois ont été euthanasiés et fixés dans la PFA 4% durant 24h à 4°C et la colonne l'acquisition de la colonne vertébrale a été obtenue par micro-CT scan (SkyScan 1072 High Resolution Desktop Micro-CT System, Microtomograph, SkyScan) et la reconstruction 3D a été réalisée grâce au logiciel NRecon (Version : 1.6.1.3). L'aspect général des larves de poisson zèbres âgées de 8 jours a été analysé grâce à un stéréomicroscope (Leica M205 FA).

Suite à cela, les poissons zèbres ont été décalcifiés puis enrobés dans la paraffine avant d'être sectionnés transversalement. Les coupes des yeux, d'une épaisseur de 6µm sont ensuite colorées par l'hématoxyline éosine suivant le protocole standard. Nous avons aussi réalisé des immunohistochimies sur les coupes des yeux de poissons zèbre suivant le même protocole que décrit précédemment. Les anticorps utilisés étaient le zpr1, zpr3 (Zebrafish International Resource Center⁹⁵), le 3A10 (Hybridomas Bank) (cat# AB_531874) (1/500) et l'anti α -tubuline acétylée (Sigma Aldrich cat #T7451) (1/2000). Les anticorps secondaires fluorescents étaient le Alexa Fluor 488 (life technologies cat# A11008 1/500) et le Alexa Fluor 555 (Life technologies cat # A21422 1/500).

II.4. Analyses statistiques

Les valeurs présentées dans la présente thèse sont exprimées en moyenne \pm déviation standard. Des tests ANOVA unidirectionnels et Fisher LSD ont été utilisés pour déterminer l'importance des données à distribution normale et à variance égale. L'ANOVA de Kruskal-Wallis et la méthode de comparaison de Dunn ont été utilisées pour les distributions non normales. Les fréquences alléliques des variants génétiques identifiés ont été comparées à la population témoin à l'aide d'un test exact de Fischer unilatéral. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significative.

Chapitre III. Premier article scientifique - Genetic Prevalence of POC5 Mutations in AIS French-Canadian and British Cohort

III.1. Description de l'article et contribution des auteurs

Cette étude, publiée en juillet 2021 dans le journal *Genes*, nous a permis d'atteindre le premier objectif de cette thèse et d'analyser la prévalence des variants du gène *POC5* qui avait été précédemment identifiés. Pour cela, nous avons composé une cohorte de patients d'origine franco-canadienne ou britannique atteints de SIA ayant une histoire familiale connue ou inconnue (identifiés comme cas sporadiques). Nous avons alors réalisé le criblage du gène *POC5* par deux techniques différentes, soit le séquençage du génome entier ou bien le séquençage ciblé des 10 exons de ce gène candidat afin de détecter un des trois variants précédemment identifiés chez des individus atteints de SI, p.(A429V), p.(A446T), et p.(A455P) et éventuellement identifier de nouveaux variants dans ce gène ciliaire. Après vérification par séquençage Sanger, nous avons pu déterminer une prévalence des variants *POC5* de 14% dans notre cohorte de patients atteints de SIA qui est significativement plus importante que dans la cohorte contrôle et nous n'avons pas identifié de variant supplémentaire.

Pour ce projet, j'ai effectué sous la direction du Dre Florina Moldovan, la majorité des expériences de séquençage, la totalité des analyses ainsi que la rédaction et des corrections du manuscrit. Les patients ont été recrutés par le Dre Anne Child, Dr José Antonio Aragon Martin de Londres, et par le Dr Stefan Parent (Soraya Barchi) et Dre Carole Fortin, au Québec. Aurélia Spataru a effectué une partie du séquençage ciblé du gène *POC5*. Le Dre Anne Child et Soraya Barchi ont été d'un grand support dans la rédaction et les corrections du manuscrit. Tous les auteurs ont validé le manuscrit avant sa soumission.

Genetic Prevalence of POC5 Mutations in AIS French-Canadian and British Cohort

Hélène Mathieu¹, Aurélia Spataru¹, José Antonio Aragon-Martin², Anne Child³, Soraya Barchi¹, Carole Fortin^{4,5}, Stefan Parent^{1,6} and Florina Moldovan^{1,7,*}

¹ CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, QC H3T1C5, Canada.

² National Heart and Lung Institute (NHLI), Imperial College, Guy Scadding Building, London SW3 6LY, UK

³ Marfan Trust, National Heart and Lung Institute (NHLI), Imperial College, Guy Scadding Building, London SW3 6LY, UK

⁴ École de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

⁵ Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC H1T1C5, Canada

⁶ Faculty of Surgery, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

⁷ Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

Genes 2021, 12(7), 1032 ; Special Issue Genetic Conditions Affecting the Skeleton: Congenital, Idiopathic Scoliosis and Arthrogyrosis

Published: 1 July 2021

<https://doi.org/10.3390/genes12071032>

III.2. Abstract

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is a complex common disorder of multifactorial etiology defined by a deviation of the spine in three dimensions that affects approximately 2% to 4% of adolescents. Risk factors include other affected family members, suggesting a genetic component to the disease. The *POC5* gene was identified as one of the first ciliary candidate genes for AIS, as three variants were identified in large families with multiple members affected with idiopathic scoliosis. To assess the prevalence of p.(A429V), p.(A446T), and p.(A455P) *POC5* variants in patients with AIS, we used next-generation sequencing in our cohort of French-Canadian and British families and sporadic cases. Our study highlighted a prevalence of 13% for *POC5* variants, 7.5% for p.(A429V), and 6.4% for p.(A446T). These results suggest a higher prevalence of the aforementioned *POC5* coding variants in patients with AIS compared to the general population.

Keywords: *POC5*; adolescent idiopathic scoliosis; cilia; genetics; spine deformity

III.3. Introduction

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is a common disorder characterized by a combination of deviations of the spine in the sagittal and the coronal plane, with vertebral rotation. It affects approximately 3% of the adolescent population [1,2]; affects females more than males, with a ratio ranging from 1.5:1 to 3:1 [2,3]; and is more prevalent in northern latitudes [4]. The etiology of AIS remains not fully understood, but it is now widely accepted that this disorder has a genetic component, as supported by family history, and higher concordance rates for monozygotic twins compared to dizygotic twins [5–7]. Approximately 40% of AIS patients have a family history [8,9]. The genetic model for AIS remains unclear; indeed, several studies have suggested that it is a polygenic and multifactorial disease [9]. However, other analyses suggest mendelian inheritance, such as autosomal dominant or sex-related, could show with incomplete penetrance [10–12]. Since the advent of next-generation sequencing, candidate-gene analysis using pedigrees and population-based genome-wide association studies (GWAS)

have been widely used to assess the genetic etiology of AIS. Despite all these efforts, only a few of the candidate genes have been functionally linked to the development of AIS. In 2015, Patten et al. [13] performed a linkage analysis followed by exome sequencing, and identified coding variants in the centrosomal protein gene *POC5* (NM_001099271) in a multiplex four-generation AIS French family [13]. Indeed, a rare SNP, p.(A446T), was found to perfectly segregate with AIS in four families from a pool of 41 AIS French families. Two additional rare variants, p.(A429V) and p.(A455P), were found in the *POC5* gene in AIS sporadic cases. Moreover, all three *POC5* coding variants were functionally related to AIS using a zebrafish model [13]. More recently, a fourth SNP (rs6892146) was identified to be associated with AIS development in a Chinese population [14], but the three other SNPs were not found in this cohort. *POC5* is a centriolar protein that is essential for cell cycle progression, cilia elongation [15] centriole elongation, and maturation. Since the identification of the *POC5* gene, a ciliary gene that is strongly associated with AIS, the ciliary pathway has been thoroughly investigated and has revealed promising results [12,15–18]

To investigate the prevalence of *POC5* genetic variants in AIS, French-Canadian and British AIS patients were screened by targeted or whole-exome sequencing followed by Sanger analyses of DNA.

III.4. Materials and Methods

III.4.1. Patients

One hundred and seventy-seven AIS patients with a Cobb angle of at least 10°, 73 patients from a British cohort (63 unrelated consecutive IS individuals and 10 families), and 104 patients from a French-Canadian cohort (30 unrelated consecutive AIS individuals and 74 patients from 43 families), were recruited. Genomic DNA was extracted from saliva (Cat. RU49000, Norgen, Thorold, ON, Canada) or blood following the protocol provided by the company.

Samples were collected in accordance with the policies regarding the ethical use of human tissues for research. The protocol used in this study was approved by the Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine Ethics Committee (#3704). The control population consisted of an in-house cohort of 1268 individuals with similar ancestry (French, French-Canadian, or European) and was not screened for the presence of AIS [13].

III.4.2. Targeted Exome Sequencing

A library was generated from 10 ng of genomic DNA to perform targeted sequencing of the POC5 gene using the Ion AmpliSeq (Life Technologies). Sequencing of the 12 exons of POC5 of 63 British unrelated AIS individuals and 10 families, and 18 French-Canadian families affected with autosomal dominant AIS, was performed by the Centre de Génomique Clinique Pédiatrique intégré CHU Sainte-Justine. The library was prepared using the Ion AmpliSeq DNA and RNA Library Preparation (MAN0006735, Rev. B.0, Ion Torrent, Life Technologies) prior to the exome sequencing following the Ion PGM IC 200 Kit (MAN0007661, Rev. B.0) protocol. Sequencing reads were aligned to the reference human genome sequence (hg19) [19] and the SNPs were identified by Ion Reporter (Ion Torrent). Identified variants were annotated using ANNOVAR [20], which is implemented in the VarAFT software [21] that we used to select exonic and splicing variants with a MAF (minor allele frequency) $\leq 1\%$. The identified SNPs were then compared to the EVS (Exome Variant Server) database, the Genome Aggregation Database (gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org> (accessed on 21 March 2020)), and our in-house control cohort (n = 1268).

III.4.3. Whole-Exome Sequencing

A library was generated from 10 ng of genomic DNA to perform whole-exome sequencing using the HiSeq 4000 sequencing machine from the Centre de Génomique Clinique Pédiatrique intégré CHU Sainte-Justine. The gDNA extracted from saliva or blood was sheared to a mean fragment size of 200 pb (Covaris E220 Montreal, PQ, Canada), and gDNA fragments were used for DNA library preparation following the protocol for the SeqCap EZ HyperCap (Roche-

NimbleGen, Pleasanton, CA, USA). Enriched DNA fragments were sequenced with 100 pb paired-end reads (HiSeq 4000, Illumina, Vancouver, BC, Canada). Sequencing reads were converted to FASTQ using bcl2fastq software (Illumina) and trimmed by Trimmomatic. The reads were then aligned to the reference human genome sequence (hg19) using the Burrows–Wheeler transform (BWT), followed by a local alignment for indels using Genome Analysis ToolKit software (Broad Institute). Duplicate sequencing reads were excluded by Picard software, and SNPs were identified using the GATK Unified Genotyper and annotated by ANNOVAR software [20], implemented in the VarAFT software [21] that we used to select exonic and splicing variants with a MAF (minor allele frequency) $\leq 1\%$ in the *POC5* gene. The identified SNPs were then compared to the EVS (Exome Variant Server) database, the Genome Aggregation Database (gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org> (accessed on 21 March 2020)), and our in-house control cohort (n = 1268).

III.4.4. Validation with Sanger Sequencing

All *POC5* coding variants identified by WES or targeted exome sequencing were validated by Sanger sequencing. The segregation of the coding variants was also completed using Sanger sequencing for the take-out-concerned families studied. PCR amplification was performed using the TransStart FastPfu FLY DNA Polymerase (AP231, Civic Bioscience) following the instructions of the manufacturer with primers FWD-5'- GGACCAAACCTTTAGCCAGTATG-3' and RV-5'-TCTCGATCTCCTGACCTCGT-3'. Sanger sequencing of amplicons was performed on an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Louisville, KY, USA) at Eurofins Genomics (Louisville, KY, USA).

III.4.5. Statistics

The allelic frequency of the *POC5* coding variants was compared to the control population using a one-tailed Fischer's exact test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

III.5. Results

III.5.1. Patient Enrolment

Since the identification of *POC5* as a candidate gene for adolescent idiopathic scoliosis and its functional validation, we have analyzed the prevalence of *POC5* coding variants within the AIS population, and also have sought to identify new candidate genes. Ninety AIS French-Canadian families were recruited demonstrating different types of transmission: autosomal dominant or recessive, and 30 AIS sporadic cases. For this study, 43 families were selected. Our French-Canadian cohort was supplemented with the 73 UK AIS patients of our collaborators from London, United Kingdom.

III.5.2. *POC5* Variants Prevalence Using Next-Generation Sequencing

Among the 53 French-Canadian and British AIS families and 94 unrelated AIS patients, 177 AIS patients were screened for *POC5* coding variants. The combination of whole-exome sequencing and targeted sequencing by AmpliSeq using a targeted Amplicon chip followed by a confirmation with Sanger sequencing revealed that 13% ($p < 0.0001$, Fisher's exact test) of AIS patients with or without family history were carrying one of the three variants of *POC5*, previously identified as the first causative gene [13]C. Indeed, 11 of them carried the A429V variant (6 familial and 5 sporadic cases); i.e., 7.5% ($p < 0.0001$), and 11 were found to carry the A446T variant (2 familial, 6 sporadic cases); i.e., 6.4% ($p = 0.0052$). No patient with the A455P variant was reported ([Table 1](#)).

Data	Families (n=53; 83 AIS patients)	AIS cases with unknown pedigree data (n=94)	Controls matched for ethnicity with families and cases (n=1268)	Comparison of allelic frequency of the rare variants in AIS cases vs controls (Fisher's exact test, one tailed)
Sequencing Methods	WES + Targeted exome	WES + Targeted exome	WES + Sanger	
p.(A446T)	2/53 3,8%	6/94 6,4%	19/1268 1,5%	p=0.0052
p.(A429V)	6/53 11,3%	5/94 5,3%	9/1268 0,7%	p<0.0001
<i>POC5</i> coding variants	8/53 15,1%	11/94 11,7%	28/1268 2,2%	p<0.0001

Table III.1. *POC5* Coding Variant Distribution Among the French-Canadian and British AIS Cohort Compared to 1268 Controls.

The number of patients from families or sporadic cases that were carrying *POC5* coding variants and the frequency for each of the 2 variants (p.(A446T) and p.(A429V)) are reported.

The EVS (Exome Variant Server) database [22] reported a minor allele frequency (MAF) in the European-American population of 1.2% for the p.A429V variant and 1.5% for p.A446T. The Genome Aggregation Database (gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org> (accessed on 21 March 2020)) [23] reported a MAF of 1.1% for the p.A429V (rs146984380) variant and 1.6% for p.A446T (rs34678567).

III.5.3. Segregation Analysis of *POC5* Coding Variants With AIS

The segregation analysis of the *POC5* coding variants with the disease for the AIS families was then performed using Sanger sequencing (*Figure II.1*). The variant p.(A446T) was found in two families (F62 and F80), and showed a perfect segregation with the disease in family 80. Sadly, DNA was not able for the rest of family 62. For the families that were found to carry the variant p.(A429V) - F02, F18, F37, F57, F58, and F66 - the segregation analysis showed incomplete penetrance (*Figure II.1*).

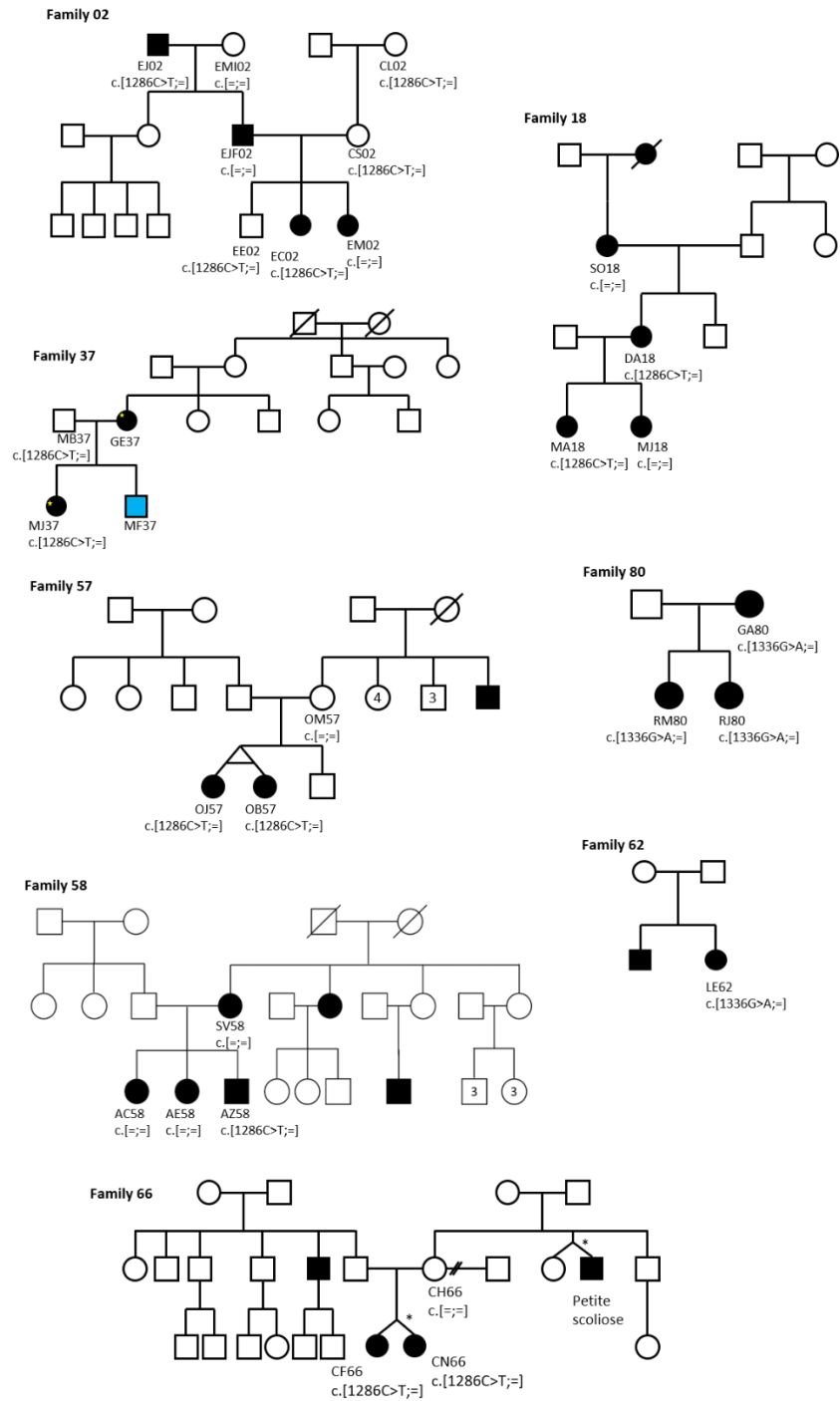


Figure III.1. Pedigrees of French-Canadian Families Showing the Co-Segregation of *POC5* Variants (c. 1286C > T (p.(A429V) and c.1336G > A (p.(A446T)) With the Disease.

Open circles and squares indicate unaffected individuals, Blackened circles and squares indicate affected females and males, respectively. Blue circles and squares indicate juvenile females and males. Yellow stars indicate exomed AIS patients. * Incomplete penetrance.

III.6. Discussion

We reported the prevalence of *POC5* gene variants in 13% of AIS patients with or without a family history of this condition; that is, six times more frequent than in our inhouse control cohort that matched for ethnicity. Two methods were used for the screening of *POC5* gene in both French-Canadian and British families with AIS. This study confirmed the previously reported data by Patten et al. [13], which evidenced three rare SNPs (p.A446T, p.A429V, and p.A455P) in the *POC5* gene in four families of a pool of 41 AIS French families and 150 IS cases from France. We also confirmed the autosomal dominant transmission pattern of *POC5* coding variants in families with AIS.

Adolescent idiopathic scoliosis is a complex disease with a multifactorial etiology including genetic, environmental, and hormonal factors, but the pathogenesis of this disease remains poorly understood. To decipher the genetic implication in AIS, different approaches were used: association studies and linkage analyses to identify causative genes or genes that may impact AIS susceptibility and/or disease progression. Many association studies were performed using GWAS technology and genome-wide linkage analysis, followed by exome sequencing and highlighted multiple-locus candidate, especially on chromosomes 6, 9, 16, 17 [24], and 19 [25]. *POC5*, locus 5q13.3, was the first unambiguously causative gene that was identified and functionally related to the diseases using a zebrafish (*Danio rerio*) model. The three causative variants of the *POC5* gene (p.A429V, p.A446T, and p.A455P) were found in exon 10, and all three corresponded to the substitution of an alanine to another amino acid, suggesting that the alanine in exon 10 of *POC5* could play an important role in the pathogenesis of AIS. Our study supported the importance of *POC5* variants in the AIS population. In AIS patients from French-Canadian and British families, we found *POC5* variants in 13% of AIS cases, but not all the variants showed a perfect segregation with the disease, highlighting the fact that AIS is a complex disease, and very likely a polygenic disorder. In our cohort of French-Canadian subjects, the previously identified variant in IS cases, namely p.A429V, was the most predominant.

To date, these three variants of *POC5* have not been found in the Chinese population [14]; however, in the cohort of this Chinese study, AIS patients were not screened for their family history. It is important to underline that *POC5* gene variants were first identified in a huge multiplex family in which variants and the disease were transmitted in an autosomal dominant manner through four generations. This was consistent with the hypothesis of the initiating role of *POC5* in the development of the familial form of AIS.

POC5, a conserved protein, is essential for centriole assembly, elongation, and cell cycle [15,26]. Recent studies identified *POC5* as interacting with *POC1B*, *FAM161A*, and *centrin-2* to build an inner scaffold with an helicoidal assembly, which provides the structural flexibility and strength to maintain microtubule and ciliary cohesion [27]. It can be hypothesized that those alanines in exon 10 of *POC5* are important for the proper interaction of *POC5* with its protein partners, and therefore for the proper ciliary integrity. Several osteogenic pathways are hosted on primary cilia, including Sonic Hedgehog, Wnt, or the calcium-signaling pathway, and could play a part in AIS pathogenesis. More recently, primary cilia have been found to be related to bone-mass reduction through the microtubule (MT) network disorganization caused by the reduction of MT anchorage to the basal body [28]. Altogether, these findings could explain the low bone mineral density observed in AIS patients [29].

III.7. Conclusion

The *POC5* gene was one of the first pieces of the puzzle of the genetic etiology of AIS, and since its identification, other genes coding for components of the primary cilia have been found to be linked to this disease [12,16]. Our study confirmed a higher prevalence of *POC5* variants in patients with AIS compared to the general population, as Patten et al. [13] already reported, and this reinforces that *POC5* plays a role in the pathogenesis of AIS. The functionality of those variants also was previously reported [13], and was related to ciliary functionality [15]. Further investigations are necessary in order to identify additional genes and finally draw complete pathways that relate the primary cilia to AIS. Finding causative genes for AIS and understanding

the molecular consequences of these gene variants is necessary to improve the knowledge about this disease, especially by deciphering the genetic involvement.

III.8. Acknowledgments

Special thanks to the Clinical Research Orthopaedic Unit (URCO) team, who contributed to the recruitment of the patients. We also thank Philippe Campeau for his help with the exome analysis.

Funding

This study was supported by the Yves Cotrel Foundation (to F.M., S.P., and A.C.), the Scoliosis Research Society (to F.M.), the Marfan Trust UK (to A.C. and J.A.A.-M.), the Peter and Sonia Field Charitable Trust (to A.C.), and St. George's University of London (to A.C. and J.A.A.-M.). This study also was supported by RSBO (Réseau de recherché en Santé Buccodentaire et Osseuse), CHU Sainte-Justine Foundation (to H.M.), and FRQS (to H.M.).

Institutional Review Board Statement

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine Ethics Committee (protocol code #3704, July 2016).

Informed Consent Statement

Written informed consent was obtained from all subjects involved in this study and from legally authorized representative of minor participants prior to enrollment.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

III.9. References

1. Edery, P.; Margaritte-Jeannin, P.; Biot, B.; Labalme, A.; Bernard, J.C.; Chastang, J.; Kassai, B.; Plais, M.H.; Moldovan, F.; ClergetDarpoux, F. New disease gene location and high genetic heterogeneity in idiopathic scoliosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 2011, 19, 865–869. [CrossRef] [PubMed]
2. Fadzani, M.; Bettany-Saltikov, J. Etiological theories of adolescent idiopathic scoliosis: past and present. *Open Orthop. J.* 2017, 11, 1466–1489. [CrossRef]
3. Konieczny, M.R.; Senyurt, H.; Krauspe, R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J. Child. Orthop.* 2013, 7, 3–9. [CrossRef]
4. Grivas, T.B.; Vasiliadis, E.; Mouzakis, V.; Mihas, C.; Koufopoulos, G. Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes. *Scoliosis* 2006, 1, 9. [CrossRef]
5. Mongird-Nakonieczna, J.; Kozłowski, B. Functional and structural scoliosis in monozygotic twins. *Chir. Narządów Ruchu Ortop. Pol.* 1976, 41, 34–36.
6. Grauers, A.; Rahman, I.; Gerdhem, P. Heritability of scoliosis. *Eur. Spine J.* 2012, 21, 1069–1074. [CrossRef] [PubMed]
7. Zaydman, A.M.; Strokova, E.L.; Pahomova, N.Y.; Gusev, A.F.; Mikhaylovskiy, M.V.; Shevchenko, A.I.; Zaidman, M.N.; Shilo, A.R.; Subbotin, V.M. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. *Med. Hypotheses* 2021, 151, 110585. [CrossRef]
8. Mongird-Nakonieczna, J.; Kozłowski, B. Familial occurrence of idiopathic scoliosis. *Chir. Narządów Ruchu Ortop. Pol.* 1976, 41, 161–165.

9. Miller, N.H. Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2007, 462, 6–10. [CrossRef] [PubMed]
10. Axenovich, T.I.; Zaidman, A.M.; Zorkoltseva, I.V.; Tregubova, I.L.; Borodin, P.M. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect. *Am. J. Med. Genet.* 1999, 86, 389–394. [CrossRef]
11. Justice, C.M.; Miller, N.H.; Marosy, B.; Zhang, J.; Wilson, A.F. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003, 28, 589–594. [CrossRef]
12. Mathieu, H.; Patten, S.A.; Aragon-Martin, J.A.; Ocaka, L.; Simpson, M.; Child, A.; Moldovan, F. Genetic variant of TLL11 gene and subsequent ciliary defects are associated with idiopathic scoliosis in a 5-generation UK family. *Sci. Rep.* 2021, 11, 11026. [CrossRef]
13. Patten, S.A.; Margaritte-Jeannin, P.; Bernard, J.C.; Alix, E.; Labalme, A.; Besson, A.; Girard, S.L.; Fendri, K.; Fraisse, N.; Biot, B.; et al. Functional variants of POC5 identified in patients with idiopathic scoliosis. *J. Clin. Investig.* 2015, 125, 1124–1128. [CrossRef] [PubMed]
14. Xu, L.; Sheng, F.; Xia, C.; Li, Y.; Feng, Z.; Qiu, Y.; Zhu, Z. Common variant of POC5 is associated with the susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2018, 43, E683–E688. [CrossRef]
15. Hassan, A.; Parent, S.; Mathieu, H.; Zaouter, C.; Molidperee, S.; Bagu, E.T.; Barchi, S.; Villemure, I.; Patten, S.A.; Moldovan, F. Adolescent idiopathic scoliosis associated POC5 mutation impairs cell cycle, cilia length and centrosome protein interactions. *PLoS ONE* 2019, 14, e0213269. [CrossRef] [PubMed]
16. Oliazadeh, N.; Gorman, K.F.; Eveleigh, R.; Bourque, G.; Moreau, A. Identification of elongated primary cilia with impaired mechanotransduction in idiopathic scoliosis patients. *Sci. Rep.* 2017, 7, 44260. [CrossRef] [PubMed]

17. Grimes, D.T.; Boswell, C.W.; Morante, N.F.; Henkelman, R.M.; Burdine, R.D.; Ciruna, B. Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature. *Science* 2016, 352, 1341–1344. [CrossRef]
18. Laura, M.-H.; Yasmine, C.-B.; Raphaël, P.; Lotfi, S.; Hugues, P.-M. The orthopedic characterization of cfap298tm304 mutants validate zebrafish to faithfully model human AIS. *Sci. Rep.* 2021, 11, 7392. [CrossRef]
19. Bearce, E.A.; Grimes, D.T. On being the right shape: Roles for motile cilia and cerebrospinal fluid flow in body and spine morphology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2021, 110, 104–112. [CrossRef] [PubMed]
20. Wang, K.; Li, M.; Hakonarson, H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, e164. [CrossRef]
21. Desvignes, J.P.; Bartoli, M.; Delague, V.; Krahn, M.; Miltgen, M.; Beroud, C.; Salgado, D. VarAFT: A variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46, W545–W553. [CrossRef]
22. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA, USA. Available online: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accessed on 21 March 2020).
23. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alföldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020, 581, 434–443. [CrossRef] [PubMed]
24. Miller, N.H.; Justice, C.M.; Marosy, B.; Doheny, K.F.; Pugh, E.; Zhang, J.; Dietz, H.C., 3rd; Wilson, A.F. Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2005, 30, 1181–1187. [CrossRef] [PubMed]

25. Chan, V.; Fong, G.C.; Luk, K.D.; Yip, B.; Lee, M.K.; Wong, M.S.; Lu, D.D.; Chan, T.K. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 71, 401–406. [CrossRef] [PubMed]
26. Azimzadeh, J.; Hergert, P.; Delouvee, A.; Euteneuer, U.; Formstecher, E.; Khodjakov, A.; Bornens, M. hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J. Cell Biol.* 2009, 185, 101–114. [CrossRef]
27. Le Guennec, M.; Klena, N.; Gambarotto, D.; Laporte, M.H.; Tassin, A.M.; van den Hoek, H.; Erdmann, P.S.; Schaffer, M.; Kovacik, L.; Borgers, S.; et al. A helical inner scaffold provides a structural basis for centriole cohesion. *Sci. Adv.* 2020, 6, eaaz4137. [CrossRef] [PubMed]
28. Shi, W.; Zhang, Y.; Chen, K.; He, J.; Feng, X.; Wei, W.; Hua, J.; Wang, J. Primary cilia act as microgravity sensors by depolymerizing microtubules to inhibit osteoblastic differentiation and mineralization. *Bone* 2020, 136, 115346. [CrossRef] [PubMed]
29. Beling, A.; Hresko, M.T.; DeWitt, L.; Miller, P.E.; Pitts, S.A.; Emans, J.B.; Hedequist, D.J.; Glotzbecker, M.P. Vitamin D levels and pain outcomes in adolescent idiopathic scoliosis patients undergoing spine fusion. *Spine Deform.* 2021. [CrossRef]

Chapitre IV. Second article scientifique - Phenotypic Characterisation of POC5 Mutant Mice Models of Adolescent Idiopathic Scoliosis

IV.1. Description de l'article et contribution des auteurs

Le manuscrit 2 est actuellement en préparation afin d'être soumis dans la revue *PLOS One*. Ce projet vise à répondre à l'objectif 2 qui était d'analyser la colonne vertébrale et le phénotype de modèles de souris Knock-in pour l'équivalent des variants du gène *POC5* humain dans l'éventualité d'identifier des symptômes de ciliopathie. Nous avons donc créé trois lignées de souris mutantes, la première est porteuse de l'équivalent du variant p.(A429V), la seconde est porteuse de l'équivalent du variant p.(A446T), et la troisième est un double mutant porteur des deux mutations précédentes. Nos études ont permis d'observer une cyphose pour la lignée de souris double mutante, l'analyse des ostéoblastes extraits des colonnes vertébrales des souris âgées d'un mois a mis en évidence un défaut dans la prolifération et dans la différenciation des cellules mutantes par rapport aux cellules contrôles. De plus, nous avons mis en évidence une diminution du pourcentage de cellules ciliées pour les ostéoblastes mutants, traduisant un défaut de la ciliogenèse. Enfin, l'analyse histologique, par coloration hématoxyline éosine, des organes ciliaires (cœur, cerveau, reins, foie, poumon, rétine) des souris mutantes âgées d'un mois a révélé un défaut dans la structure du foie uniquement où une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes est observée. Des analyses ultérieures doivent être menées sur des souris plus âgées afin d'évaluer l'éventuelle évolution des symptômes et de la maladie.

Ce projet a été réalisé sous la direction du Dre Florina Moldovan en collaboration avec le Dr Guillaume Dugué, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris, France. J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans ce manuscrit, les analyses ainsi que la rédaction

du manuscrit. Amani Hassan a participé au design de la machinerie CRISPR-Cas9 utilisée pour la création des lignées de souris. Les résultats présentés pour les analyses cellulaires ont été réalisés par Samuel Bourdages, lors de son stage de Baccalauréat Sciences Biopharmaceutiques, Faculté de pharmacie, Université de Montréal (SBP3500), sous ma supervision.

Phenotypic Characterisation of POC5 Mutant Mice Models of Adolescent Idiopathic Scoliosis

Hélène Mathieu¹, Amani Hassan¹, Samuel Bourdages¹, Guillaume Dugué², Florina Moldovan^{1,3}

¹CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, Québec, H3T1C5, Canada.

²Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris, France

³Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada

PLOS One

In preparation

IV.2. Abstract

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is a complex disorder defined by a 3D spinal deformity and is highly heterogeneous from a phenotypically and etiologically point of view. It is well accepted that AIS has a genetic contribution and the implication of primary cilia, especially the *POC5* SNPs (p.(A429V), p.(A446T) and p.(A455P)), is well described through the literature. The *POC5* gene was also reported in retinitis pigmentosa, another ciliary-related disease. To understand the role of the *POC5* SNPs in mammals, three *Poc5* mutant quadrupedal mouse lines were generated using the CRISPR/Cas9 technology, and the phenotype compared to control mice was studied. Kyphosis was reported for the double mutant *C57BL/6N^{poc5emA413V-A430T}* but no spinal curvature within the 3 mutant lines was observed during the mouse puberty period. Moreover, we observed impaired osteogenic differentiation, proliferation and ciliogenesis in *Poc5* mutant mouse line compared to controls. The ciliary tissues analysis revealed hepatic steatosis in mutant mice compared to control mice. These findings suggest that AIS caused by ciliary genes, especially *POC5*, could be classified as a subtype of ciliopathy and more analysis should be done to decipher the mechanism and to assess the effect of bipedalism in these mutant mice. These findings will allow new therapeutical strategies.

IV.3. Introduction

The centriolar protein POC5 (POC5 Centriolar Protein 5) is a conserved centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles¹. *POC5* variants are associated with abnormal curvature of the spine namely idiopathic scoliosis (IS)^{2,3}, as well as with autosomal recessively inherited retinitis pigmentosa⁴, that is characterized by progressive loss of the photoreceptors (rods and cones). Genetic variants in the *POC5* gene contribute to the occurrence of IS as we had previously reported that 3 SNPs in *POC5* gene (p.(A429V), p.A446T) and p.(A455P)) were associated with familial IS² and AIS⁵. Indeed, the prevalence of these *POC5* SNPs was shown to be around 10-13% in French, French-Canadian and British families and in sporadic cases⁵. A fourth SNPs, rs6892146, was associated to this disease in a Chinese cohort³ but no case of

mutation for this SNP was reported in our French-Canadian cohort⁵. These three SNPs were functionally associated with scoliosis in the zebrafish animal model (*Danio rerio*)².

The underlying causes of IS are not well understood, but they appear to be of multifactorial nature including skeletal connective tissue anomalies, metabolic hormonal abnormalities, developmental imbalance, vestibular and proprioceptive systems, biomechanical factors, uncoupled neuro-osseous growth, failure of corticospinal and somatosensory neuronal tracts, and cilia and disruption in spinal fluid flow⁶⁻⁸.

POC5 protein is ubiquitously expressed and located at the distal end of centrioles¹. In mammalian cells centrioles are the keys for the stability of the centrosome and their duplication^{9,10}. *Poc5*, that was first identified in the *Chlamydomonas reinhardtii*¹¹, has a strong evolutionary conservation among eukaryotes making it an ancestral core centriolar protein. Recently, *Tetrahymena Poc5* has been identified as a transient basal body component essential for basal body maturation, which is required for templating, orienting, and anchoring primary cilia at the cell surface¹². *Poc5* was also found to colocalise with the centrin in the connecting cilium of zebrafish photoreceptors, that is required for the formation and integrity of the retina⁴.

In humans, the centriolar protein 5 is coding by *POC5* gene that is located on chromosome *5q13*. The centriolar protein POC5 contains centrin-binding repeats (CBRs) and is required for the distal portion of centrioles elongation and maturation. *POC5* depletion leads to short centrioles lacking the entire central-distal region¹. The protein POC5 interacts with key proteins like inversin and centrin¹³, both are crucial for cell division, cell polarity, and cell motility. Moreover, POC5 has been found to be part of the structure of dense mesh-like inner scaffold of the centriole with POC1B, FAM161A and centrin-2, that is required for centriole biogenesis, cohesion, and integrity¹⁴. Additionally, this inner scaffold could be the structure that realigns microtubules before primary cilia extension¹⁴. We previously found that in AIS *POC5* mutant cells, the POC5 protein localisation is impaired, as well as its ability to interact

with partners¹⁵. Moreover, AIS *POC5* mutant cells have a shorter primary cilium and an impaired cell cycle progression¹⁵.

All these recent findings have opened new avenues to elucidate the etiology of AIS and the primary cilia seems to be strongly implicated in the drawing, especially through the role of *POC5*. To understand the role of the *POC5* protein in mammals, we created three *POC5* mutant mouse lines carrying the *POC5* SNPs (*C57BL/6N^{-poc5emA413V}*, *C57BL/6N^{-poc5emA430T}*, and *C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T}*) (*Figure IV.1*) using the CRISPR/Cas9 gene editing technology, and we established the phenotype compared to their wild-type littermates.

IV.4. Material and Method

IV.4.1. Animal Study Approval

All animal procedures applied in this study were carried out following the guidelines set out by the CHU Sainte-Justine Research Center, the Canadian Council for Animal Care (CCAC), the “Comité de Déontologie de l’Expérimentation sur les Animaux” (CDEA), which is the local animal care committee at the University of Montreal, Canada and approved by the Animal Care Committee of McGill University. The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments). This study was approved by the ethics committee for CHU Sainte-Justine Research Center, University of Montreal (ZF-09-60/Category B). Protocols 2020-2760 and 2020-2753.

IV.4.2. Mutant Mouse Line Generation

The *Poc5* mutant mouse lines were created at the McGill Integrated Core for Animal Modelling (MICAM, Montréal, Canada) using the CRISPR/Cas9 gene editing approach in one-cell-stage embryos. The sgRNA, 5’-GACCTCGGCCGGAAGCTACGT-3’, was designed using the CRISPOR software¹¹ to create a knock-in mouse line carrying the variant p.(A430T) that corresponds to the human p.(A446T) variant, and we refer to it: *C57BL/6N^{-poc5emA430T}* (*Figure IV.1*). *C57BL/6N*CrI zygotes (E0.5) were microinjected using Cas9 protein (IDT, #1081058), sgRNA (Synthego) and

127nt single stranded oligo donors (ultramer, IDT) with concentrations of 50:50:30ng/ul respectively. The sgRNA was also designed to insert a Sall restriction site (G/TCGAC) for genotyping. The sgRNA: 5'-GCGTCACTGCCTTCCCTCC-3' was designed using the CRISPOR software¹¹ to create a knock-in mouse line carrying the variant p.(A413V) that correspond to the human p.(A429V), and we refer to it: *C57BL/6N^{poc5emA413V}* (Figure IV.1). The sgRNA was also designed to insert a NheI restriction site (G/CTAGC) for genotyping. The line *C57BL/6N^{poc5emA413V}* was created by microinjecting *C57BL/6N^{CrI}* zygotes using the same method described above. The designed sgRNAs have no identified off-targets according to CRISPOR. All the sequences are detailed in Table IV.1. A third mutant mouse line was obtained by the crossing of the *C57BL/6N^{poc5emA430T}* x *C57BL/6N^{poc5emA413V}* to obtain a double mutant mouse line: *C57BL/6N^{poc5emA413V-A430T}*.

SNP	Restriction site added	Mutated sequence (silent mutation to generate restriction site in green, reproduced human SNP in red)
p.(A413V)	NheI	... GTA GCT AGC GTC ACT ...
p.(A430T)	Sall	... GCT ACG TCG ACC TCT ...
gRNA	Nucleotide Sequence	
p.(A413V)	GGAGGGAAAGGCAGTGGCAC TGG	
p.(A430T)	GACCTCGCCGGAGCTACAT CGG	
ssODN	Nucleotide Sequence	
p.(A413V)	CCTGCACTGAGAATAGAGATGGGAACGTGAAGAGAAGAGGTCGACGTAGCTCCGGCCGAGGTC AGGGAAGCAGCGGAGGGAAAGGCAGTGACGCTAGCTACTCCTGCTGCTAATGGTCCAGAGGGCA	
p.(A430T)	caaaccgtactgacCGATTCCTCTGGGGCAGGAGCAGCTGCAGATCCTGCACTGAGAATAGAGATGG GAACGTGAAGAGAAGAGGTCGACGTAGCTCCGGCCGAGGTCAGGGAAGCAGCGGAGGGAA	

Table IV.1. Nucleotide Sequences Used For the Mutant *Poc5* Mutant Mouse Lines.

Table showing the nucleotide sequence for primers that were used for genotyping, for the guide RNA and for the single-stranded oligodeoxynucleotides that was designed for CRISPR-Cas9 genetic manipulation.

IV.4.3. DNA Extraction and Genotyping

Restriction enzyme genotyping approaches were established for all the three mutant mouse lines. Mice DNA was first extracted using the Jackson laboratory's method. The tails were incubated overnight at 56°C in lysis buffer (10mM Tris pH 8,0, 100mM NaCl, 10mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, 10µL of proteinase K). Then, 300µL of NaCl 5M were added and the samples were incubated for 10min on ice. The samples were then centrifuged for 10min at 4°C and 6000rpm. The supernatants were transferred to new Eppendorf tubes and incubated with 500µL isopropanol for 15min at RT and centrifuged for 10min at RT, 15000rpm. The pellets were then dried and resuspended in 100µL of distilled water.

Poc5 gene was amplified by PCR using the primers Forward: 5'-AGAACTCCATTTTAGCCATTAGTCT-3' and reverse: 5'-TTTCTGAGGGTTGGCTCGTC-3'. PCR conditions were implemented according to the manufacturer's instructions with Fast fly polymerase (Civic Bioscience, Beloeil, Canada, #AP221). For all primers temperatures and cycles conditions were: 2 min at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 20s, 56°C for 30s and 72°C for 40s, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were then mixed with the restriction enzyme Sall (NEW ENGLAND BIOLABS, #R3138S), that correspond to the p.A430T mutation, or NheI (NEW ENGLAND BIOLABS, #R3131S), that correspond to the p.A413V mutation. The digestion products were then loaded on an agarose gel 4% to determine the genotype. The genotype was then confirmed by Sanger sequencing using an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Louisville, KY, USA) at Eurofins Genomics (Louisville, KY, USA).

IV.4.4 Bone phenotype analysis

Spinal growth was assessed for mutant and control mice using microCT. Mice were anaesthetized with isoflurane and scanned by the microCT scanner Skyscan 1176 (Bruker, Belgium) along the puberty period, at 25, 35, and 45 days old. The acquisition parameters were voxel 9 μm , 30 kV, 360 μA . The exposure time was 300ms with 0.8 degrees of rotation. The acquisition was performed from the base of the skull to the 3rd-4th caudal vertebra. Three-dimensional images were then reconstructed using NRecon software (Bruker, version 1.7.4.2). The spines of older mutant and control mice (7 to 11 months old) were assessed by microCT scans. The three-dimensional images were then analysed using an in-house code (PyMicroCT) to reconstruct the spinal 3D trajectory. All the trajectories were then aligned and the radius of the curvature in the thoracic region was determined.

The trabecular bone mineral density (BMD) and the cortical tissue mineral density (TMD) for the tibia proximal of 12 weeks-old mice were measured from the microCT scans obtained by the Skyscan 1176 scanner. The acquisition parameters were voxel 9 μm , 50 kV, 500 μA with 100 ms exposure and 0,5 degrees of rotation. The images were reconstructed using NRecon software (Bruker, version 1.7.4.2) and the BMDs were calculated using the CTAn software (Bruker, version 1.17.7.2+).

IV.4.5. Spinal Osteoblast Extraction and Culture

The osteoblasts were isolated from the spine of 1-month-old mice. Immediately following euthanasia, the spines were extracted from the mice under sterile conditions. The vertebrae were sliced in sterile conditions and maintained in α -MEM medium (Wisent, Montreal, Canada, #310-010-CL), 10% FBS (Wisent, Montreal, Canada, #098-150), 1% PSG for 28 days at 37°C in 5% CO₂ incubator to allow the osteoblasts to migrate from the vertebrae to the adherent surface of the plate. Then, the osteoblasts were collected in a new flask by trypsinization and maintained in DMEM F12 medium (Wisent, Montreal, Canada, #319-075-CL) supplemented

with 10% FBS (Wisent, Montreal, Canada, #098-150), Penicillin-streptomycin final concentration 100 µg/ml, at 37°C in 5% CO₂ incubator.

IV.4.6. Alkaline Phosphatase Assay

The cells were seeded in 12-well plate and cultivated in mineralization medium (a-MEM 10% FBS, 1% PSG, dexamethasone 10nM, ascorbic acid 50 µg/mL and β-glycerophosphate 2,5mM) for 12 days. The cells are then fixed in 4% PFA prior to being treated with 500µL of alkaline phosphatase reagent (0,005g α-naphthol, 0,01g Fast Red, 62,5µL 2-methoxyethanol diluted in 32mL of TBS, pH 9) for 1 hour at RT. Pictures were then captured with Leica M205 FA microscope. The cells were resuspended in 500 µL of TBS and transferred in 96-well plate in triplicate to measure the absorbance at 415nm using a microplate reader (BMG Labtech, CLARIOstar Plus). The alkaline phosphatase activity was determined compared to a standard curve.

IV.4.7. Alizarin Red Assay

The cells were seeded in 12-well plate and cultivated in mineralization medium (a-MEM 10% FBS, 1% PSG, dexamethasone 10nM, ascorbic acid 50 µg/mL and β-glycerophosphate 2,5mM) for 28 days. The cells were then fixed in 4% PFA prior to being treated with 1mL of Alizarin Red 40mM solution (SIGMA, #TMS-008-C, pH 4,1) for 20min at RT. Pictures were captured with Leica M205 FA microscope. The cells were then treated with 800µL acetic acid 10% for 30min at RT and collected in Eppendorf tubes to be heated at 85°C for 10min. The samples were incubated on ice for 10min and centrifuged at 20 000g for 15min at RT prior to be mixed with 10% ammonium hydroxide (ratio 5/1) and transferred in 96-well plate, in triplicates, to measure the absorbance at 405nm using a microplate reader (BMG Labtech, CLARIOstar Plus). The results were compared to a standard curve (Alizarin red concentrations: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL et 0 µg/mL).

IV.4.8. Cell Proliferation Assay

The cell proliferation was assessed by MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), Abcam, Wisconsin, U.S.A., #ab197010) assay. The cells were seeded at a density of 3×10^3 cells/well, in 96-well plates with 200 μ L of DMEM 10% FBS, 1% PSG medium, for 4 hours of incubation to allow attachment. After 0, 22, 46, 70 and 118 hours of incubation, 20 μ L MTS was added to each sample and the whole plate was then incubated at 37°C for 45min. The absorbance was measured at 490nm using a microplate reader (BMG Labtech, CLARIOstar Plus).

IV.4.9. Immunofluorescence assay

Cells were cultured in an eight-well-chamber glass slide (Fisher scientific cat #354108). Mutant Poc5 and WT cells were serum-starved for 24h before processing to immunofluorescence. Cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0.1% triton in PBS (PBST) then incubated with anti-ARL13B (rabbit polyclonal antibody, Proteintech cat #17711-1-AP or mouse polyclonal antibody, Proteintech cat #66739-1-Ig 1/500) antibody diluted in 2% BSA/PBST. They were incubated for 1 h at room temperature (RT). Cells were then washed three times with PBST and incubated with secondary antibodies Alexa fluor 488 anti-rabbit (Life technologies cat #A11008 1/500) or Alexa fluor 555 anti-mouse (Life technologies cat #A21422 1/500) for 1 h at RT. Mounting was done using prolonged gold anti-fade reagent with DAPI (Life technologies cat #P36931). Images were taken using Leica microscopy to determine the percentage of ciliated cells.

IV.4.10. Ciliary Organs Extraction and Histology

Brain, eyes, lungs, hearts, kidneys, and liver were extracted from 1-month-old mice, fixed overnight in 4% PFA and embedded in paraffin wax prior to sectioning. Serial tissue sections (5 μ m) of paraffin-embedded specimens were collected, mounted on microscope slides, deparaffinized in xylene, rehydrated in a graded series of ethanol then stained with hematoxylin eosin (H&E) following the standard protocol as we previously described^{12,13}.

IV.4.11. Statistical Analysis

All data values are given as means \pm SD. One-way ANOVAs and Fisher LSD tests were used to determine significance of normally distributed and equal variance data. Kruskal–Wallis ANOVA and Dunn's method of comparison were used for non-normal distributions.

IV.5. Results

IV.5.1. Mutant Mice Line

Three mutant mouse lines were generated using the CRISPR-Cas9 technology, two were simple knock-in mutant and one combining the two previous mutations. The human *POC5* gene and the mouse *Poc5* gene share 78,67% of homology, the mutations p.(A430T) and p.(A413V) that were inserted correspond to the mice version of the human SNPs p.(A446T) and p.(A429V); respectively (*Figure IV.1*). The third line was obtained by crossing the two simple mutant lines together to have both mutation p.(A430T) and p.(A413V) SNPs (*Figure IV.1*). The control WT mice have the same genetic background, C57BL/6N.

IV.5.2. The mutant mouse line showed modified bone phenotype compared to control mice.

Microcomputed tomography (microCT) was performed on 7 to 11-month-old mice from C57BL/6N^{-poc5emA430T}, C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T} and C57BL/6N lines (*Figure IV.2A*) and the reconstructed 3D spinal trajectory were aligned (*Figure IV.2C*) and the measurement of the radius of the curvature in the thoracic region (*Figure IV.2B*) revealed a kyphosis for the C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T} mice (*Figure IV.2D*) compared to the WT line. No significant change was observed for the C57BL/6N^{-poc5emA430T} line. The spinal growth was then assessed during puberty for the three mutant mouse lines compared to control mice. To do so, microCT were performed on adolescent mice at 25 days-old (early), 35 days-old (mid) and 45 days-old (late) and 3D spinal view was reconstructed. This analysis did not reveal major abnormality of the mutant mice spine at this age compared to the WT mice spine (*Supplementary Figure IV.1*).

It is well known that AIS patient showed low bone mineral density, the trabecular and cortical bone mineral density of the femurs from the 12 weeks-old mutant mouse line compared to controls were therefore assessed and no significant change was observed compared to WT mice (*Supplementary Figure IV.2*).

IV.5.3. *Poc5* Mutant Spinal Osteoblasts Showed an Impaired Osteoblastic Activity, Proliferation and Ciliogenesis.

AIS is known as a skeletal disorder that is why we extracted osteoblasts from mice spine for functional characterisation. One-month-old mice from the three mutant mouse lines and WT mice were euthanized, and osteoblasts were extracted from the spine to assess the functionality of this cell type. The three mutant mouse lines showed a significant diminution of the relative alkaline phosphatase (ALP) activity compared to the WT osteoblasts reflecting a diminution of the osteoblastic activity (n=10, *=P<0.05, **=P<0.01, ***=P<0.001, student test) (*Figure IV.3A*). Moreover, the alizarin red assay was performed and revealed a decreased calcification for the three mutant mouse lines *C57BL/6N^{-poc5emA430T}*, *C57BL/6N^{-poc5emA413V}*, *C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T}* osteoblasts compared to controls (n=10, ***=P<0.001, ns : non-significant, student test) (*Figure IV.3B*).

The MTS assay performed on osteoblasts extracted from the spine revealed a significant diminution of the proliferation rate of the osteoblasts extracted from the *C57BL/6N^{-poc5emA430T}* mutant mice (n=4, p<0,05, student test) compared to WT (*Figure IV.3C*).

Previous studies from our laboratory identified impaired ciliogenesis in AIS cells^{15, 18}, so we then assessed the percentage of ciliated cells in mutant and WT mouse osteoblasts. A significant decrease of 6% and 22% of ciliated cells was observed compared to control for the mutant *C57BL/6N^{-poc5emA413V}*, and the double mutant *C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T}* respectively (*Figure IV.3D*). This diminution of ciliated cells for the *Poc5* mutant mice revealed an impaired ciliogenesis that is even worse for the *Poc5* double mutant line.

IV.5.3. Histological Analysis of the Ciliary Organs isolated from the *Poc5* Mutant Mice Lines Showed Tissue Alteration Compared to the WT Mice.

The ciliary gene alterations cause defects in ciliary proteins and induce a group of diseases known as ciliopathies. These pleiotropic disorders affect the structure or the function of different organs including the brain (Cognition, behaviour), the eyes (retinopathy), the heart (Left-right asymmetry), the kidneys (cysts), the lungs (clearance defects), the skeleton (scoliosis) and the liver (cysts, fibrosis)¹⁹. Because the *Poc5* gene is essential for the proper ciliogenesis¹⁵, the effects of the different *Poc5* variants on the ciliary tissue organisation were next assessed by hematoxylin eosin staining. For this purpose, the ciliary organs: brain, liver, kidneys, eyes, heart, and lungs were extracted from the one-month-old mice and the tissue sections were stained with hematoxylin eosin and analysed (*Figure IV.4, IV.5*).

The analysis of the brain, the kidneys, the heart, and the lungs of the mutant mice did not reveal any tissue structure abnormality, cystic phenotype nor fibrosis compared to their wild-type littermates (*Figure IV.4A, IV.4B, IV.4C, IV.4D*). The analysis of the mutant mice retina revealed a photoreceptor layer abnormality, especially for the *C57BL/6N^{-poc5emA413V}* line. Indeed, the OSL (outer segment layer) and ISL (inner segment layer) appeared to be larger than the wild-type retina (*Figure IV.4E*) that must be quantified. No differences were observed between males and females for none of the 6 analysed organs. However, mutant *Poc5* mice liver showed a specific type of ballooning degeneration of hepatocytes, a hallmark of steatohepatitis (*Figure IV.5*).

IV.6. Discussion

This study reports the phenotypic characterization and changes at the tissues and cellular level of the three *Poc5* mutant lines. Spinal deformation, impaired ciliary tissues, hepatic steatosis, and impaired osteogenic differentiation and ciliogenesis of the osteoblasts from the three mutant mouse lines indicated a cilia-related disease caused by *Poc5* mutation. The identification of *POC5* gene as a candidate gene for AIS and subsequent identification of

additional ciliary associated genes that take part in the primary cilia formation, function or integrity²⁰, orientated the scientific community to the hypothesis that AIS could be a subtype of ciliopathy^{18, 20}. The primary cilia, an antenna-like projection of the cell, plays a role in the chemical and mechanotransduction of the environmental signals. The primary cilia is essential for many biological processes and when it is defective, it causes a group of rare complex syndromes called ciliopathies, and scoliosis is one of the symptoms. To decipher the link between the primary cilia and the physiopathogenesis of AIS, we created two lines of mutant mice that are carrying mutations mimicing two of the three human SNPs previously identified, c.G1336A (p.A446T) and c.C1286T (p.A429V)², and a third mutant line carrying both variants to enhance the effect of the defective *Poc5* protein.

The analysis of the spine of the *Poc5* mutant mouse lines revealed spinal deformities for the double mutant mouse line, C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T}. Indeed, these mutant mice significantly developed a kyphosis compared to control mice, and this deformity was observed for both females and males. Because AIS progress mainly during puberty in Human, spinal curvature was assessed during mouse adolescence period, the period of rapid growth, (25 to 55 days of age), and no significant curvature was observed suggesting that the kyphosis in the line C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T} occurs later than the mouse adolescence period. This is in contrast with the AIS onset. This could be explained by the fact that mice are quadrupeds, and hence they are not subject to the same dorsal shear stress and axial loading as bipeds. Without these mechanical stresses, the growth spurt occurring during the puberty in mice does not have the same impact on the spine as for Human. Additionally, the literature is reporting knock-out models in quadrupedal mice models that were developing scoliosis, for example *Col2a1CreERT2* mouse line²¹, *Agc1-CreERT2* mouse line²², *Gdf5/Gdf6* double mutant mouse line²³, *Fgfr3* mutant mouse line^{24, 25}, with a complete deletion of the protein production, but no knock-in model. Our study is the first one that reported knock-in mouse models to study AIS and these *Poc5* mutant proteins are probably not strong enough to be deleterious in quadrupedal conditions. To conclude in on the spinal deformity, additional analysis in bipedal

mutant mice should be done. The deformities must be quantified during the time, *in vivo*, to avoid the post-mortem postural changes occurring with the changes in muscle tone.

To complete the bone phenotype, femoral bone mineral density was then assessed for the three mutant mouse lines compared to WT mice. Indeed, it is well documented that AIS patients, especially girls, have low bone mineral density. Our experiments on 12 weeks-old mice revealed no significant difference between mutants and WT mice for both females and males. Additional analysis using older mice should be done to determine if the *Poc5* mutant mice acquire osteoporosis with age compared to control mice.

At the cellular level, the extraction of the osteoblasts from the mutant mice spine allowed us to demonstrate a calcification and osteoblastic activity impairment, coupled with a low proliferation rate compared to the cells extracted from the WT mice, in concordance to previous analysis in human cells¹⁵. Indeed, our laboratory recently showed that the *POC5*^{A429V} SNP resulted in a subcellular localisation impairment of the centriolar protein POC5 in transfected and patients cells, a loss of interacting protein partners leading to a primary cilia retraction and a default in the cell cycle progression compared to control cells¹⁵. Further analysis should be performed to assess the localisation of the *Poc5* mutant mouse protein compared to controls. We then analysed the ciliogenesis in mutant osteoblasts and control osteoblasts and we reported that mutant cells were significant less ciliated than controls reflecting an impaired ciliogenesis in *Poc5* mutant cells. These results are in accordance with previous analysis in AIS patient cells that were carrying *POC5* or *TLL11* SNPs^{15, 18}. The primary cilia length should be assessed to determine if *Poc5* mutant mouse line showed shorter osteoblast primary cilia compared to control mice. Indeed, previous work reported shorter primary cilia for AIS patient cells that were carrying *POC5*^{A429V} SNP¹⁵ and was confirmed in IS osteoblasts²⁶. In contrary, longer primary cilia for IS patient cells were also reported by Oliazadeh et al²⁰ after 72hours in ciliogenesis media. These results reflected the importance of the primary cilia, and an impaired ciliary length, longer or shorter, is deleterious for the cellular function and could cause the deformity of the spine.

Prior study from our laboratory highlighted a default in glutamylation, a post-translational modification of the tubulin that occurs in the axoneme of the primary cilia, as a possible cause of impaired primary cilia length regulation in AIS¹⁸. It would be interesting to assess the glutamylation of the primary cilia from the spinal osteoblasts of the three mutant mouse lines to confirm the implication of this mechanism in the AIS physiopathogenesis.

Moreover, Oliazadeh et al²⁶ have documented an impaired cilia length dynamic or ciliogenesis in response to fluid flow and a failure to position or elongate in function of the applied flow for the AIS osteoblasts compared to control cells. An inhibition of the cell migration by fluid flow was also reported in AIS osteoblasts contrary to control cells²⁶. Altogether, these observations support that AIS cells carry out cytoskeletal abnormalities related to primary cilia impairment. Interestingly, primary cilia have been found to be related to the microtubule (MT) network disorganization caused by the reduction of MT anchorage to the basal body resulting in bone-mass reduction²⁷ under microgravity stress. Additionally, fluid flow increases the secretion of VEGF-A and PGE2 in control osteoblasts as they are involved in bone remodeling²⁸,²⁹, but this effect was lost in AIS cells²⁶ reflecting an impaired mechanotransduction.

Default in primary cilia length dynamic, could be due to a post-translational protein modification such as the polyglutamylation, spoiling the capacity of the primary cilia to correctly detect the environmental stimuli. These modifications could also contribute to the loss of the cytoskeletal rearrangement, impaired cellular mechanotransduction, decreased cell migration and osteoblast differentiation leading to the low bone density and spinal deformity in AIS patients.

Primary cilia are known to be required for numerous cellular processes. Their defects (in the formation and/or function) affect various tissues in Humans and mice. Indeed, mouse models of ciliopathy reveal various hallmark feature i.e. deafness, digits abnormality, retinopathy, skeletal impairments, kidney cysts, liver cysts or fibrosis, brain anomalies, situs inversus and pulmonary default¹⁹. Hence, we investigated the ciliary organs brain, lungs, kidneys, heart, eyes and liver using histological analysis. Interestingly, no major structural abnormality for the

brain, lungs, kidneys, and heart from the mutant *Poc5* mouse lines compared to control mice were reported. However, steatohepatitis was observed in mutant mice and this default has been associated with ciliopathy in Human^{30, 31}. Despite this observation, the mutant mouse lines were not obese and received the same diet as their wild-type littermates. Previous studies demonstrated that abnormal intracellular Ca^{2+} developed lipid accumulation, insulin resistance and liver fibrosis^{32, 33}. Interestingly, primary cilia are hosting polycystins that are Ca^{2+} channels³⁴, meaning that in our mutant mouse lines, the impaired ciliogenesis may disrupt the Ca^{2+} signalisation leading impaired hepatic lipid homeostasis.

In this study, we were enabled to observe any retinal defect despite the previous findings that related *POC5* to retinitis pigmentosa⁴. Our results are not surprising as we assessed the retinal structure of 1-month-old mice and retinal degeneration is mostly observed from 6 to 8 months of age and the onset in humans depend on the genetic type, but more than three-quarters will be symptomatic by the time they are 30 years old³⁵. Additional analysis of the retina histology and retinal function (visual motor response) must be done at later stage of the mice development to conclude about any retinal phenotype. Also, these different ciliary organs must be assessed in later stages to assess the development of the disease and by immunofluorescence to characterize the primary cilium, especially the length and the polyglutamylation level.

This study suggests that AIS is a subtype of ciliopathy. In Humans, the defaults caused by the alteration of *POC5* protein could be compensated in ciliary organs including the spine, during most of the life. But for the spine, this mechanism seems not enough during the growth spurt. Indeed, the growth velocity, especially for the spine, is the highest (from 8cm^y-1)³⁶ during this period of life and this is highly stressful for the organism. The compensatory mechanism could be overwhelmed leading to the deformation of the spine. AIS patients could carry other defaults in different organs that do not lead to a condition so that are not yet known. However, the link between vision and AIS was already shown in Humans³⁷.

To conclude, the genetic models of *Poc5* mutant mice revealed a ciliary-associated phenotype. Based on previous findings reporting *POC5* variants in AIS in humans and based on this study, AIS could be a subtype of ciliopathy or a cilia-associated disorder. Other organs could be impaired in AIS but without drastic consequences. Understanding the subtle tissue changes and biological causes of AIS is required to improve the knowledges of this complex disease and will help with devising new therapeutical strategies and prevention.

IV.7 Acknowledgments

Special thanks to the Clinical Research Orthopaedic Unit (URCO) team, who contributed to the recruitment of the patients, to the Transmedtech Institut and to Canada First Research Excellence Fund.

IV.8. References

1. Azimzadeh J, Hergert P, Delouvee A, Euteneuer U, Formstecher E, Khodjakov A, et al. hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J Cell Biol.* 2009;185(1):101-14.
2. Patten SA, Margaritte-Jeannin P, Bernard JC, Alix E, Labalme A, Besson A, et al. Functional variants of POC5 identified in patients with idiopathic scoliosis. *J Clin Invest.* 2015;125(3):1124-8.
3. Xu L, Sheng F, Xia C, Li Y, Feng Z, Qiu Y, et al. Common Variant of POC5 Is Associated With the Susceptibility of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2018;43(12):E683-E8.
4. Weisz Hubshman M, Broekman S, van Wijk E, Cremers F, Abu-Diab A, Khateb S, et al. Whole-exome sequencing reveals POC5 as a novel gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2018;27(4):614-24.
5. Mathieu H, Spataru A, Aragon-Martin J, Child A, Barchi S, Fortin C, et al. Prevalence of POC5 Coding Variants in French-Canadian and British AIS Cohort. *Genes.* 2021;12:1032.
6. Tang NLS, Dobbs MB, Gurnett CA, Qiu Y, Lam TP, Cheng JCY, et al. A Decade in Review after Idiopathic Scoliosis Was First Called a Complex Trait-A Tribute to the Late Dr. Yves Cotrel for His Support in Studies of Etiology of Scoliosis. *Genes (Basel).* 2021;12(7).

7. Zaydman AM, Strokova EL, Pahomova NY, Gusev AF, Mikhaylovskiy MV, Shevchenko AI, et al. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. *Med Hypotheses*. 2021;151:110585.
8. Peng Y, Wang SR, Qiu GX, Zhang JG, Zhuang QY. Research progress on the etiology and pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(4):483-93.
9. Sluder G, Rieder CL. Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles. *J Cell Biol*. 1985;100(3):887-96.
10. Bobinnec Y, Khodjakov A, Mir LM, Rieder CL, Edde B, Bornens M. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol*. 1998;143(6):1575-89.
11. Keller LC, Romijn EP, Zamora I, Yates JR, 3rd, Marshall WF. Proteomic analysis of isolated chlamydomonas centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr Biol*. 2005;15(12):1090-8.
12. Heydeck W, Bayless BA, Stemm-Wolf AJ, O'Toole ET, Fabritius AS, Ozzello C, et al. Tetrahymena Poc5 is a transient basal body component that is important for basal body maturation. *J Cell Sci*. 2020;133(11).
13. Dantas TJ, Daly OM, Conroy PC, Tomas M, Wang Y, Lalor P, et al. Calcium-binding capacity of centrin2 is required for linear POC5 assembly but not for nucleotide excision repair. *PLoS One*. 2013;8(7):e68487.
14. Le Guennec M, Klena N, Gambarotto D, Laporte MH, Tassin AM, van den Hoek H, et al. A helical inner scaffold provides a structural basis for centriole cohesion. *Sci Adv*. 2020;6(7):eaaz4137.
15. Hassan A, Parent S, Mathieu H, Zaouter C, Molidperee S, Bagu ET, et al. Adolescent idiopathic scoliosis associated POC5 mutation impairs cell cycle, cilia length and centrosome protein interactions. *PLoS One*. 2019;14(3):e0213269.
16. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W242-W5.
17. Patten SA, Jacobs-McDaniels NL, Zaouter C, Drapeau P, Albertson RC, Moldovan F. Role of Chd7 in zebrafish: a model for CHARGE syndrome. *PLoS One*. 2012;7(2):e31650.
18. Mathieu H, Patten SA, Aragon-Martin JA, Ocaka L, Simpson M, Child A, et al. Genetic variant of TTLL11 gene and subsequent ciliary defects are associated with idiopathic scoliosis in a 5-generation UK family. *Scientific Reports*. 2021;11(1):11026.

19. Norris DP, Grimes DT. Mouse models of ciliopathies: the state of the art. *Dis Model Mech.* 2012;5(3):299-312.
20. Oliazadeh N, Gorman KF, Eveleigh R, Bourque G, Moreau A. Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients. *Sci Rep.* 2017;7:44260.
21. Kim HK, Aruwajoye O, Sucato D, Richards BS, Feng GS, Chen D, et al. Induction of SHP2 deficiency in chondrocytes causes severe scoliosis and kyphosis in mice. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013;38(21):E1307-12.
22. Henry SP, Liang S, Akdemir KC, de Crombrughe B. The postnatal role of Sox9 in cartilage. *J Bone Miner Res.* 2012;27(12):2511-25.
23. Settle SH, Jr., Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol.* 2003;254(1):116-30.
24. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell.* 1996;84(6):911-21.
25. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 1996;12(4):390-7.
26. Oliazadeh N, Gorman KF, Elbakry M, Moreau A. Altered mechanotransduction in adolescent idiopathic scoliosis osteoblasts: an exploratory in vitro study. *Sci Rep.* 2022;12(1):1846.
27. Shi W, Zhang Y, Chen K, He J, Feng X, Wei W, et al. Primary cilia act as microgravity sensors by depolymerizing microtubules to inhibit osteoblastic differentiation and mineralization. *Bone.* 2020;136:115346.
28. Yan YX, Gong YW, Guo Y, Lv Q, Guo C, Zhuang Y, et al. Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS One.* 2012;7(4):e35709.
29. Reich KM, Frangos JA. Protein kinase C mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 1993;52(1):62-6.
30. Ali ES, Girard D, Petrovsky N. Impaired Ca(2+) signaling due to hepatic steatosis mediates hepatic insulin resistance in Alstrom syndrome mice that is reversed by GLP-1 analog treatment. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021;321(1):C187-C98.

31. Horiuchi K, Kogiso T, Sagawa T, Ito T, Taniai M, Miura K, et al. Bardet-Biedl Syndrome Caused by Skipping of SCLT1 Complicated by Microvesicular Steatohepatitis. *Intern Med.* 2020;59(21):2719-24.
32. Wilson CH, Ali ES, Scrimgeour N, Martin AM, Hua J, Tallis GA, et al. Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca(2)(+) entry and reduces ER Ca(2)(+) through a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem J.* 2015;466(2):379-90.
33. Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab.* 2012;15(5):623-34.
34. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol.* 2001;184(1):71-9.
35. O'Neal TB, Luther EE. Retinitis Pigmentosa. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
36. Hosni S, Burnside G, Watkinson S, Harrison JE. Comparison of statural height growth velocity at different cervical vertebral maturation stages. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2018;154(4):545-53.
37. Kurian M, Megevand C, De Haller R, Merlini L, Boex C, Truffert A, et al. Early-onset or rapidly progressive scoliosis in children: Check the eyes! *European Journal of Paediatric Neurology.* 2013;17(6):671-5.

IV.9. Figures legends

Figure IV.1. Alignment of POC5 Protein Sequences in Various Species.

Sequence identity is highlighted in green. Arrowheads indicate mutations which co-segregate with IS and AIS. Two of the three mutations (A429V and A446T) were reproducible in mice, respectively A413V and A430T.

Figure IV.2. Mutant C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T} Mice Are Affected by Kyphosis.

A. The spines of mutant and control mice (7 to 11 months old) were assessed by microCT scans, and the three-dimensional images were then analysed using an in-house code (PyMicroCT) to annotate the intervertebral space. B. The radius of the curvature in the thoracic region was measured. C. Lateral and dorsal views of the alignment of the spinal 3D reconstructed trajectory revealed a kyphosis for the C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T} mutant mouse line compared to controls. (The head is right side, and the tail is left side). D. Graphical representation of the radius of the curvature that were observed for female and male mutant and control mice reported a significantly reduced radius for the double mutant line C57BL/6N^{-poc5emA413V-A430T}.

Figure IV.3. *Poc5* Mutant Spinal Osteoblasts Showed an Impaired Osteoblastic Activity, Proliferation and Ciliogenesis.

A. Alkaline phosphatase concentration of mutant and WT osteoblasts after 12 days in mineralisation medium. Absorbances were measured in triplicate at 415nm. The results are represented as mean \pm SD, the difference with controls was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, $p < 0.001$ ($n = 10$). B. The pictures are representing the cells stained with Alizarin red after 28 days in mineralisation medium. Magnification $\times 22$. Scale bar = 0,5mm. Alizarin red concentrations obtained by measuring the absorbance in triplicate at 405nm. The results are represented as mean \pm SD, the difference with controls was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, $p > 0.05$ ($n = 12$). C. Osteoblasts proliferation rate measured by MTS assay at 0 (3000 cells were seeded), 22, 46, 70 and 118hours. Absorbances were obtained at 490nm in triplicate. The results are represented as mean \pm SD, the difference with controls was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, $ns = P > 0.05$, $* = P < 0.05$, $** = P < 0.01$, $*** = P < 0.001$ ($n = 4$). D. Graphical representation of the percentage of *Poc5* mutant ciliated

osteoblasts compared to control cells reported a significant decrease of ciliated mutant cells. The results are represented as mean \pm SD, the difference with controls was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, ns= $P>0.05$, *= $P<0.05$, **= $P<0.01$, ***= $P<0.001$); n=3700.

Figure IV.4. Hematoxylin and Eosin (H&E)-Stained Ciliary Organs of *Poc5* Mutant Mice and WT One-Month-Old Mice.

Heart section histology revealed no significant structural modification from *Poc5* mutant mice compared to the WT. n=30. Scale bar 100 μ m; magnification: left panels x10, right panels x20. *IVS: interventricular septum; LA: left atrium; LV: left ventricle; PM: papillary muscles; RV: right ventricle.* B. Lungs sections histology revealed no significant structural modification from *Poc5* mutant mice compared to the WT. n=30. Scale bar 100 μ m, magnification: left panels x10, right panels x20. *AD: alveolar duct; TB: Terminal bronchiole; B: bronchiole; PV: pulmonary vein; *: alveoli.* C. Kidney section histology revealed no significant structural modification from *Poc5* mutant mice compared to the WT. n=30. Scale bar 100 μ m; magnification: left panels x10, right panels x20. *C: Cortex; OM: Outer medulla; G: glomeruli; TCP: proximal convoluted tubule.* D. Brain sections histology revealed no significant structural modification from *Poc5* mutant mice compared to the WT. n=30. Scale bar 20 μ m; magnification: x4. *Hb: habenular nucleus; THA: thalamus; COR: cerebral cortex; RS: retrosplenial cortex; HIP: hippocampus; cc: corpus callosum.* E. Eyes sections histology revealed modified OLS and ISL layers compared to controls. n=30. Scale bar 20 μ m; magnification: x4. *RPE: retinal pigmented epithelium; OSL: outer segment layer; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer; GCL: Ganglion cell layer.*

Figure IV.5. Hematoxylin and Eosin (H&E)-Stained Liver of *Poc5* Mutant Mice and WT One-Month-Old Mice.

Liver section histology revealed hepatocytes from *Poc5* mutant mice containing small or large lipid droplets accumulation compared to the WT. n=30. Scale bar 100 μ m; magnification: lefts panels x10, middle panels x20, right panels x40. *P: portal region; V: venule; A: artérioles; B: bile ductule; L: lymphatics.*

IV.10. Figures

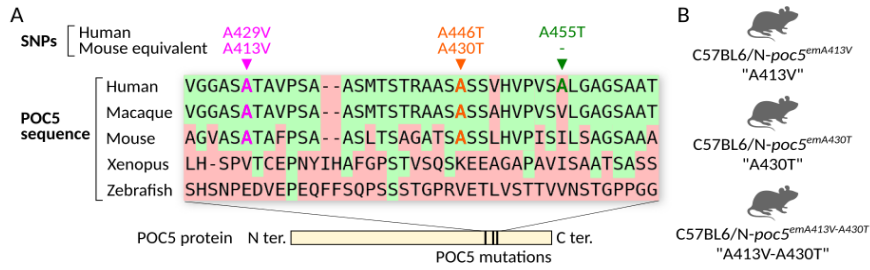


Figure IV.1

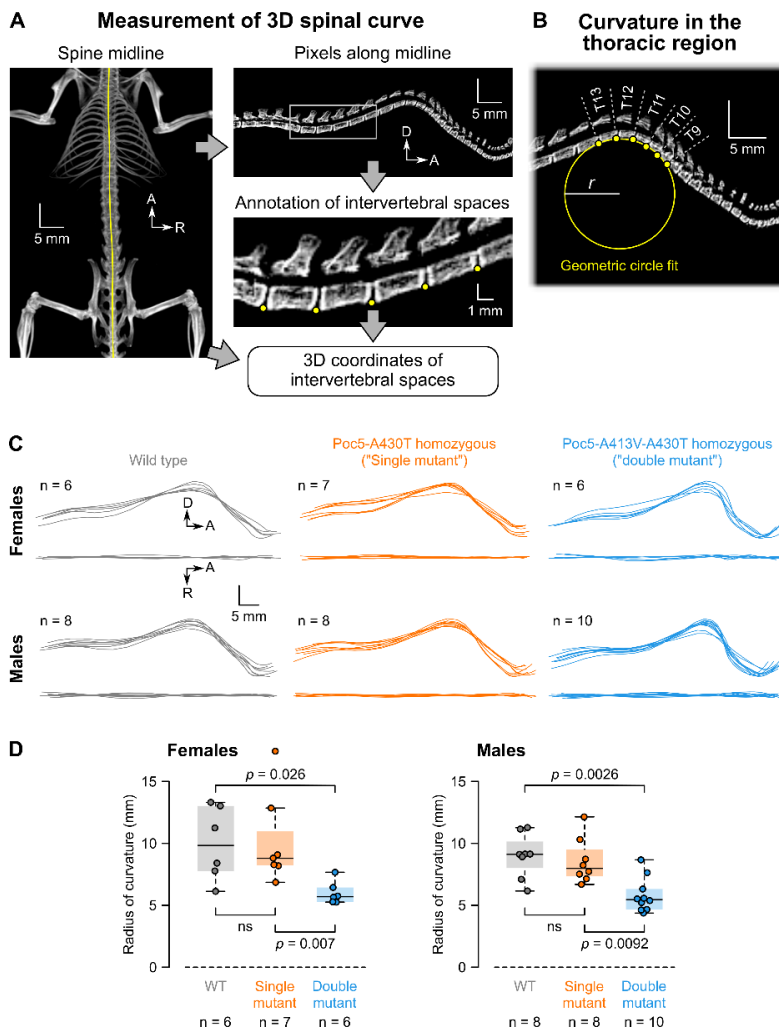


Figure IV.2

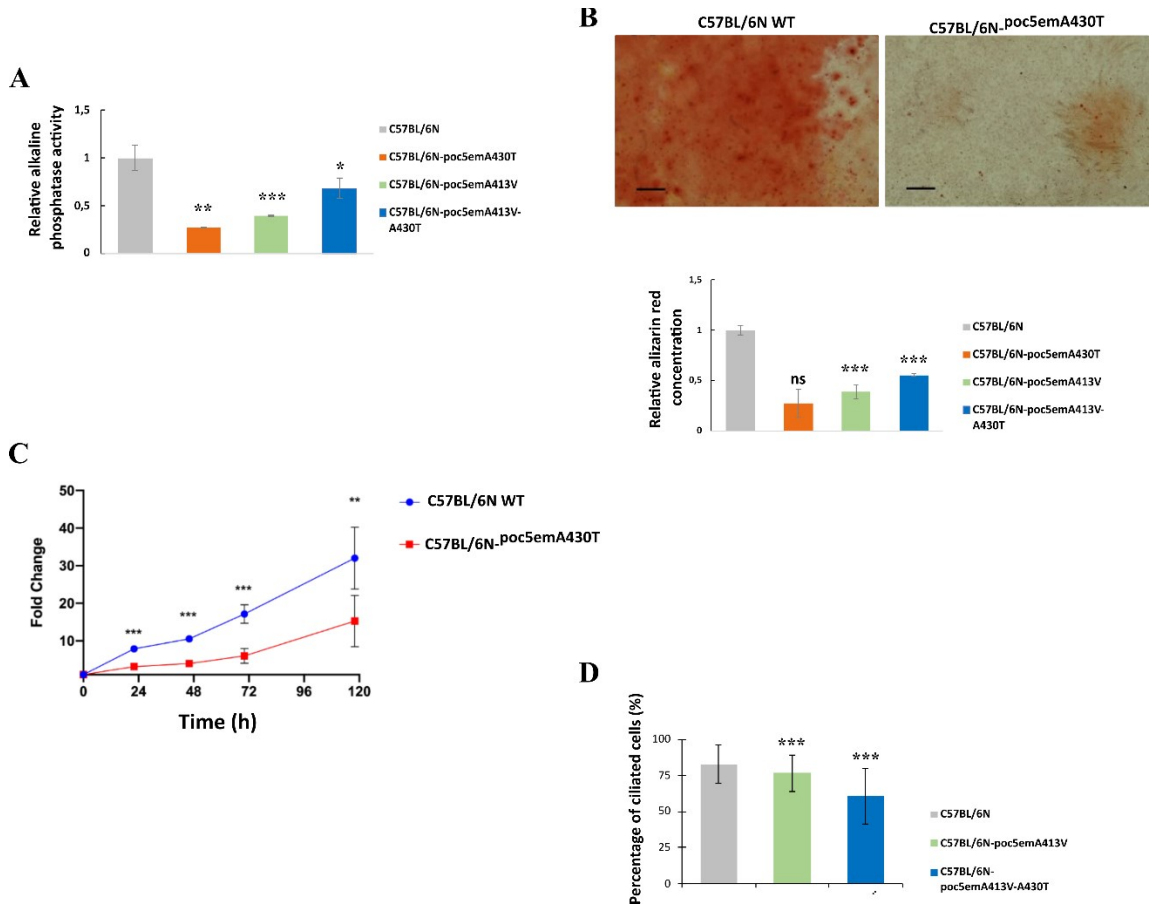


Figure IV.3

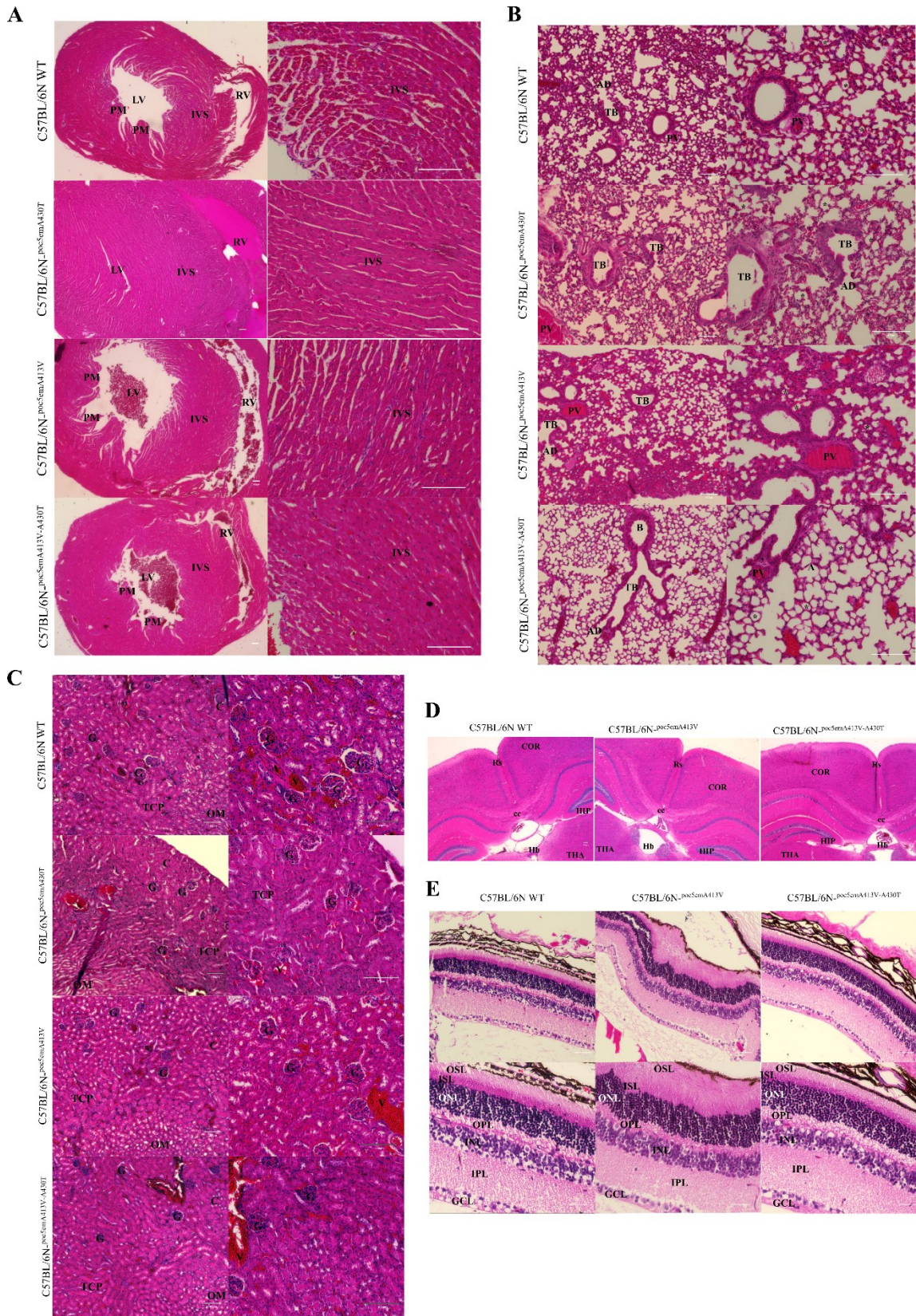


Figure IV.4

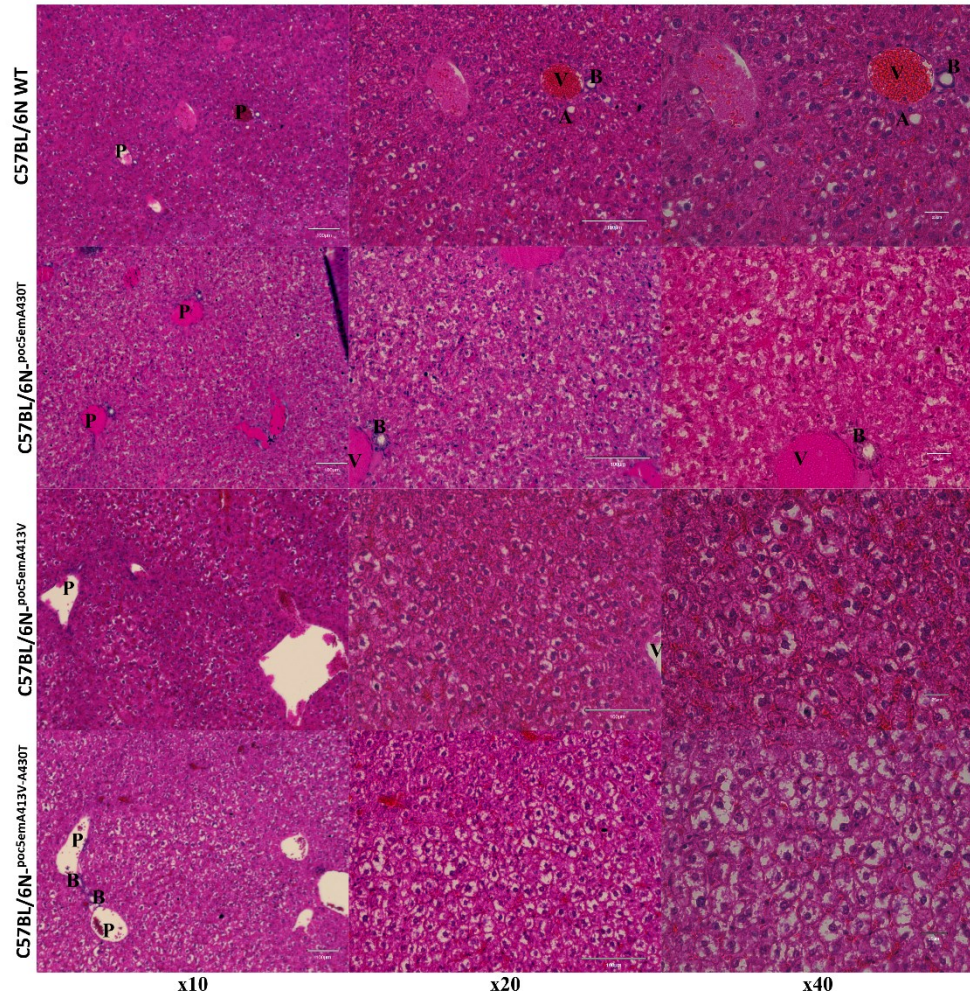
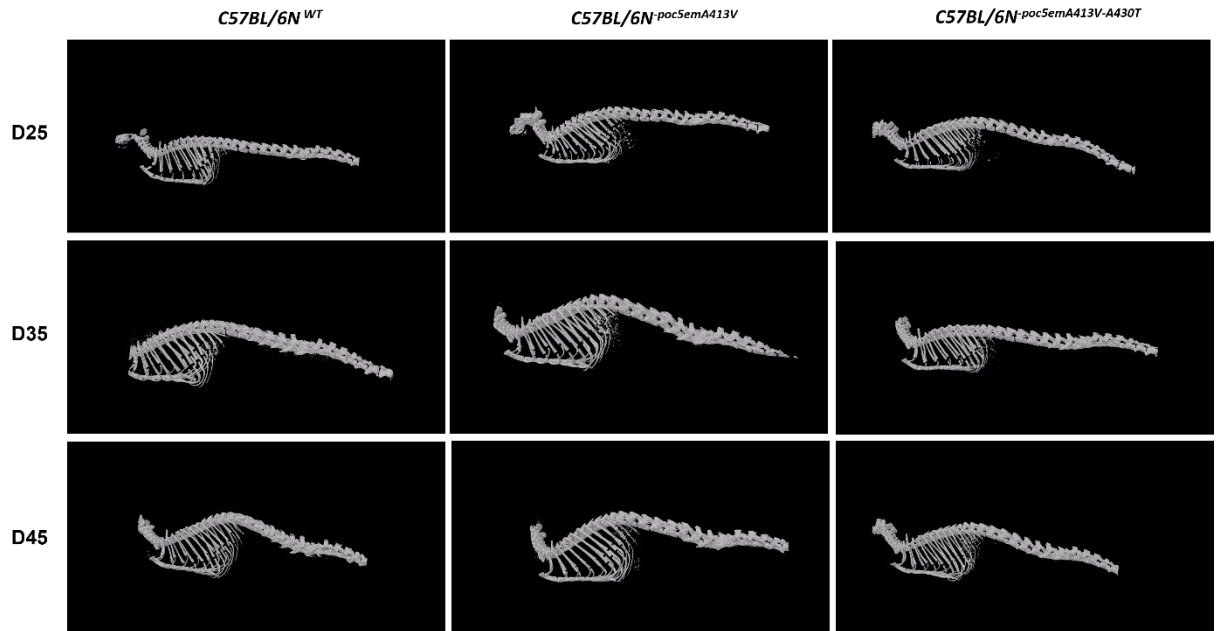


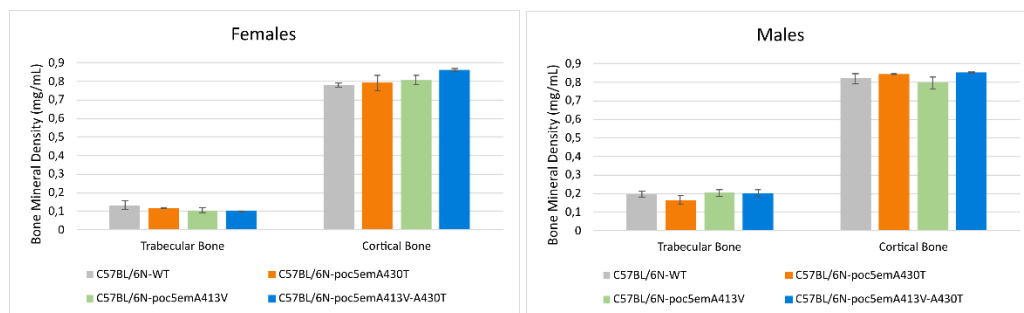
Figure IV.5

IV.11. Supplementary data



Supplementary Figure IV.1. MicroCT Lateral Images of Mutant *Poc5* Mice, C57BL/6N^{poc5emA413V} and C57BL/6N^{poc5emA413V-A430T} did not Develop 3D Spine Curvature During the Adolescence Period Compared to C57BL/6N^{WT} Mice.

3D views of mice spine were obtained by microCT acquisition at 25days old, 35 days old and 45 days old.



Supplementary Figure IV.2. Bone Mineral Density of Mutant *Poc5* Mice, C57BL/6N^{poc5emA413V} and C57BL/6N^{poc5emA413V-A430T} did not Reveal any Significant Changes Compared to Control Mice.

Chapitre V. Troisième article scientifique - Genetic Variant of TLL11 Gene and Subsequent Ciliary Defects Are Associated With Idiopathic Scoliosis in a 5-Generation UK Family

V.1. Description de l'article et contribution des auteurs

Enfin, le troisième article publié dans la revue *Scientific Reports*, répond au dernier objectif de cette thèse qui était de démontrer la pathogénicité du gène *TLL11* muté dans des cellules issues de patients atteints de SIA et chez le poisson zèbre. En effet, un variant rare dans le gène *TLL11* a été identifié dans une grande famille britannique atteinte de SI, le variant c.1569_1570insTT. Le criblage de ce gène dans notre cohorte de patients atteints de SIA a permis d'identifier deux mutations rares supplémentaires chez deux autres familles. Au niveau cellulaire, nous avons pu observer des défauts dans l'expression de l'ARNm des transcrits de ce gène, un défaut dans la localisation de la protéine mutée par rapport à la protéine contrôle. Au niveau fonctionnel, nous avons pu observer que les cellules mutantes présentaient beaucoup moins de cils primaires, et que lorsqu'il était présent, celui-ci était plus petit et moins polyglutamylé. Nous avons ensuite analysé l'effet de mutation au sein de ce gène ciliaire *TLL11* au niveau de l'animal entier, le poisson zèbre. Nous avons pu observer chez un modèle de knock-down obtenu par injection d'un morpholino et un modèle mutant créé par la technique de CRISPR-cas9, une déformation de l'axe du corps. Chez les poissons mutants adultes, nous avons pu observer une déformation de la colonne vertébrale dans les trois dimensions similaires à celle observée chez les individus atteints de SIA. De plus, l'analyse des rétines des poissons adultes a mis en évidence un défaut dans la couche des cônes.

Ce projet a été réalisé sous la direction du Dre Florina Moldovan en collaboration avec le Dre Anne Child (UK). J'ai réalisé l'analyse du séquençage ciblé du gène *TLL11*, toutes les analyses cellulaires présentées dans cet article, ainsi que les études faites sur le poisson zèbre mutant.

L'identification du variant c.1569_1570insTT a été réalisée par les Drs Louise Ocaka, Michael Simpson, José Antonio Aragon Martin. La création du poisson zèbre morpholino et sa caractérisation a été réalisé par le Dr Shunmoogum A. Patten tout comme la création du poisson zèbre mutant. Tous les auteurs ont validé le manuscrit avant sa soumission.

Genetic Variant of TLL11 Gene and Subsequent Ciliary Defects Are Associated With Idiopathic Scoliosis in a 5-Generation UK Family

Hélène Mathieu¹, Shunmoogum A. Patten², Jose Antonio Aragon-Martin⁴, Louise Ocaka³, Michael Simpson⁶, Anne Child^{5*} & Florina Moldovan^{1,7*}

1 CHU Sainte-Justine Research Center, 3175 Côte Sainte-Catherine, 2.17.026, Montreal, QC H3T 1C5, Canada.

2 INRS-Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologie, Laval, QC H7V1B7, Canada.

3 Centre for Translational Omics–GOSgene, Department of Genetics and Genomic Medicine, UCL GOSH Institute of Child Health, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, UK.

4 NHLI, Imperial College, Guy Scadding Building, London SW3 6LY, UK.

5 Marfan Trust, NHLI, Imperial College, Guy Scadding Building, London SW3 6LY, UK.

6 Genetics and Molecular Medicine, King’s College London, SE1 1UL London, UK.

7 Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

Scientific Reports 11, Article number: 11026 (2021)

Published: 26 May 2021

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90155-0>

V.2. Abstract

Idiopathic scoliosis (IS) is a complex 3D deformation of the spine with a strong genetic component, most commonly found in adolescent girls. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) affects around 3% of the general population. In a 5-generation UK family, linkage analysis identified the locus *9q31.2-q34.2* as a candidate region for AIS; however, the causative gene remained unidentified. Here, using exome sequencing we identified a rare insertion c.1569_1570insTT in the tubulin tyrosine ligase like gene, member 11 (*TLL11*) within that locus, as the IS causative gene in this British family. Two other *TLL11* mutations were also identified in two additional AIS cases in the same cohort. Analyses of primary cells of individuals carrying the c.1569_1570insTT (NM_194252) mutation reveal a defect at the primary cilia level, which is less present, smaller and less polyglutamylated compared to control. Further, in a zebrafish, the knock down of *tll11*, and the mutated *ttll11* confirmed its role in spine development and ciliary function in the fish retina. These findings provide evidence that mutations in *TLL11*, a ciliary gene, contribute to the pathogenesis of IS.

V.3. Introduction

Idiopathic scoliosis is a form of vertebral column deformity, defined as a combination of a deviation of the spine in the sagittal and coronal plane with a vertebral rotation. It is characterised by a Cobb angle of $\geq 10^\circ$ curvature¹ with rotation of the spine, both of which can be seen on an upright spinal radiograph². A sub-type of scoliosis that mostly occurs in the adolescent years (between 8 and 18) during puberty, specifically during the skeletal growth spurt period, is called Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS). This sub-type has an overall prevalence of 0.47–5.2%, according to literature³. Affecting 3% of the population⁴, AIS is the most common spinal deformity and has been shown to affect females more than males with a ratio ranging from 1.5:1 to 3:1, increasing with Cobb angle measurements, from 1.4:1 in curves between 10° to 20° and up to 7.2:1 in curves $> 40^\circ$ ³.

AIS is a multifactorial disorder and it is widely recognised that there is a genetic predisposition^{5,6}. The mode of inheritance is still unclear, but several modes have been described^{2,7}: autosomal dominant inheritance with partial penetrance⁸, X-linked inheritance⁹, sex-influenced autosomal dominant inheritance with a female:male ratio of 8:1¹⁰, and a complex trait or multifactorial mode of inheritance¹¹. Indeed, 40% of AIS patients have a family history^{12,13}, and there is a strong concordance between monozygotic twins compared to dizygotic twins¹⁴.

AIS is characterised by an important genetic heterogeneity⁴. Genetic analyses have identified several candidate loci predisposing to AIS. Significant evidence of linkage to various regions on chromosomes 6, 9, 16 and 17¹⁵ and the previously described locus on chromosome *19p13*¹⁶ has been independently confirmed. More recently, refinement of a major locus for AIS on chromosome *9q31.2-q34.2* and a novel locus on chromosome *17q25.3-qtel* were described^{1,17}. All these studies reveal genetic heterogeneity and suggest polygenic aetiology of AIS².

Due to genetic heterogeneity and phenotypic complexity, the aetiology of AIS remains unclear. Interestingly, several studies suggested the contribution of a specific organelle, the cilium^{1,18-21}, in the pathogenesis of AIS. Human cilia are divided into two groups: motile and non-motile cilia (also called primary cilia), and their dysfunction leads to motor or sensory ciliopathies respectively²². It is well known that ciliopathies are associated with a high phenotypical heterogeneity including skeletal deformity (scoliosis)²³. Primary cilia are chemical and mechanical sensors of pericellular environment thanks to different pathways like Wnt signaling–planar cell polarity pathway, signaling at focal adhesions and at adherent junctions, hedgehog signaling, notch signaling, and the JAK–STAT signaling²⁴. Primary cilia have, among others, a role in mechanotransduction of fluid flow maintaining bone homeostasis especially in growth plate^{25,26} and in left-right patterning during embryogenesis²⁷ which is impaired in AIS patients. Moreover, the identification of *POC5* [MIM: 617880], a ciliary gene, as an IS causing gene¹, supports this hypothesis.

In this study, we identified a new candidate gene for IS. The susceptibility locus *9q31.2-q34.2* was first refined in a large UK family affected by IS presenting mainly in the adolescent period, and a mutation in the *TLL11* gene (Tubulin Tyrosine Ligase Like, member 11) [RefSeq: NM_001139442] was identified in a proband diagnosed with AIS. This gene has an important role in primary cilia integrity, and we showed that mutated *TLL11* lead to impaired ciliary glutamylation that resulted in shorter primary cilia *in vitro* using AIS patient's fibroblasts. Moreover, we observed spinal deformity *in vivo*, using CRISPR-Cas9 zebrafish model, in both larvae and adult animals.

V.4. Material and Methods

V.4.1. Patients

A five-generation British family (SC32), with eighteen known affected members (clinical data published in², [supplemental Table IV.3](#)), was recruited by the orthopaedic surgeon at St George's Hospital, London, UK. The proband SC32.1 was diagnosed as having adolescent idiopathic scoliosis (AIS). Among the family members, 7 males and 11 females ([Figure V.1A](#)) were affected. In total, there are nine affected members living. All are affected by a lateral spine curvature of at least 10° with vertebral rotation ([Figure V.1B](#)) and the age of diagnosis was variable. Any recognised syndrome including Marfan syndrome was ruled out. This family's mode of inheritance of disease is autosomal dominant with a strong pattern of adolescent idiopathic scoliosis. An additional collection of 96 patients composed by 63 unrelated British consecutive IS individuals and 10 families, and 18 French-Canadian families affected with autosomal dominant IS was established. The population control consisted of 3000 individuals not screened for IS.

V.4.2. Whole Exome Sequencing

Whole exome sequencing was performed by the Division of Genetics and Molecular Medicine (King's College London, UK) using DNA extracted from whole blood in two affected individuals from family SC32.1 and SC32.16. This strategy, where we assumed that rare or low-frequency

variants shared between the two exomes sequenced affected relatives in a family, were highly likely to be identical, optimised the information gained and reduce the cost compared to WES of all the affected individuals. A total of 3 µg of genomic DNA was sheared to a mean fragment size of 150 bp [Covaris] and the fragments used for Illumina paired-end DNA library preparation and enrichment for target sequences [SureSelect Human All Exon 50Mb kit, Agilent] Enriched DNA fragments were sequenced with 100 bp paired-end reads [HiSeq2000 platform, Illumina]. Sequencing reads were aligned to the reference human genome sequence hg19 using the Novoalign software⁸⁶. Duplicate and multiply mapping reads were excluded, and the depth and breadth of sequence coverage were calculated using custom scripts and the BedTools package⁸⁷. Single-nucleotide substitutions and small indels were identified with SAMtools⁸⁸, annotated with the ANNOVAR software⁸⁹. The identified SNPs were then compared to a 3000 controls cohort and EVS database⁹⁰.

V.4.3. Sanger Sequencing

DNA was sequenced using ABI BigDye terminator cycle sequencing chemistry 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Cycle sequencing of sequencing reactions was conducted on a PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). The sequencing reactions were purified using DyeEX 2.0 Spin Kit or DyeEx 96 plate (QIAGEN) according to manufacturer's instructions (QIAGEN). The purified sequencing reaction was dried on a thermal cycler at 80 °C. The resultant DNA pellet was then resuspended in 12 µl of deionised formamide and loaded into a 96 well non-skirted PCR plate (ABGENE). Prior to loading onto the ABI 3100 genetic analyser for sequencing (Applied Biosystems), samples were denatured at 95 °C for 5 min and cooled on ice.

V.4.4. *TLL11*-Exome Sequencing

A library was designed to perform the targeted sequencing of the *TLL11* gene using the Ion AmpliSeq (life technology). Sequencing of the 9 exons of *TLL11* of 63 unrelated British con

secutives AIS individuals and 10 families, and 18 French-Canadian families affected with autosomal dominant AIS was performed by Centre de Génomique Clinique Pédiatrique intégré CHU Sainte-Justine. The library was prepared using the Ion AmpliSeq DNA and RNA Library Preparation (MAN0006735, Rev. B.0, Ion Torrent, Life technologies) prior to the exome sequencing following the Ion PGM IC 200 Kit (MAN0007661, Rev. B.0) protocol. Sequencing reads were aligned to the reference human genome sequence [hg19] and the SNPs were identified by Ion Reporter [Ion Torrent]. Identified variants were annotated using ANNOVAR⁸⁹ which is implemented in VarAFT software⁹¹ which we used to select exonic and splicing variants with a MAF (minor allele frequency) $\leq 1\%$.

V.4.5. Validation With Sanger Sequencing

Identified variants were validated by Sanger sequencing. PCR amplification was performed using the TransStart FastPfu FLY DNA Polymerase (AP231, civic bioscience) following instructions of the manufacturer with primers described in [supplemental Table V.4](#). Sanger sequencing of amplicons was performed on an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) at McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montréal, Canada).

V.4.6. Cell Culture

Human Fibroblasts (DE0194 HB6574 and DE0193 HB2981) were provided by Dr. Anne H Child (Department of Cardiological Sciences, St George's Medical School, University of London, UK). Cells were maintained in HAM'S F10 medium (supplemented with 10% (v/v) FBS (Wisent, Montreal, Canada), 10 mM HEPES (Wisent, Montreal, Canada), Penicillin-streptomycin final concentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and L-glutamine final concentration 2 mM (life technologies, Burlington, ON). Cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ incubator.

V.4.7. Genomic DNA Extraction

Approximately 1×10^6 cells were collected and DNA was extracted with Purelink Genomic DNA mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. gDNA

was then submitted to PCR reaction for further sequencing analysis. PCR conditions were implemented according to the manufacturer's instruction with Phusion high-fidelity DNA polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA). For all primers temperatures and cycles conditions are: 2 min at 98 °C followed by 40 cycles of 98 °C for 10 s, 64 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. (See [Supplementary Table V.4](#) for primer sequences).

V.4.8. RNA Isolation and RT-qPCR

Total cellular RNA was isolated from DE0193, and DE0194 cells using TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared from 1 µg of total RNA in 20 µl reaction volume using the RT omniscrypt (Applied Biological Material) according to the manufacturer's instructions and diluted in 1/5. BrightGreen real-time PCR was performed with LightCycler system (Roche technology) and BrightGreen Express 2x qPCR MasterMix (Applied Biological Material) to amplify Human TTLL11 transcript 1 (NM_001139442) and transcript 2 (NM_194252). Amplification mixture (20 µl) contained 5 µl of template diluted cDNA, 2x Mix and 300 nM forward and reverse primers. The cycle conditions were set as follows: 95 °C for 30 s, (95 °C for 5 s, 60 °C for 30 s) ×40 cycles, melting curve and cooling according to specific guidelines for LightCycler. All reactions were run in triplicate for each testing primer couple and GAPDH was run in duplicate to be used as the normalizing gene. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate relative mRNA levels. (See [supplemental Table V.4](#) for primer sequences).

V.4.9. Protein Extraction and Western Blot

Cell protein lysate were obtained from DE0194 and DE0193 fibroblasts using RIPA buffer (Pierce, Thermo-Fisher Scientific) (25 mM TrisHCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), containing protease and phosphatase inhibitors (Roche diagnostic). Resolved proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Millipore) and then probed with different primary antibodies: TTLL11 (#PA-46070, Thermo-Fisher Scientific 1/500), GT335

(Adipogen #AG-20B-0020 1/1000), PolyE (Adipogen #IN105 1/1000) and β -actin (Santa Cruz Biotechnology #sc-47778). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for chemiluminescent substrate visualization (ECL Plus, Amersham Biosciences).

V.4.10. Immunofluorescence

Cells were cultured in an eight-well-chamber glass slide (Fisher scientific cat #354108). Mutant and WT cells were treated with medium without FBS for 24h before processing to immunofluorescence. Cells were fixed with (70% ethanol/0.2% triton on ice) and permeabilized with 0.1% triton in PBS (PBST) then incubated with GT335 (Adipogen #AG-20B-0020 1/1000), PolyE (Adipogen #IN105 1/1000), anti-TTLL11 (thermofisher cat #PA5-46070 1/250) and anti-acetylated- α -tubulin (mouse monoclonal antibody, Sigma Aldrich cat #T7451 1/2000) antibodies diluted in 2% BSA/PBST. They were incubated for 1 h at room temperature (RT). Cells were then washed three times with PBST and incubated with secondary antibodies Alexa fluor 488 anti-rabbit (life technologies cat #A11008 1/500) and Alexa fluor 555 anti-mouse (Life technologies cat #A21422 1/500) for 1 h at RT. Mounting was done using prolonged gold anti-fade reagent with diamidino-2-phenylindole dye for fixed cells (DAPI) (Life technologies cat #P36931). Images were taken using Leica microscopy.

V.4.11. Zebrafish Maintenance

Adults, larvae and embryos were raised at 28.5 °C on a 14 h:10 h light:dark cycle. Adults and embryos were maintained using standard methods provided by the zebrafish book⁹². We used 0.02% tricaine (MS-222; Sigma Chemical, St. Louis, MO) in clean tank water to anaesthetize fish prior to all procedures.

V.4.12. *Tt//11* knockdown in Zebrafish

A translation blocking antisense morpholino oligonucleotide (MO) targeting the *tt//11* gene was designed and synthesized by Gene Tools LLC (USA). The sequence of the *tt//11*-MO was 5'-

GGC TGA TTT GTT ATC TCA TCT AGG T-3', while that of the control-MO, was 5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'. MOs were diluted to 1 ng/nl, and approximately 3nl was injected into fertilised zebrafish eggs at the one- to two-cell stage using a Picospritzer III microinjector. Embryos were stage matched, anaesthetised using 0.02% MS222 in E3 embryo medium and observed under a stereomicroscope (SZX16 Olympus).

V.4.13. *Tt//11* Mutant Zebrafish

We used the CRISPRscan software⁹³ to design the sgRNA to target the sequence **GAG** GTA GAT GCC ATC CCCTT **GGG** (with **PAM**, Protospacer Adjacent Motif). The designed sgRNA, taatacgactcactataGGG GTA GAT GCC ATC CCC TTgttttagagctagaa has no identified off-targets using CRISPR-scan. All injections were performed in 1-cell stage embryos from WT strain. Each embryo was injected with around 1.7 nl solution containing 30 ng/ μ l of sgRNA and 100 ng/ μ l of Cas9 mRNA. Mutants were selected by using HRM (High-resolution melting) as described previously⁹⁴. To date, the transgenic lines have been outcrossed for more than 4 generations to dilute out potential off target mutations.

V.4.14. Three-Dimensional Imaging and Reconstruction

Three months old WT and *tt//11* mutant zebrafish were collected and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C and three-dimensional Imaging and Reconstruction of Zebrafish spine underwent a micro-CT scan (SkyScan 1072 High Resolution Desktop Micro-CT System, Microtomograph, SkyScan) for three-dimensional (3D) visualization of the skeleton after 3D imaging and subsequent reconstruction. Acquisition parameters for the scan were as follows: 35 kV, 215 μ A, step rotation of 0.9°, pixel size 4-7 microns; images were reconstructed using NRecon (Version: 1.6.1.3). The general body shape of 8 days-old larvae was also analysed under a stereomicroscope (Leica M205 FA).

V.4.15. Retinal Histology and Immunostaining

Adult zebrafish were decalcified after micro-CT examination and embedded in paraffin wax prior to transverse sectioning. Eye tissue sections (6 μm) were then mounted on microscope slides and stained with hematoxylin eosin (H&E) following standard protocol. For immunostaining, eye tissue sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in a graded series of ethanol, washed 3 times in PBS, and permeabilized for 30 min in 4% Triton X-100 containing 10% goat serum and 2% bovine serum albumin (BSA). Then retinal sections were incubated with the zpr1, zpr3 antibodies obtained from the Zebrafish International Resource Center⁹⁵ or 3A10 antibody obtained from Hybridomas Bank (cat# AB_531874) (1/500) and acetylated- α -tubulin (Sigma Aldrich cat #T7451) (1/2000) simultaneously during 24 h at 4 °C. Tissue sections were washed several times in PBS and then incubated with the secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (life technologies cat# A11008 1/500) and Alexa Fluor 555 (Life technologies cat # A21422 1/500) for 1 h at RT. Images were acquired using confocal microscope.

V.4.16. Statistical Analysis

All data values are given as means \pm SD. Statistical analyses were performed, and data were plotted in SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). One-way ANOVAs and Fisher LSD tests were used to determine significance of normally distributed and equal variance data. Kruskal–Wallis ANOVA and Dunn’s method of comparison were used for non-normal distributions.

V.4.17. Study Approval

All animal procedures applied in this study were carried out in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council for Animal Care (CCAC), the CHU Sainte-Justine Research Center, and the Comité de Déontologie de l’Expérimentation sur les Animaux (CDEA), which is the local animal care committee at the University of Montreal, Canada. The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo

Experiments). This study was approved by the ethics committee for CHU Sainte-Justine Research Center, University of Montreal (ZF-09-60/Category B). All procedures involving humans were carried out in accordance with the guidelines set out by the ethics committee of CHU Sainte-Justine Research Center. Written informed consent was received from participants and from legally authorised representative of minor participants prior to enrollment.

V.5. Results

V.5.1. Identification of a Rare Variant in *TLL11* Gene.

Linkage analysis previously refined the region *9q31.2-q34.2* as an AIS susceptibility locus in a 5-generation family, SC32, affected by autosomal dominant AIS² ([Figure V.1A](#)). The curvature in this family ranged from 15° to 65°, and the Cobb angle measured for the proband (SC32.1) was 40° at the diagnosis and progressed to 56° before surgery ([Figure V.1B](#)). The linkage analysis revealed that all clinically affected individuals within family SC32 shared a common haplotype, that was absent for all unaffected individuals, confirming that disease segregated with 9q (supplemental [Figure V.1](#))². To identify the causative gene, exome sequencing was performed for this specific region, *9q31.2-q34.2*, on 2 affected patients, the proband SC32.1 and SC32.16 (3 meiosis distance, SC32 family). Each exome was sequenced to a mean depth of 71.39× and 62.87× with > 84.01% and > 81.18% of coding bases covered by > 20 reads respectively.

Reads were then aligned to the reference genome hg19 and a rare variant in *TLL11* gene was identified by variant calling ([Figure V.1C](#)). *TLL11* gene codes for two transcripts, transcript 1 (NM_001139442), which is longer than transcript 2 (NM_194252). The identified mutation is an insertion of two thymine (g.124751443_124751444insTT, MAF < 1%) that results in a premature stop codon in the transcript 2 (c.1569_1570insTT), leading to a truncated protein (p.Pro524PhefsTer4) ([Figure V.1D](#)). This rare variant that we identified was not present in 3000 in house control exomes and was found on 8 alleles on 8246 according to the EVS database (Exome variant server²⁸) ([supplemental Table V.1](#)). Moreover, this variant is predicted to be

pathogenic for the transcript 2 by UMD-predictor²⁹ (UMD-score: 100) and MutationTaster³⁰ (score: 1; disease causing).

Subsequently, to assess for mutations in *TLL11* in a larger cohort, its 9 exons were screened by Ion AmpliSeq from Life technology in 96 AIS affected individuals from a French-Canadian and British population. The VarAFT 2.3 software was used to annotate and filter the 13 genetic variants discovered in *TLL11* gene. After filtering (minor allele frequency < 1%, single-nucleotide substitutions and small indels, pathogenicity prediction), out of 13 variants, 2 were identified as novel rare variants in *TLL11* (*Supplemental Table V.2*). Interestingly, these two rare variants were found in 2 British AIS patients and none were identified in any of the AIS affected patients from the French-Canadian population (*Supplemental Figure V.2*). These two mutations are predicted to be pathogenic for the transcript 1 (NM_001139442), SC203: c.1751+1G>A, (rs not known), HSF: Broken WT Donor Site and SC217: c.2214C>A; rs766983167, UMD-score: 100).

To gain more insights on the pathogenic role of the mutation in gene *TLL11* on its expression, we first assessed *TLL11* transcripts 1 and 2 expression from healthy control (DE0194) and patient-derived fibroblasts (NM_194252: c.1569_1570insTT; DE0193). In WT cells, the expression of WT *TLL11* transcript 1 was increased from 1 to 2 h following FBS privation prior to returning to regular expression (*Figure V.2A*). In parallel, the mRNA expression of WT *TLL11* transcript 2 was decreased (*Figure V.2B*). In mutant cells, the expression of *TLL11* transcript 1 is reduced compared to WT transcript (*Figure V.2A*). In parallel, mutant *TLL11* transcript 2 expression is increased compared to WT (*Figure V.2B*). These results suggest that the c.1569_1570insTT mutation disturbs the mRNA expression of *TLL11* transcript 1 and 2.

V.5.2. TLL11 Localisation and Ciliogenesis

The localization of *TLL11* was assessed by immunofluorescence staining in mutant DE0193 and WT DE0194 fibroblasts after 24 h of serum starvation^{31,32}. Acetylated- α -tubulin antibody binds to α -tubulin that carry acetylated K40, meaning primary cilia from proximal to distal

end³³, centrioles, mitotic spindles, midbodies and to subsets of cytoplasmic microtubules. According to these results and assuming that α -tubulin acetylation of primary cilia is independent of TTLL1 function and reliably indicates ciliary length, acetylated- α -tubulin was used as primary cilia marker. Despite the ciliary function, in fibroblasts, WT TTLL11 proteins localized in the nucleus and in the cytoplasm (*Figure V.3A*) but mutant TTLL11 proteins were more nuclear.

Moreover, after 24 h of serum starvation, around 75% of WT fibroblasts showed acetylated α -tubulin primary cilia compared to 20% for the TTLL11 mutant fibroblasts ($p=3.9\times 10^{-9}$) (*Figure V.3B*) for which the length of acetylated α -tubulin from the primary cilium was reduced (*Figure V.3C*). Indeed, primary cilia of more than 5 μ m are significantly reduced for mutant cells, and cilia of less than 3 μ m were more prominent in mutant cells compared to WT fibroblasts (*Figure V.3C*). These results reveal that the identified mutation (c.1569_1570insTT) of *TTLL11* leads to a mislocalisation and shorter cilia or the absence of cilia. Taken together, these results confirm the implication of TTLL11 in primary cilia integrity.

V.5.3. *TTLL11* is Required for Proper Long Glutamate Side Chains

Tubulin undergoes different post-translational modifications (PTMs) called the tubulin code. The most characterised PTMs are acetylation, detyronisation, glycylation and glutamylation³⁴. TTLL11 is a polyglutamylase from the tubulin tyrosine ligase-like (*TTL*) family of proteins that includes enzymes responsible for the two PTMs glutamylation and glycylation. TTLL11 is known to preferentially modify α -tubulin by extending the glutamate chain as an elongase³⁵. The functionality of TTLL11 in mutant DE0193 cells and WT DE0194 cells was then assessed using both GT335 and polyE antibodies that detects the branch point of glutamate side chains or the long polyglutamate chains (≥ 3 glutamates) respectively. Interestingly, the polyglutamate chains were reduced at the cilium level in mutant cells (*Figure V.4 A, B*), and the amount of branch point glutamate was also reduced (Stained with GT335). Additionally, the long polyglutamate chains (≥ 3 glutamates) were induced after serum starvation until 48 h prior to decrease in the WT cells while the long polyglutamate chains were strongly decreased in the

mutant *TLL11* cells ([Figure V.4C](#)); leading to short cilium length. These results demonstrate that *TLL11* is required for proper long glutamate side chains elongation, and this function is impaired in *TLL11* mutant AIS cells.

V.5.4. *Tll11* Is Implicated in Zebrafish Spinal Development

To further functionally validate the implication of *TLL11* in the pathogenesis of AIS, knockdown modelling in zebrafish was performed; a powerful model to study AIS^{1,18,36,37}. Phylogenetic analysis indicated that *TLL11* was conserved during evolution and that zebrafish have a unique ortholog that shares 71% of homology with human *TLL11* gene. Interestingly, *tll11* is expressed as early as the 8-cell stage and later in development its expression is predominantly localized to the central nervous system³⁸. We disrupted *tll11* expression using an antisense morpholino (MO) ([Figure V.5A](#)). Loss of function of *tll11* resulted in a significant curvature of the body axis in *tll11* morphants compared to control embryos as from 2-days postfertilization (hpf) ([Figure V.5B](#)). The body curvature in *tll11* morphants progresses through early larval stages (4–6 dpf) with a moderate or severe body curvature ([Figure V.5C](#)). Similar phenotypic variability in the appearance and severity of the curve has been observed in several zebrafish models of scoliosis^{1,39,40}. We were unfortunately not able to fully characterize the spinal curvature during juvenile and adult stages using bone imaging techniques because the *tll11* morphants did not survive past 9–12 dpf, likely due to their inability to swim and reach for food.

We thus created a mutant zebrafish line for *tll11* gene using CRISPR-Cas9. We identified a founder mutant zebrafish carrying an 18 bp insertion in exon 4 of *tll11* leading to a strong modification of the TTL domain of the protein ([Figure V.6A](#)). The zebrafish homozygous mutant (*mut-tll11*) exhibited a high incidence of body axis curvature in the larvae compared to WT fish but at a lower penetrance than *tll11*-MO ([Figure V.6C](#)). The body curvature varied with different degrees of severity ([Figure V.6B](#)). Moreover, all the mutant larvae that were showing a curly phenotype died before 2 weeks post fertilization ([Figure V.6D](#)). Fish that acquired the curvature at a later stage were able to live until adult stage and we analysed mineralized spine

of these adult fish using micro-CT that revealed a 3D deformation similar to the deformation observed in AIS patients ([Figure V.6E](#) and supplemental videos). Indeed, the mutant spine displays curvature in two different planes with a rotation of vertebrae.

V.5.5. *Ttll11* Is implicated in Retinal Integrity in Zebrafish

Ciliary defects cause a group of diseases called ciliopathies that are especially characterized by retinal defects and scoliosis. Cilia, as a complex structure, comprises more than 900 genes that are involved in ciliary structure and function⁴¹, and those genes are called ciliary genes. Because *TLL11* is a ciliary gene, and ciliary genes, such as *POC5*, were already related to retinal function^{42–45}, the ciliary retinal tissue was then investigated. Zebrafish *ttll11* has been reported to be expressed within the CNS and neural tube³⁸. Moreover, function and structure of photoreceptor cilia are well understood⁴⁶ and zebrafish retina is easy to access. Retinal sections of WT and mut-*ttll11* zebrafish with and without scoliosis were stained by hematoxylin eosin ([Figure V.7](#)) and revealed a disorganization of the cone cell layer of mut-*ttll11* adult zebrafish compared to control.

To validate this finding, retinal sections were then labeled with different retinal layer specific antibodies: 3A10 antibody, specific to neurofilaments (rods and cones), *zpr1* antibody, specific to cones and *zpr3* that is specific to rods ([Figure V.8](#)). We observed a disorganisation of the cone cell layer ([Figure V.8A, B](#)) and especially of the double cones in mutant fish compared to controls. Indeed, lack of staining is observed in cones cell body layer ([Figure V.8B](#), white arrows) and the layer of double cones cilium seems to be impaired ([Figure V.8B](#), black arrows). On the other hand, no anomalies were observed in the rod layer between mutant *ttll11* zebrafish and controls ([Figure V.8C](#)). These results support the implication of the ciliary protein *ttll11* in retinal layer integrity in a zebrafish model.

V.6. Discussion

Idiopathic Scoliosis is a complex disease with a multifactorial aetiology⁴⁷ including genetic, epigenetic⁴⁸, environmental, biomechanical⁴⁹ and hormonal⁵⁰ factors. Many studies identified

candidate genes that are probably involved in pathogenesis of IS and AIS but almost all of them are susceptibility genes, not causative genes^{51,52}. In this study, we reported a new causative gene in a five-generation UK family, *TLL11*, a ciliary gene.

The refinement of a major locus for IS on chromosome *9q31.2-q34.2*² was previously described in this family, SC32. A significant LOD score was detected at marker D9S2157 ($Z_{\max}=3.64$ ($h=0.0$)) and saturation mapping of the 9q region in family SC32 defined the critical disease interval to be flanked by markers D9S930 and D9S1818. This critical region cosegregated with disease in all affected members of this 5-generation family. Then, exome sequencing was performed to identify the causative gene. Exome sequencing revealed a single rare allele (MAF < 0.001) within the protein coding sequences of the defined linkage interval that was shared between the two sequenced individuals and not present in 3000 in house control exomes. The allele is predicted to lead to a frameshift in *TLL11* disrupting the transcript 2 of this gene (NM_194252). Sequencing of *TLL11* gene in 96 additional patients from our French-Canadian and British cohort (23 French-Canadian and 73 British patients), identified 2 new rare mutations in *TLL11* gene in the AIS population that are predicted to be pathogenic. However, so far, *TLL11* mutations were only found in British AIS population, so this gene could be specific to this population.

TLL11 is a ciliary protein and a member of Tubulin Tyrosine Ligase Like (TLL) family, which play a role in α - and β -tubulin mono- and polyglutamylation, a post-translational modification (PTM). This PTM is crucial for ciliary integrity, cell cycle and cell differentiation^{53,54}. Indeed, polyglutamylation has been shown to maintain a proper alignment of outer doublet in ciliary axoneme^{55,56}.

Recently Patten et al.¹ reported a causative gene, *POC5*, a ciliary-related gene, which explains 10% of AIS family cases. *TLL11* and *POC5* seem to be involved in a similar biological process, which could be involved in the physiopathogenesis of AIS. Indeed, these genes have an important role in the integrity of cilia especially primary cilia. It is accepted that ciliopathies could include skeletal deformity and scoliosis.

Polyglutamylation is a reversible modification characterized by the addition of glutamate residue, carefully regulated by the TLL proteins family and tubulin deglutamylase of the Cytoplasmic Carboxyl Peptidase (CCP) proteins family⁵⁷. This post-translational modification allows the interaction with the microtubule-associated proteins (MAPs)⁵⁴ and play a role on intraflagellar transport (IFT)⁵⁸.

In human fibroblasts, we showed that TLL11 is localized in the nucleus. Similar findings were observed when TLL11 was expressed in HeLa cells⁵⁹. In contrast, *tll11* was shown to localize in the cilium in *C. elegans*⁶⁰ and in the basal body in MDCK cells³⁵. However, these are limited studies and further work is required to better characterize its cellular localization in mammalian cells, especially in human cells.

According to the literature, mouse *Tll11* shows preference for polyglutamylation elongation of α -tubulin when overexpressed in HeLa cells³⁵, but in the nematode *C. elegans*, a recent study highlighted the crucial role of *tll11* to initiate the glutamate side chain⁶¹. This recent analysis is consistent with our data in human AIS cells, indeed we showed that TLL11 was required to add the initiating glutamate to the side chain and proper long glutamate side chain. We noticed that the GT335 signal was not completely lost suggesting that some residual branch point glutamates were still added, suggesting a residual activity of mutant TLL11, or a residual activity of one of the other initiase from the TLLs family. For instance, TLL5 is responsible of the proper glutamylation of RPGR, an X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator⁶². To date, no non-tubulin substrate for TLL11 has been described, but it can't be excluded.

Little is known about the role of TLL11 and about its potential role in IS but recent studies demonstrate that cilia hypoglutamylation promotes cilia disassembly⁶³ and affect Hh signalling through anterograde IFT dependant mechanism^{58,63}. *TLL11* gene leads to two different transcripts, transcript 1 composed by 9 exons and transcript 2 that has 4 exons, but their roles are not well documented yet.

Our experiments support the hypothesis of the implication of cilia pathway in AIS physiopathogenesis. Moreover, the TLL protein family was found to be involved in Joubert

syndrome [MIM; 612291], a ciliopathy characterized by mid-hindbrain malformation, hypotonia, developmental delay and skeletal defects such as scoliosis⁶⁴. Indeed, TLL6, which is also an α -tubulin polyglutamylase⁵³, was found to be mislocalized in Joubert Syndrome⁶⁵. The characterization of TLL11 mRNA expression and its localization in AIS patient fibroblasts highlight an impairment due to the c.1569_1570insTT mutation and this seems to drastically affect ciliogenesis. An increase of transcript 2 was observed, and although in-silico prediction, we also observed a modification of TLL11 transcript 1 mRNA expression, probably to balance the over-expression of transcript 2. Altogether, our results suggest that the altered TLL11 protein leads to a hypoglutamylated tubulin resulting in shorter primary cilia. Supporting this hypothesis several studies have shown the involvement of glutamylation in ciliogenesis, IFT and Hedgehog signaling^{58,63}. Moreover, TLL11 glutamylation was demonstrated to regulate ciliary trafficking, extracellular vesicle (EVs) release in *C. elegans*⁶⁰.

Interestingly, cilia host Ihh signalling⁶⁶, which is involved in both endochondral and intramembranous ossification⁶⁷, that are implicated in spine development⁶⁸. In addition, Ihh pathway is associated with height^{69,70}, an important parameter for the evolution of the spine curvature occurring in AIS⁷¹. Primary cilia host also the polycystin pathway which is involved in skeletogenesis and bone development^{72,73}. Moreover, cilia sensory functions are exhibited by the TRP family receptors and Ca²⁺ influxes and interestingly, cilia respond to the sex hormones^{74,75} that are significantly increased during puberty.

To support the implication of this gene in IS physiopathogenesis we did functional studies in an animal model, zebrafish (*Danio rerio*). The phenotype that we observed is similar to the phenotype observed in fish when *ttl3* and *ttl6*, two other members of the TLL protein family, are knocked down³⁸, which supports the implication of this family in skeletal development. Because this approach is not highly specific and because these larvae did not live for more than 2 weeks, a mutant zebrafish line was designed using the genome-editing technology CRISPR-Cas9. With the selected guide, only one mutation was obtained, an 18pb insertion in exon 4 of *ttl11* leading to an insertion of 6 amino acids on the TTL domain of the protein. Almost no larvae with spine curvature were able to stay alive suggesting that this deformation is not

viable for more than 2 weeks. This effect could be explained by the fact that the curvature affects their swimming capacity and prevents them from feeding. However, some fish developed this deformity at a later stage and were able to grow until adult stage. The curvature observed by micro-CT analysis in this *ttll11* mutant zebrafish line is a 3D spine curvature with vertebral rotation (supplemental videos).

Because *TLL11* is a ciliary protein and because the *TLL5* (also from the *TLLs* family) and the ciliary protein *POC5* was found to be implicated in scoliosis and retinal function^{1,42,62}, histology of mut-*ttll11* retinal tissue was assessed and revealed a disorganisation of the double cone cell layer. Interestingly, no retinal defect was initially observed in *Tll5*^{-/-} mice⁷⁶, but further additional assays at older stage revealed a progressive photoreceptor degeneration⁶².

These studies describe that retinal defect was seen in older animals but AIS is a disease that develop during the puberty, at younger stage of life. These results suggested a link between vision and the proper development of the spine as a link between vision and AIS was already showed in human⁷⁷, this field warrants further investigations. Noteworthy, no visual disturbance was observed in the 5-generation UK family based on clinical record.

In parallel, several studies showed that cilia could be involved in AIS by their implication in CSF (cerebrospinal fluid). Indeed, motile cilia of the surrounding epithelium of CSF could play an important role in distribution of this flow⁷⁸, and a defect of the CSF flow in zebrafish influences body axis formation and spine morphogenesis^{18,79,80} possibly through CSF-contacting neurons that line the central canal of the spinal cord and the brain ventricles⁸⁰.

Finally, identifying *TLL11*, as a novel gene for IS with role in cilia biology is a crucial step to clarify pathways potentially involved in this condition. Based on this study, in addition to the previously identified ciliary genes in Human^{1,81-85} and animal model^{19,37,39}, this pathology could be considered as a cilia-associated disorder, or a subtype of ciliopathy.

Further studies of larger cohort are needed to establish the prevalence of mutated *TLL11* in AIS and to clarify the involvement of ciliary pathways. Understanding these mechanisms can

contribute, in the long term, to the early diagnosis of scoliosis and may help to establish strategies to prevent the progression of deformity. Meanwhile, in affected families where causative or predisposing mutations are identified, offspring can be screened in the newborn period. Those identified as carrying the family mutation can be followed at regular intervals and early spinal curvature treated optimally to prevent severe deformity.

V.7. Acknowledgements

This study was supported by Yves Cotrel Foundation (to FM, SP, AC) and Scoliosis Research Society (to FM). Marfan Trust UK (to AC and JAAM), Peter and Sonia Field Charitable Trust (to AC) St. George's University of London (to AC and JAM), This study was also supported by RSBO (Réseau de recherche en Santé Buccodentaire et Osseuse), CHU Sainte-Justine Foundation (to HM) and FRQS (to HM). We thank Mr Michael Garcia BSc for drawing pedigrees and patients for their participation to this project.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Web resources.

VarAFT:	https://varaft.eu/
UMD-predictor:	http://umd-predictor.eu/
HSF:	http://www.umd.be/HSF3/
Mutation Taster:	http://www.mutationtaster.org/
Ion Reporter:	https://ionreporter.thermofisher.com/ir/
OMIM:	https://www.omim.org/
Ensembl Genome Browser:	http://useast.ensembl.org/index.html
UniProt:	https://www.uniprot.org/

V.8. References

1. Patten, S. A. et al. Functional variants of POC5 identified in patients with idiopathic scoliosis. *J. Clin. Investig.* 125, 1124–1128. <https://doi.org/10.1172/JCI77262> (2015).
2. Ocaña, L. et al. Assignment of two loci for autosomal dominant adolescent idiopathic scoliosis to chromosomes 9q31.2-q34.2 and 17q25.3-qtel. *J. Med. Genet.* 45, 87–92. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.051896> (2008).
3. Konieczny, M. R., Senyurt, H. & Krauspe, R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J. Child. Orthop.* 7, 3–9. <https://doi.org/10.1007/s11832-012-0457-4> (2013).
4. Edery, P. et al. New disease gene location and high genetic heterogeneity in idiopathic scoliosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 865–869. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.31> (2011).
5. Wynne-Davies, R. Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J. Bone Joint Surg. Br.* 50, 24–30 (1968).
6. Wise, C. A. et al. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 25, 2372–2380 (2000).
7. Czeizel, A., Bellyei, A., Barta, O., Magda, T. & Molnar, L. Genetics of adolescent idiopathic scoliosis. *J. Med. Genet.* 15, 424–427 (1978).
8. Bell, M. & Teebi, A. S. Autosomal dominant idiopathic scoliosis?. *Am. J. Med. Genet.* 55, 112. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320550126> (1995).
9. Justice, C. M., Miller, N. H., Marosy, B., Zhang, J. & Wilson, A. F. Familial idiopathic scoliosis: Evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 28, 589–594. <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000049940.39801.E6> (2003).

10. Child A, Aubry M, Brice G, Park E, Putnam E, Milewicz D. The role of fibrillin 1 and fibrillin 2 in severe scoliosis. In *Research into Spinal Deformities 2*, Vol. 59, 213-215. <https://doi.org/10.3233/978-1-60750-903-5-213> (1999).
11. Riseborough, E. J. & Wynne-Davies, R. A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J. Bone Joint Surg. Am.*55, 974–982 (1973).
12. Miller, N. H. Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 462, 6–10. <https://doi.org/10.1097/BLO.0b013e318126c062> (2007).
13. Mongird-Nakonieczna, J. & Kozlowski, B. Familial occurrence of idiopathic scoliosis. *Chir. Narzadow Ruchu Ortop. Pol.* 41, 161–165 (1976).
14. Mongird-Nakonieczna, J. & Kozlowski, B. Functional and structural scoliosis in monozygotic twins. *Chir. Narzadow Ruchu Ortop. Pol.* 41, 34–36 (1976).
15. Miller, N. H. et al. Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine* 30, 1181–1187 (2005).
16. Chan, V. et al. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 401–406. <https://doi.org/10.1086/341607> (2002).
17. Miller, N. H. et al. Intra-familial tests of association between familial idiopathic scoliosis and linked regions on 9q31.3-q34.3 and 16p12.3–q22.2. *Hum Hered* 74, 36–44. <https://doi.org/10.1159/000343751> (2012).
18. Grimes, D. T. et al. Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature. *Science* 352,1341–1344. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6419> (2016).
19. Oliazadeh, N., Gorman, K. F., Eveleigh, R., Bourque, G. & Moreau, A. Identification of elongated primary cilia with impaired mechanotransduction in idiopathic scoliosis patients. *Sci. Rep.* 7, 44260. <https://doi.org/10.1038/srep44260> (2017).

20. Burwell, R. G. et al. Etiologic theories of idiopathic scoliosis: The breaking of bilateral symmetry in relation to left-right asymmetry of internal organs, right thoracic adolescent idiopathic scoliosis (AIS) and vertebrate evolution. *Stud. Health Technol. Inform.* 123, 385–390 (2006).
21. Kempeneers, C. & Chilvers, M. A. To beat, or not to beat, that is question! The spectrum of ciliopathies. *Pediatr. Pulmonol.* <https://doi.org/10.1002/ppul.24078> (2018).
22. Mitchison, H. M. & Valente, E. M. Motile and non-motile cilia in human pathology: From function to phenotypes. *J. Pathol.* 241,294–309. <https://doi.org/10.1002/path.4843> (2017).
23. Nguyen, A. M. & Jacobs, C. R. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes. *Bone* 54, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.11.016> (2013).
24. Hildebrandt, F., Benzing, T. & Katsanis, N. Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* 364, 1533–1543. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172> (2011).
25. Leucht, P. et al. Primary cilia act as mechanosensors during bone healing around an implant. *Med. Eng. Phys.* 35, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.medengphys.2012.06.005> (2013).
26. Ascenzi, M. G. et al. Effect of localization, length and orientation of chondrocytic primary cilium on murine growth plate organization. *J. Theor. Biol.* 285, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.06.016> (2011).
27. Ware, S. M., Aygun, M. G. & Hildebrandt, F. Spectrum of clinical diseases caused by disorders of primary cilia. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8, 444–450. <https://doi.org/10.1513/pats.201103-025SD> (2011).
28. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (2020).

29. Salgado, D. et al. UMD-predictor: A high-throughput sequencing compliant system for pathogenicity prediction of any human CDNA substitution. *Hum. Mutat.* 37, 439–446. <https://doi.org/10.1002/humu.22965> (2016).
30. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* 11, 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890> (2014).
31. Rieder, C. L., Jensen, C. G. & Jensen, L. C. The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *J. Ultrastruct. Res.* 68, 173–185. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(79\)90152-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(79)90152-7) (1979).
32. Tucker, R. W., Pardee, A. B. & Fujiwara, K. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* 17, 527–535. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90261-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90261-7) (1979).
33. Ly, N. et al. alphaTAT1 controls longitudinal spreading of acetylation marks from open microtubules extremities. *Sci. Rep.* 6, 35624. <https://doi.org/10.1038/srep35624> (2016).
34. Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P. & Gaertig, J. Posttranslational modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028159> (2017).
35. van Dijk, J. et al. A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol. Cell* 26, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.012> (2007).
36. Boswell, C. W. & Ciruna, B. Understanding idiopathic scoliosis: A new zebrafish school of thought. *Trends Genet.* 33, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.01.001> (2017).
37. Buchan, J. G. et al. Kinesin family member 6 (kif6) is necessary for spine development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 243, 1646–1657. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24208> (2014).

38. Pathak, N., Austin, C. A. & Drummond, I. A. Tubulin tyrosine ligase-like genes *tll3* and *tll6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem.* 286, 11685–11695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209817> (2011).
39. Hayes, M. et al. *ptk7* mutant zebrafish models of congenital and idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease. *Nat. Commun.* 5, 4777. <https://doi.org/10.1038/ncomms5777> (2014).
40. Lettre, G. et al. Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat. Genet.* 40, 584–591. <https://doi.org/10.1038/ng.125> (2008).
41. van Dam, T. J. P. et al. CiliaCarta: An integrated and validated compendium of ciliary genes. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216705> (2019).
42. Weisz Hubshman, M. et al. Whole-exome sequencing reveals *POC5* as a novel gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 27, 614–624. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx428> (2018).
43. Devlin, L. A. et al. Embryonic and foetal expression patterns of the ciliopathy gene *CEP164*. *PLoS ONE* 15, e0221914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221914> (2020).
44. Grochowsky, A. & Gunay-Aygun, M. Clinical characteristics of individual organ system disease in non-motile ciliopathies. *Transl. Sci. Rare Dis.* 4, 1–23. <https://doi.org/10.3233/TRD-90033> (2019).
45. Tatour, Y. & Ben-Yosef, T. Syndromic inherited retinal diseases: Genetic, clinical and diagnostic aspects. *Diagnostics* 10, 1. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100779> (2020).
46. Shi, Y., Su, Y., Lipschutz, J. H. & Lobo, G. P. Zebrafish as models to study ciliopathies of the eye and kidney. *Clin. Nephrol. Res.* 1,6–9 (2017).
47. Kikanloo, S. R., Tarpada, S. P. & Cho, W. Etiology of adolescent idiopathic scoliosis: A literature review. *Asian Spine J.* 13, 519–526. <https://doi.org/10.31616/asj.2018.0096> (2019).

48. Liu, G. et al. Whole-genome methylation analysis of phenotype discordant monozygotic twins reveals novel epigenetic perturbation contributing to the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 364. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00364> (2019).
49. Sarwark, J. F., Castelein, R. M., Maqsood, A. & Aubin, C. E. The biomechanics of induction in adolescent idiopathic scoliosis: Theoretical factors. *J. Bone Joint Surg. Am.* <https://doi.org/10.2106/JBJS.18.00846> (2019).
50. Janusz, P. et al. Estrogen receptors genes polymorphisms and age at menarche in idiopathic scoliosis. *BMC Musculoskelet. Disord.* 15, 383. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-15-383> (2014).
51. Fadzani, M. & Bettany-Saltikov, J. Etiological theories of adolescent idiopathic scoliosis: Past and present. *Open Orthop. J.* 11, 1466–1489. <https://doi.org/10.2174/1874325001711011466> (2017).
52. Latafski, M. et al. Current insights into the aetiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 137, 1327–1333. <https://doi.org/10.1007/s00402-017-2756-1> (2017).
53. Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K. & Janke, C. The tubulin code at a glance. *J. Cell Sci.* 130, 1347–1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.199471> (2017).
54. Janke, C. & Bulinski, J. C. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 773–786. <https://doi.org/10.1038/nrm3227> (2011).
55. Alford, L. M. et al. The nexin link and B-tubule glutamylation maintain the alignment of outer doublets in the ciliary axoneme. *Cytoskeleton* 73, 331–340. <https://doi.org/10.1002/cm.21301> (2016).

56. O'Hagan, R. & Barr, M. M. Regulation of tubulin glutamylation plays cell-specific roles in the function and stability of sensory cilia. *Worm* 1, 155–159. <https://doi.org/10.4161/worm.19539> (2012).
57. Rogowski, K. et al. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.014> (2010).
58. Hong, S. R. et al. Spatiotemporal manipulation of ciliary glutamylation reveals its roles in intraciliary trafficking and Hedgehog signaling. *Nat. Commun.* 9, 1732. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03952-z> (2018).
59. Lacroix, B. et al. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* 189, 945–954. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001024> (2010).
60. O'Hagan, R. et al. Glutamylation regulates transport, specializes function, and sculpts the structure of cilia. *Curr. Biol.* 27, 3430–3441.e3436. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.066> (2017).
61. Power, K. M. et al. Mutation of NEKL-4/NEK10 and TLL genes suppress neuronal ciliary degeneration caused by loss of CCPP-1 deglutamylase function. *PLoS Genet.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009052> (2020).
62. Sun, X. et al. Loss of RPGR glutamylation underlies the pathogenic mechanism of retinal dystrophy caused by TLL5 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, E2925–2934. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523201113> (2016).
63. He, K. et al. Axoneme polyglutamylation regulated by Joubert syndrome protein ARL13B controls ciliary targeting of signaling molecules. *Nat. Commun.* 9, 3310. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05867-1> (2018).

64. Parisi, M. A., Doherty, D., Chance, P. F. & Glass, I. A. Joubert syndrome (and related disorders) (OMIM 213300). *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 511–521. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201648> (2007).
65. Lee, J. E. et al. CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nat. Genet.* 44, 193–199. <https://doi.org/10.1038/ng.1078> (2012).
66. Koyama, E. et al. Conditional Kif3a ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis. *Development* 134, 2159–2169. <https://doi.org/10.1242/dev.001586> (2007).
67. Yang, J., Andre, P., Ye, L. & Yang, Y. Z. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int. J. Oral Sci.* 7, 73–79. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.14> (2015).
68. Guo, X., Chau, W. W., Chan, Y. L. & Cheng, J. C. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis. Results of disproportionate endochondral-membranous bone growth. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 1026–1031 (2003).
69. Weedon, M. N. et al. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat. Genet.* 40, 575–583. <https://doi.org/10.1038/ng.121> (2008).
70. Lui, J. C. et al. Synthesizing genome-wide association studies and expression microarray reveals novel genes that act in the human growth plate to modulate height. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5193–5201. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc347> (2012).
71. Ylikoski, M. Growth and progression of adolescent idiopathic scoliosis in girls. *J. Pediatr. Orthop. B* 14, 320–324 (2005).
72. Xiao, Z., Zhang, S., Magenheimer, B. S., Luo, J. & Quarles, L. D. Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II. *J. Biol. Chem.* 283, 12624–12634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710407200> (2008).

73. Xiao, Z. S. & Quarles, L. D. Role of the polycystin-primary cilia complex in bone development and mechanosensing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 410–421. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05239.x> (2010).
74. Haider, S. et al. Estrogen signaling drives ciliogenesis in human endometrial organoids. *Endocrinology* 160, 2282–2297. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00314> (2019).
75. Bloodgood, R. A. Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J. Cell Sci.* 123, 505–509. <https://doi.org/10.1242/jcs.066308> (2010).
76. Lee, G. S. et al. Disruption of *Ttll5*/stamp gene (tubulin tyrosine ligase-like protein 5/SRC-1 and TIF2-associated modulatory protein gene) in male mice causes sperm malformation and infertility. *J. Biol. Chem.* 288, 15167–15180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.453936> (2013).
77. Kurian, M. et al. Early-onset or rapidly progressive scoliosis in children: Check the eyes!. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 17, 671–675. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.05.011> (2013).
78. Kramer-Zucker, A. G. et al. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 132, 1907–1921. <https://doi.org/10.1242/dev.01772> (2005).
79. Brand, M. et al. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* 123, 129–142 (1996).
80. Sternberg, J. R. et al. *Pkd2l1* is required for mechanoreception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature. *Nat. Commun.* 9, 3804. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06225-x> (2018).
81. Baschal, E. E. et al. Sequencing of the *TBX6* gene in families with familial idiopathic scoliosis. *Spine Deform.* 3, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.jspd.2015.01.005> (2015).

82. Fei, Q. et al. The association analysis of TBX6 polymorphism with susceptibility to congenital scoliosis in a Chinese Han population. *Spine* 35, 983–988. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181bc963c> (2010).
83. Qin, X. et al. Genetic variant of GPR126 gene is functionally associated with adolescent idiopathic scoliosis in Chinese population. *Spine* 42, E1098–E1103. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002123> (2017).
84. Xu, L. et al. Genetic variant of PAX1 gene is functionally associated with adolescent idiopathic scoliosis in the Chinese population. *Spine* <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002475> (2017).
85. Londono, D. et al. A meta-analysis identifies adolescent idiopathic scoliosis association with LBX1 locus in multiple ethnic groups. *J. Med. Genet.* 51, 401–406. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102067> (2014).
86. Novoalign; <http://novocraft.com/>.
87. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033> (2010).
88. Li, H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> (2009).
89. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603> (2010).
90. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

91. Desvignes, J. P. et al. VarAFT: A variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 46, W545–W553. <https://doi.org/10.1093/nar/gky471> (2018).
92. Westerfield, M. *The zebrafish book A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* 4th edn. (Univ. of Oregon Press, XXX,2000).
93. Moreno-Mateos, M. A. et al. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat. Methods* 12, 982–988. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543> (2015).
94. Xing, L., Quist, T. S., Stevenson, T. J., Dahlem, T. J. & Bonkowsky, J. L. Rapid and efficient zebrafish genotyping using PCR with high-resolution melt analysis. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/51138> (2014).
95. ZIRC[https:// zebra fish. org/](https://zebrafish.org/).
96. Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340> (2004).
97. Lagman, D., Callado-Perez, A., Franzen, I. E., Larhammar, D. & Abalo, X. M. Transducin duplicates in the zebrafish retina and pineal complex: Differential specialisation after the teleost tetraploidisation. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121330> (2015).

V.9. Figures Legends

Figure V.1. Pedigree of UK Family SC32 in Which a Putative Gene Mutation Has Been Found.

A. Open circles and squares indicate unaffected individuals. Blackened circles and squares indicate affected females and males respectively. The arrow indicates family proband (SC32.1) and NGS sequenced patients are indicated by asterisks (SC32.1, SC32.16). B. Standing posterior radiographs of proband V:3 of family SC32, showing right thoracolumbar spinal curvature in the absence of congenital vertebral abnormality. Cobb angle measurement of 40° at time of diagnosis (left panel), Cobb angle measurement of 56° before corrective surgery (middle panel), and spinal fusion (right panel). C. Sequence obtained by Sanger sequencing of gDNA from scoliotic patient revealing the insertion of TT inducing a frameshift (DE0193 lower chromatogram), compare to normal sequence of non-scoliotic patient (DE0194 upper chromatogram). D. Representation of Human TTLL11 isoform 1 and 2 with the TTL domain showing the p.Pro524PhefsTer4 mutation (upper panel, black arrow), and partial alignment of TTLL11 by MUSCLE⁹⁶ from different species to identify conserved domains (lower panel, black arrow represents the mutated proline).

Figure V.2. WT and Mutant TTLL11 mRNA Expression After Starvation.

WT (DE0194) and mutant (DE0193) fibroblasts were treated with medium without FBS for different times. Cells were then processed for mRNA isolation and the relative mRNA expression of both transcript 1 (A) and 2 (B) of TTLL11 at different time points after serum starvation were determined by qPCR. The levels of mRNAs were plotted relative to cells harvested at 0 hour (n=3). Error bars represent SD. The difference between one independent group and the control group 0 hour was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

Figure V.3. WT and Mutant TTLL11 Protein Expression After Starvation.

A. WT (DE0194) and mutant (DE0193) fibroblasts were treated with medium without FBS for 24 hours. Cells were stained with immunofluorescence for acetylated α -Tubulin (red), TTLL11 (green) and DAPI (blue). Scale bar 20 μ m. B. Graphical representation of the percentage of

TLL11 mutant ciliated fibroblasts compared to WT fibroblasts (DE0194) n=660. C. Graphical representation of mean cilia length for *TLL11* mutant ciliated fibroblasts compared to WT fibroblasts (left panel) and distribution of ciliated cells based on cilia length: <3µm; 3-5µm; >5µm (right panel); n=185. Values shown as mean ± SD, the difference with controls was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

Figure V.4. Cilia Elongation Requires Long Polyglutamate Chain Generated By *TLL11*.

A. WT (DE0194) and mutant (DE0193) fibroblasts were treated with medium without FBS for 24 hours. Left panel, cells stained with immunofluorescence for acetylated α-Tubulin (red) and PolyE (green) show a strong reduction of polyglutamylation for the mutant *TLL11* cells. Scale bar 5µm. Right panel, Quantification of the PolyE/cilia length ratio in mutant ciliated fibroblasts (DE0193) compare to WT ciliated fibroblasts (DE0194). n=75. B. Wild type (DE0194) and mutant (DE0193) fibroblasts were treated with medium without FBS for 24 hours. Left panel, cells stained with immunofluorescence for acetylated α-Tubulin (red), GT335 (green) and DAPI (blue) show a decrease of polyglutamylation for the mutant *TLL11* cells. Scale bar 5µm. Right panel, Quantification of the GT335/cilia length ratio in mutant ciliated fibroblasts (DE0193) compare to WT fibroblasts (DE0194). n=118. C. Protein polyglutamylation of Wild type (DE0194) and mutant (DE0193) fibroblasts treated with medium without FBS for 0, 24, 48 and 72 hours analysed by western blot (GT335 and PolyE antibodies) reveal the loss of long polyglutamate chains for the mutant DE0193 cells. Full gels are shown as supplementary data. Values shown as mean ± SD, the difference between two independent groups was examined by unpaired, two-tailed Student's t-test, ***p ≤ 0.001

Figure V.5. Knockdown of *ttl11* Leads to Scoliosis Phenotype in Zebrafish Larvae.

Ttl11 knock-down zebrafish showed body curvature phenotype compared to control. A. Representation of the blocking antisense morpholino oligonucleotide targeting zebrafish *ttl11* (NM_001077375.1). B. Mutant and control zebrafish phenotype (3-5dpf). C. Incidence of body axial deformity after MOs injection into fertilised zebrafish eggs at the one- to two-cell stages.

Figure V.6. Effect of *ttll11*-mut in Zebrafish Body Axis and Lethality.

A. Sequence obtained by Sanger sequencing of the *mut-ttll11* zebrafish (left panel, lower chromatogram) compared to WT (left panel, upper chromatogram) and protein consequences (right panel). B. *Mut-ttll11* display different type of 3D curvature of the body axis in 8 days old *mut-ttll11* zebrafish. C. Incidence of scoliosis phenotype in 8 days old *mut-ttll11* zebrafish. 6% of the *mut-ttll11* zebrafish show a 3D curvature of the body axis. n=250. D. Lethality of scoliosis phenotype in 8 days old *mut-ttll11* zebrafish. All the *mut-ttll11* zebrafish expressing 3D curvature died after 2 weeks, 20% the first week and 80% the second week. All the WT and *mut-ttll11* no curved were alive after 2 weeks. n=15. E. lateral view (left panels) of WT, *mut-ttll11* and *mut-ttll11* with scoliosis adult zebrafish. MicroCT lateral (middle panels) and dorsal (right panels) images reveal a 3D curvature for the *mut-ttll11* with scoliosis fish compared to WT and *mut-ttll11* without scoliosis phenotype.

Figure V.7. Hematoxylin and Eosin (H&E)-Stained Retina of WT and Mutant *ttll11* Adult Zebrafish.

Retinal histology reveals a disorganization of the cone cell layer from *ttll11* mutant adult zebrafish compared to the WT (black arrows). The structure and the number of cone cells are impaired. n=3. Scale bar 20 μ m. *RPE*, retinal pigmented epithelium; *CC*, Cone cell layer; *ONL*, outer nuclear layer; *OPL*, outer plexiform layer; *INL*, inner nuclear layer; *IPL*, inner plexiform layer; *GCL*, ganglion cell layer.

Figure V.8. Effect of Mutant *ttll11* on Adult Zebrafish Rod and Cone Photoreceptors.

A. Retinal sections of WT and *mut-ttll11* zebrafish with and without scoliosis, labeled with 3A10 antibody (red) and DAPI (blue). 3A10 antibody is specific to neurofilaments (rods and cones). This labelling shows a disorganisation of the cone cells layer. Scale bar: 20 μ m. B. Retinal sections of WT and *mut-ttll11* zebrafish with and without scoliosis, labeled with *zpr1* antibody. The specific labelling of double cones with *zpr1* antibody suggest a disorganisation of cones cell body layer (white arrows) and the layer of double cones cilium seems to be impaired (black arrows). Right panel, representation of cone cell layer organisation, adapted from Lagman et al97. C. Retinal sections of WT and *mut-ttll11* zebrafish with and without scoliosis, labeled with *zpr3* antibody. *Zpr3* labelling is specific to rods and doesn't show significant difference

between WT and mutant zebrafish. n=3. *ROS: Rod Outer Segment; CC: Cone cell layer; OS: Outer Segment; ONL: Outer Nuclear Layer; IPL: Inner Plexiform Layer; INL: Inner Nuclear Layer; GCL, ganglion cell layer; DCOS: double cone outer segment; LSCOS: long single cone outer segment; SSCOS: short single cone outer segment.*

V.10. Figures

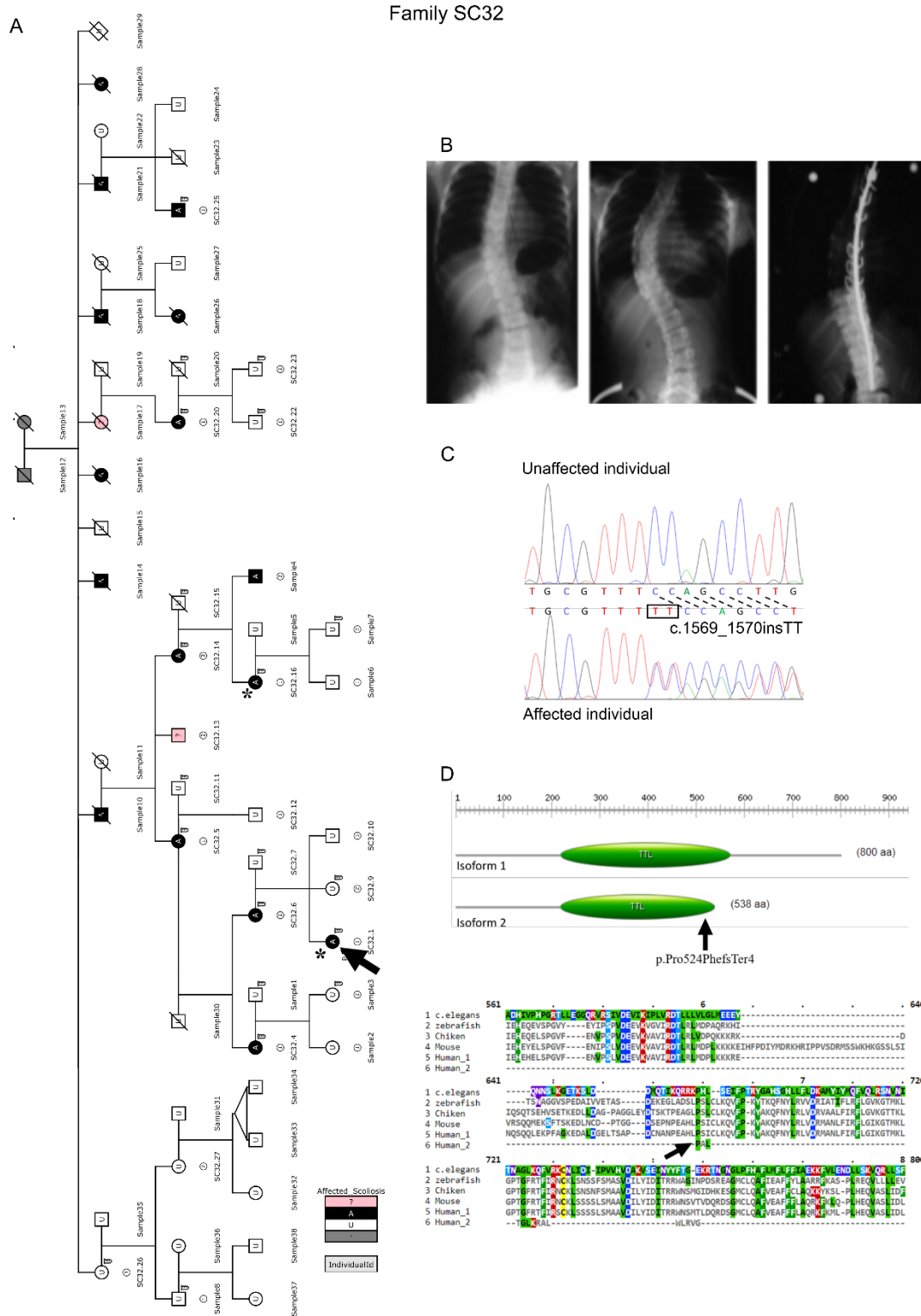


Figure V.1

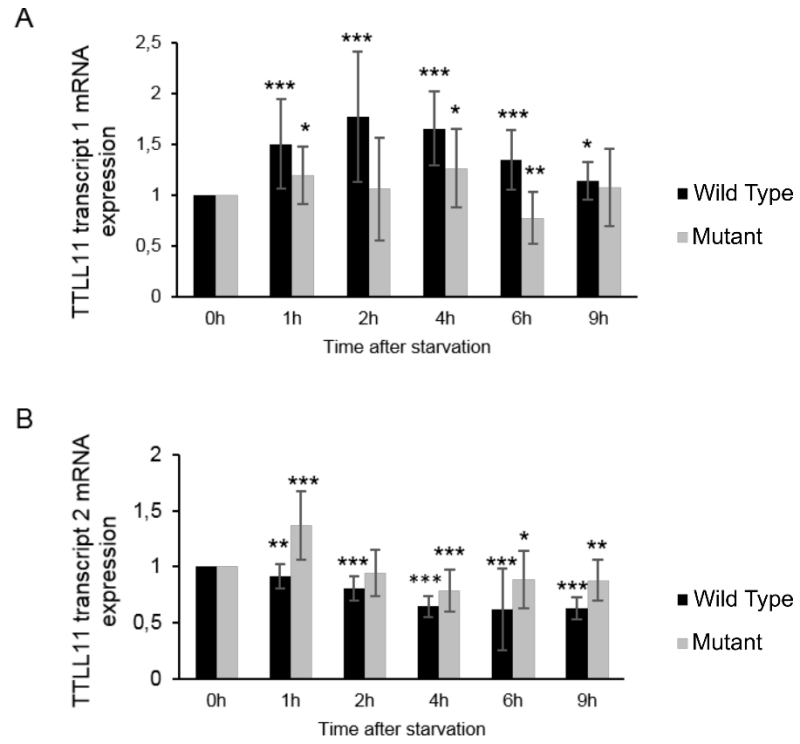


Figure V.2

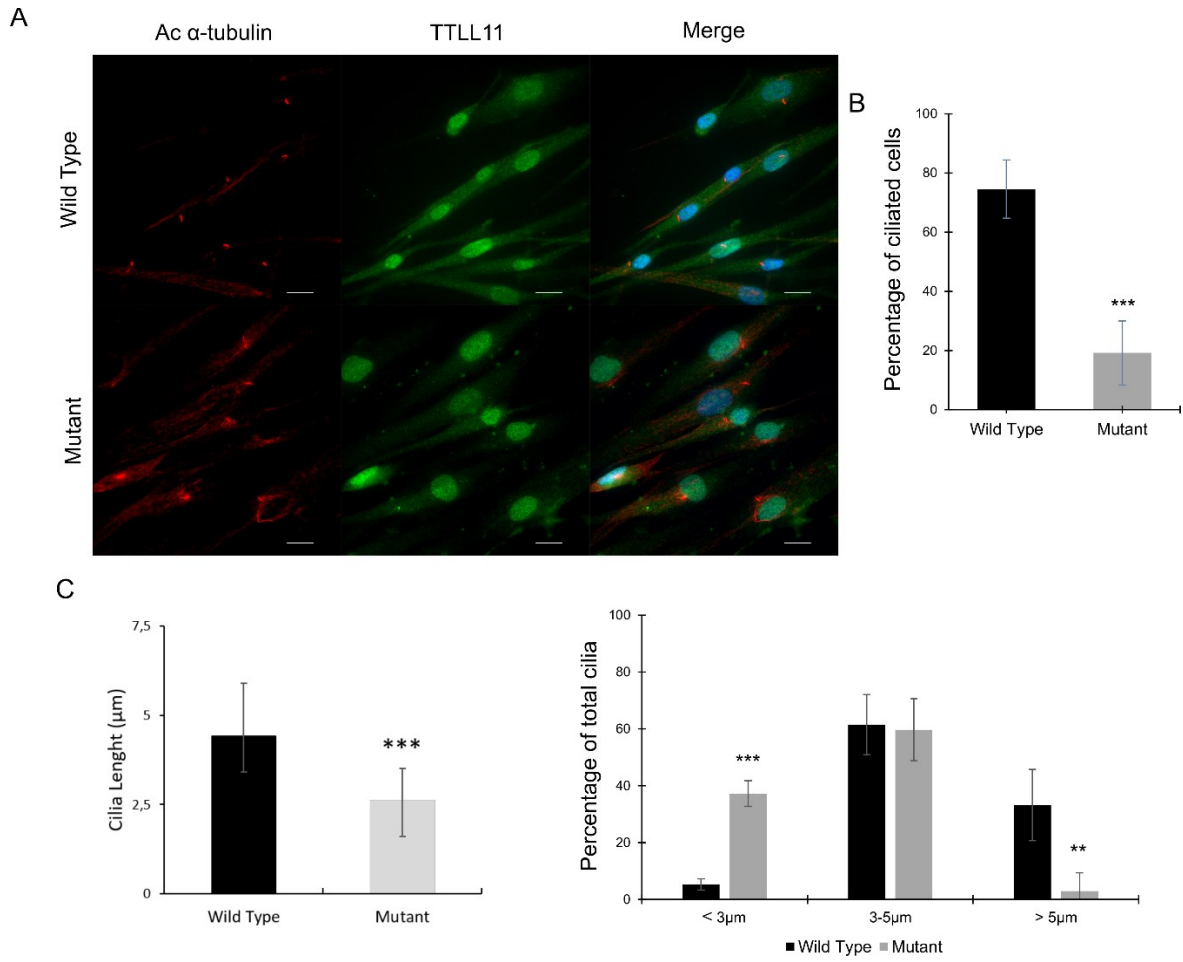


Figure V.3

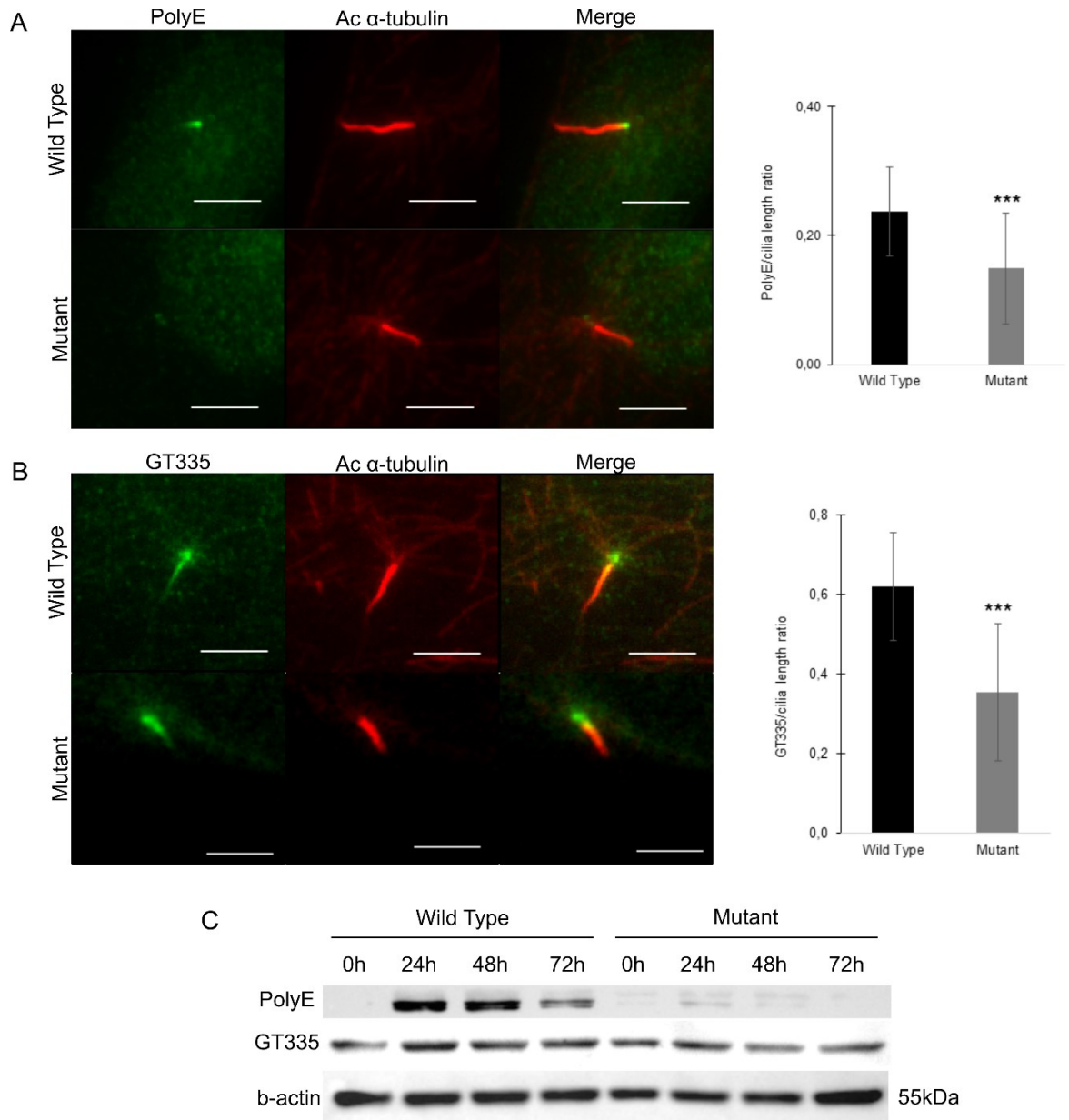


Figure V.4

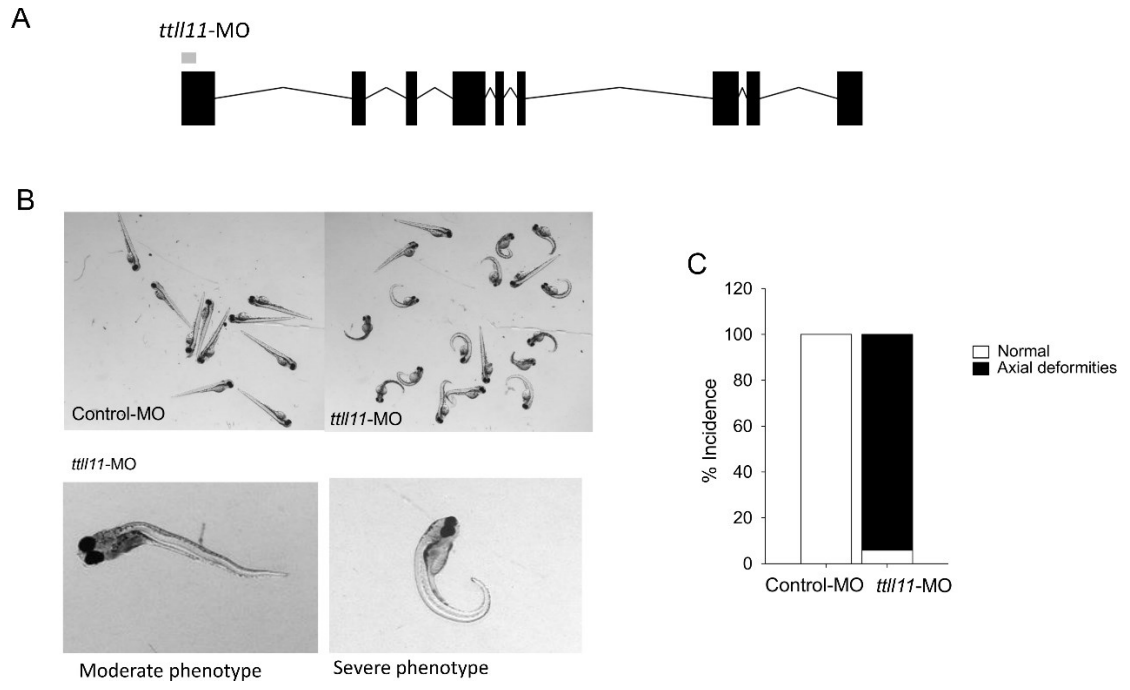


Figure V.5

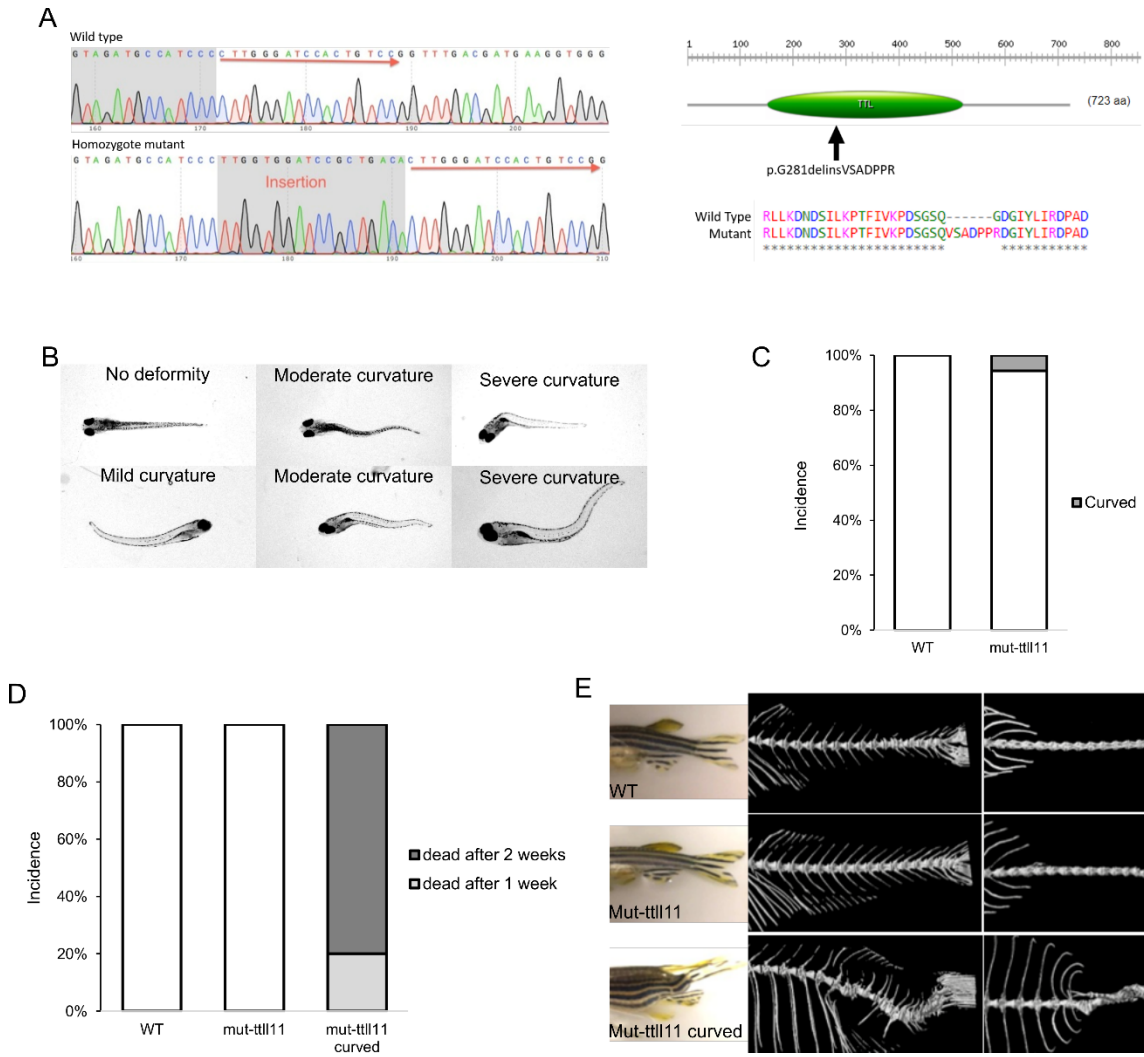


Figure V.6

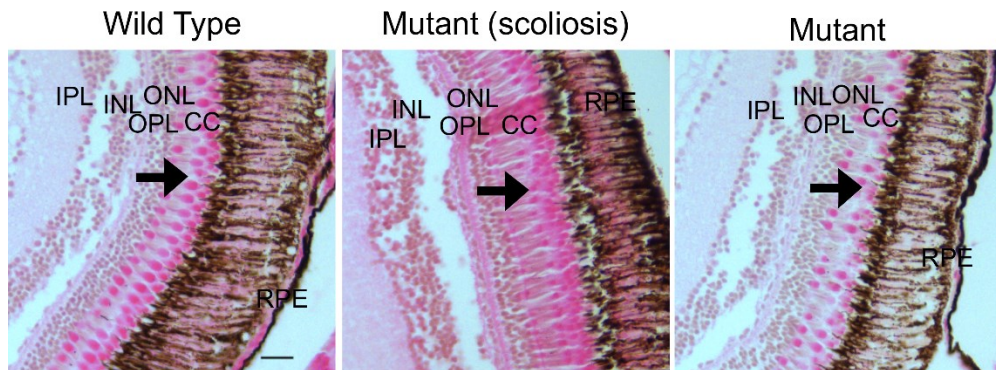


Figure V.7

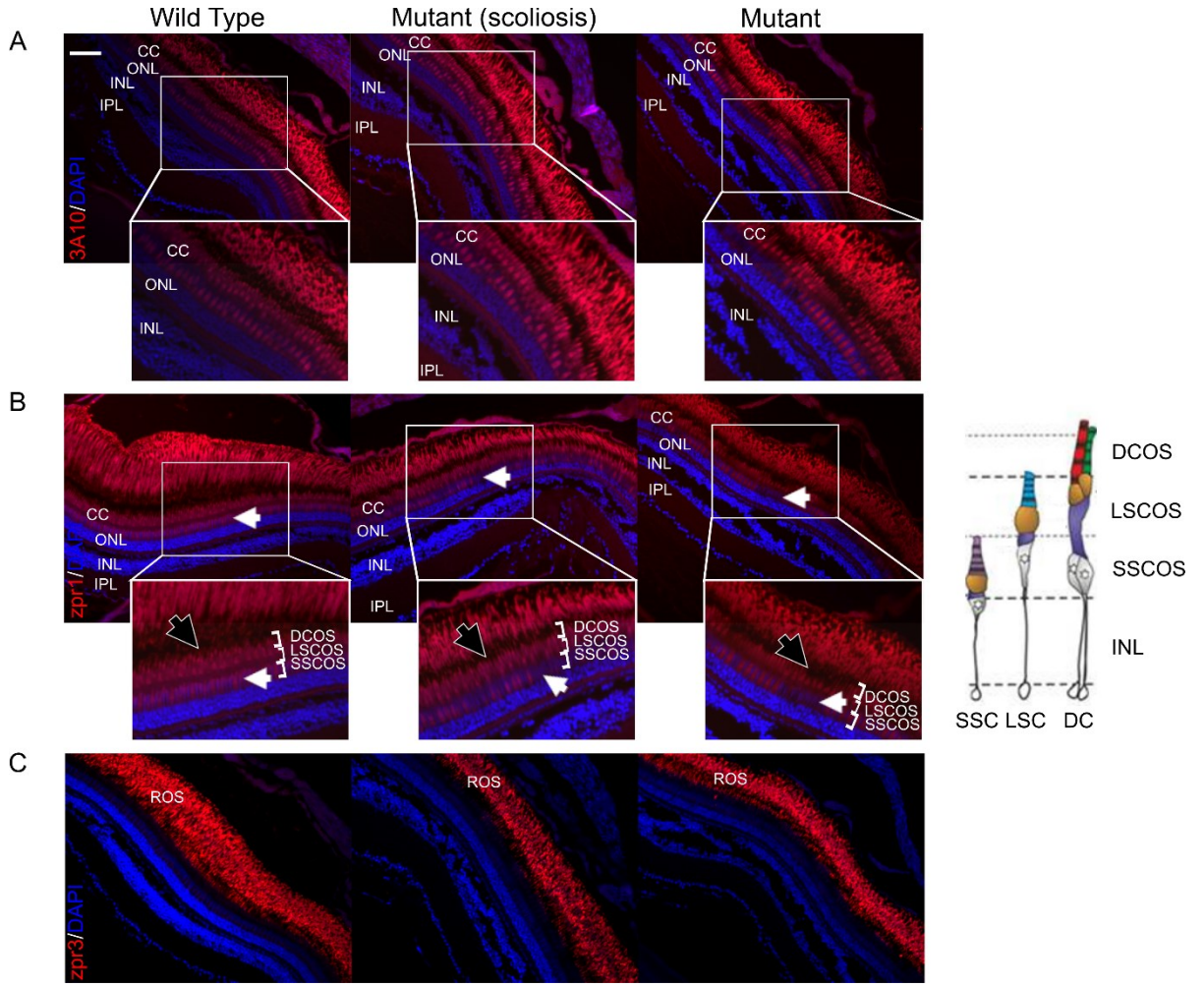
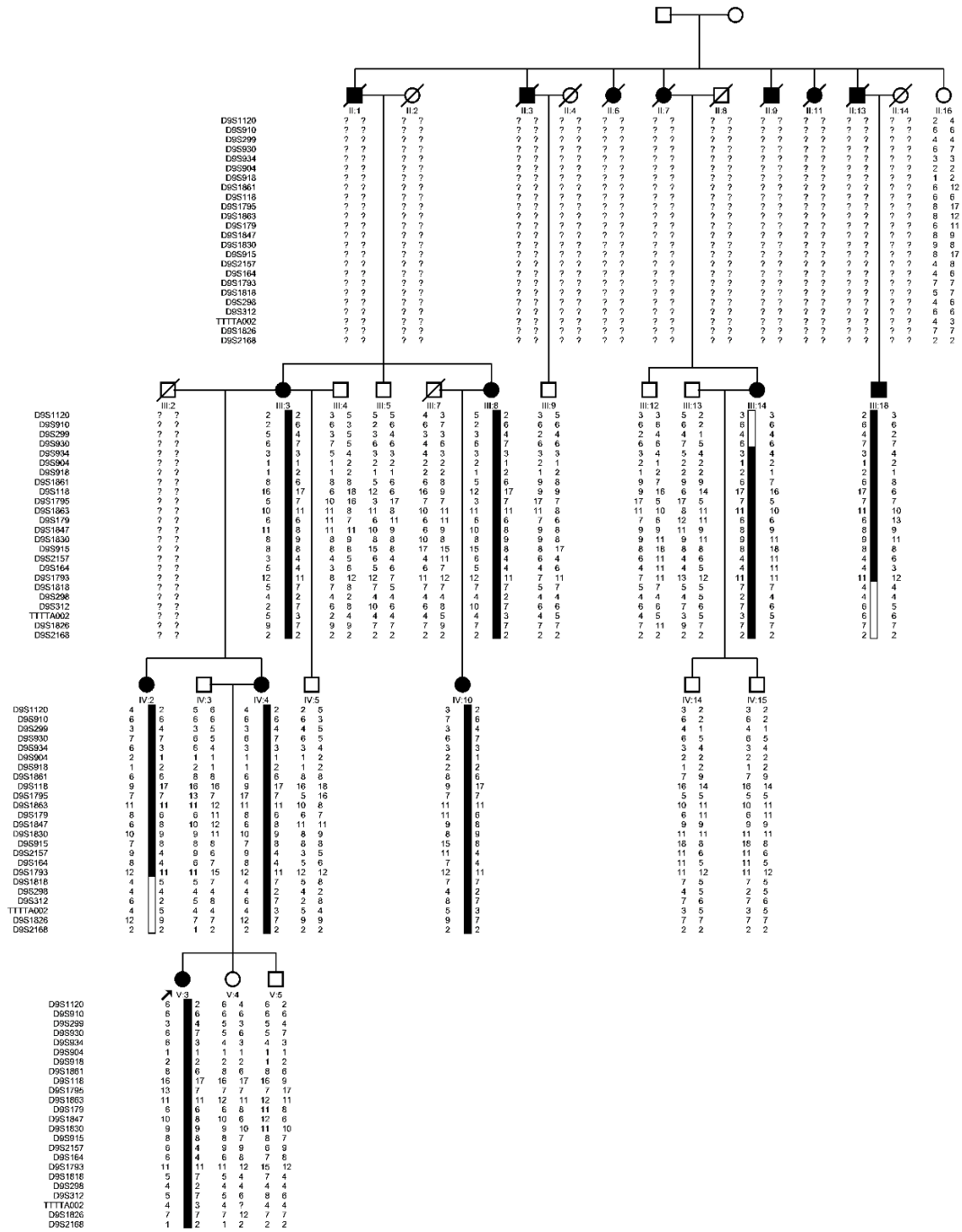


Figure V.8

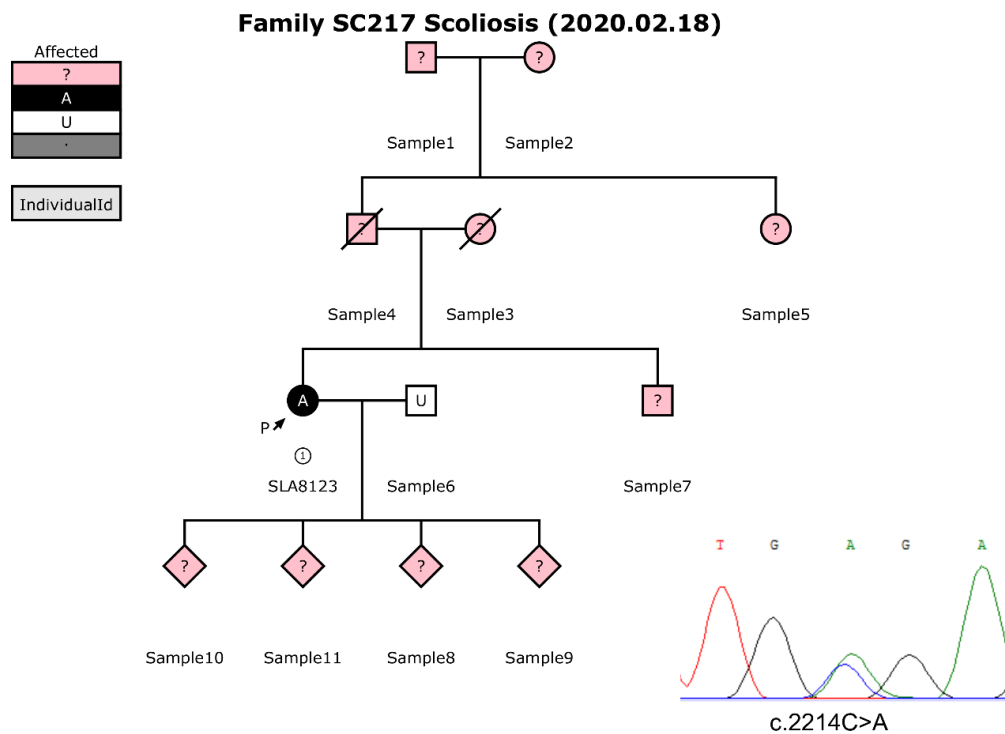
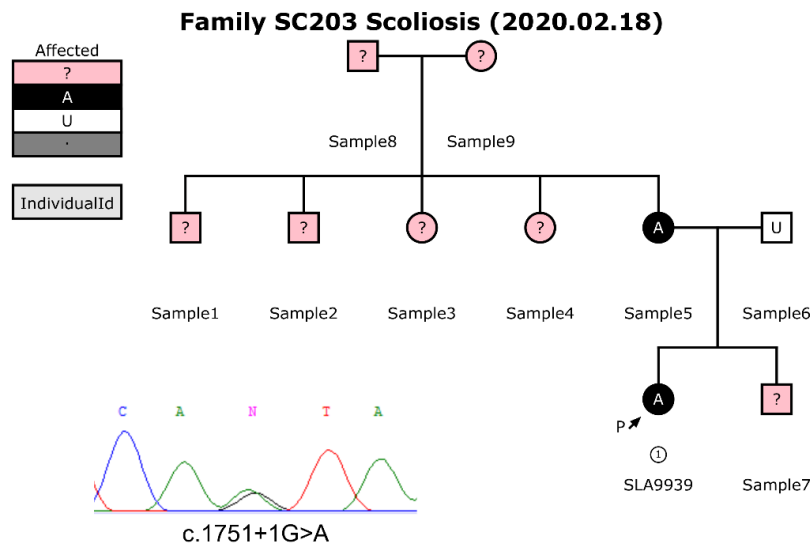
V.11. Supplementary Data



Supplementary Figure V.1. Cosegregation of the 9q31.2-q34.2 Locus With AIS in SC32 Family.

Linkage analysis identify the 9q31.2-q34.2 locus as a candidate region for AIS as it perfectly cosegregate with the disease for the entire 5-generation family. Open circles and squares

indicate unaffected individuals. Blackened circles and squares indicate affected females and males, respectively. The arrows indicate family proband.



Supplementary Figure V.2. Pedigree of UK Family SC203 and SC217 in Which Putative Gene Mutations Has Been Found.

Open circles and squares indicate unaffected individuals. Blackened circles and squares indicate affected females and males respectively. The arrows indicate family proband.

Chromatograms show the sequence obtained by Sanger sequencing of gDNA from both proband.

Variant GRCh37 Pos	rs ID	Alleles	EA Allele #	EA Genotype #	MAF (%)	Avg. Sample Read Depth	Genes	mRNA Accession #	GVS Function	cDNA Change	Protein Change	Conservation (GERP)	PolyPhen2 (Class:Score)
9:124584920	unknown	R>A1	A1=4/R=4648	A1A1=1/A1R=2/RR=2323	0.086	6	TLL11	NM_001139442.1	frameshift	c.2348_2349insC	p.(P784Tfs*8)	-9.97	unknown
9:124751407	rs148276492	G>A	A=1/G=8599	AA=0/AG=1/GG=4299	0.0116	54	TLL11	NM_194252.2	missense	c.1606C>T	p.(R536C)	0.08	benign:0.0
9:124751421	rs142846947	C>T	T=1/C=8599	TT=0/TC=1/CC=4299	0.0116	60	TLL11	NM_194252.2	missense	c.1592G>A	p.(R531K)	-0.14	benign:0.0
9:124751443	unknown	R>A1	A1=8/R=8246	A1A1=0/A1R=8/RR=4119	0.0969	72	TLL11	NM_194252.2	frameshift	c.1569_1570insTT	p.(P524Ffs*4)	-2.22	unknown
9:124751578	rs182367951	T>C	C=1/T=8599	CC=0/CT=1/TT=4299	0.0116	138	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.1435A>G	p.(I479V)	5.74	probably-damaging:0.986
9:124751632	rs367679783	T>C	C=1/T=8599	CC=0/CT=1/TT=4299	0.0116	104	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.1381A>G	p.(I461V)	3.42	benign:0.083
9:124751637	unknown	R>A1	A1=1/R=8253	A1A1=0/A1R=1/RR=4126	0.0121	99	TLL11	NM_001139442.1	frameshift	c.1375_1376insT	p.(S459Ffs*6)	5.74	unknown
9:124751681	rs149219458	G>T	T=1/G=8599	TT=0/TG=1/GG=4299	0.0116	92	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.1332C>A	p.(F444L)	-2.65	probably-damaging:0.997
9:124751733	rs199708627	C>T	T=1/C=8599	TT=0/TC=1/CC=4299	0.0116	93	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.1280G>A	p.(R427H)	1.97	benign:0.003
9:124751907	rs145379039	G>A	A=2/G=8598	AA=0/AG=2/GG=4298	0.0233	84	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.1106C>T	p.(A369V)	5.12	possibly-damaging:0.894
9:124751937	rs375201152	C>T	T=2/C=8598	TT=0/TC=2/CC=4298	0.0233	99	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.1076G>A	p.(R359H)	5.12	possibly-damaging:0.919
9:124751992	unknown	R>A1	A1=1/R=8253	A1A1=0/A1R=1/RR=4126	0.0121	125	TLL11	NM_001139442.1	frameshift	c.1020del1	p.(D341Mfs*57)	4.89	unknown
9:124794020	rs61740840	G>T	T=66/G=8534	TT=0/TG=66/GG=4234	0.7674	102	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.945C>A	p.(F315L)	4.6	benign:0.01
9:124794038	rs372169171	C>G	G=1/C=8599	GG=0/GC=1/CC=4299	0.0116	105	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.927G>C	p.(W309C)	5.51	probably-damaging:0.999
9:124794099	rs116884413	C>T	T=32/C=8568	TT=0/TC=32/CC=4268	0.3721	131	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.866G>A	p.(R289K)	5.51	benign:0.291
9:124801631	rs200141227	C>T	T=1/C=8599	TT=0/TC=1/CC=4299	0.0116	81	TLL11	NM_001139442.1	missense	c.749G>A	p.(R250H)	6.07	probably-damaging:0.999

Supplementary Table V.1. List of the Rare TLL11 SNPs Reported by EVS Database.

16 SNPs, single-nucleotide substitutions or small indels, with minor allele frequency <1%, were reported by the Exome Sequencing Project (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA) that regroup more than 6000 exomes from different Sequencing projects.

A

Chr	Start	End	Ref	Alt	Func.refgene	Gene.refgene	ExonicFunc.refgene	AChange.refgene	1000g2015aug	CADD_phred	avsnp150	MutationTaster_pred	UMD Score	UMD Prediction
9	124584495	124584495	G	A	UTR3	TTLL11	.	NM_001139442:c.*371C>T	0.0626997	.	rs7869045	.	NA	NA
9	124584560	124584560	T	C	UTR3	TTLL11	.	NM_001139442:c.*306A>G	0.0205671	.	rs139112986	.	NA	NA
9	124585055	124585055	G	T	exonic	TTLL11	stopgain	NM_001139442:exon9:c.2214C>A:p.C738X	.	38	rs766983167	D	100	Pathogenic
9	124632735	124632735	C	T	intronic	TTLL11	.	.	0.777955	.	rs4384052	.	NA	NA
9	124736287	124736287	C	T	splicing	TTLL11	.	NM_001139442:exon6:c.1751+1G>A	.	23.5	.	D	NA	NA
9	124751086	124751086	T	C	intronic	TTLL11	.	.	0.00698882	.	rs143880966	.	NA	NA
9	124751110	124751110	G	A	intronic	TTLL11	.	.	0.00159744	.	rs72765951	.	NA	NA
9	124751312	124751312	C	T	UTR3	TTLL11	.	NM_194252:c.*84G>A	0.0151757	.	rs55693486	.	NA	NA
9	124751361	124751361	A	C	UTR3	TTLL11	.	NM_194252:c.*35T>G	0.0830671	.	rs41277110	.	NA	NA
9	124751390	124751390	G	A	UTR3	TTLL11	.	NM_194252:c.*6C>T	0.0672923	.	rs41277112	.	NA	NA
9	124751443	124751443	-	AA	exonic	TTLL11	frameshift insertion	NM_194252:exon4:c.1569_1570insTT:p.P524fs	.	.	rs764409103	.	NA	NA
9	124794020	124794020	G	T	exonic	TTLL11	nonsynonymous SNV	NM_001139442;NM_194252:exon3:c.945C>A:p.F315L	0.0305511	22.8	rs61740840	D	21	Polymorphism
9	124855836	124855836	G	A	UTR5	TTLL11	.	NM_001139442;NM_194252:c.-139C>T	.	.	rs554511731	.	NA	NA

B

Chr	Start	End	Ref	Alt	Func.refgene	Gene.refgene	ExonicFunc.refgene	AChange.refgene	1000g2015aug_all	CADD_phred	avsnp150	MutationTaster_pred	UMD Score	UMD Prediction
9	124585055	124585055	G	T	exonic	TTLL11	stopgain	NM_001139442:exon9:c.2214C>A:p.C738X	.	38	rs766983167	D	100	Pathogenic
9	124736287	124736287	C	T	splicing	TTLL11	.	NM_001139442:exon6:c.1751+1G>A	.	23.5	.	D	NA	NA
9	124751443	124751443	-	AA	exonic	TTLL11	frameshift insertion	NM_194252:exon4:c.1569_1570insTT:p.P524fs	.	.	rs764409103	.	NA	NA
9	124794020	124794020	G	T	exonic	TTLL11	nonsynonymous SNV	NM_001139442;NM_194252:c.-139C>T	0.0305511	22.8	rs61740840	D	21	Polymorphism

Supplementary Table V.2. List of the SNPs Identified by AmpliSeq in *TTLL11* Gene From a French-Canadian and British AIS Population.

13 SNPs were reported prior any filtering. B. After filtering: MAF < 1%, single-nucleotide substitutions and small indels, 4 SNPs were selected.

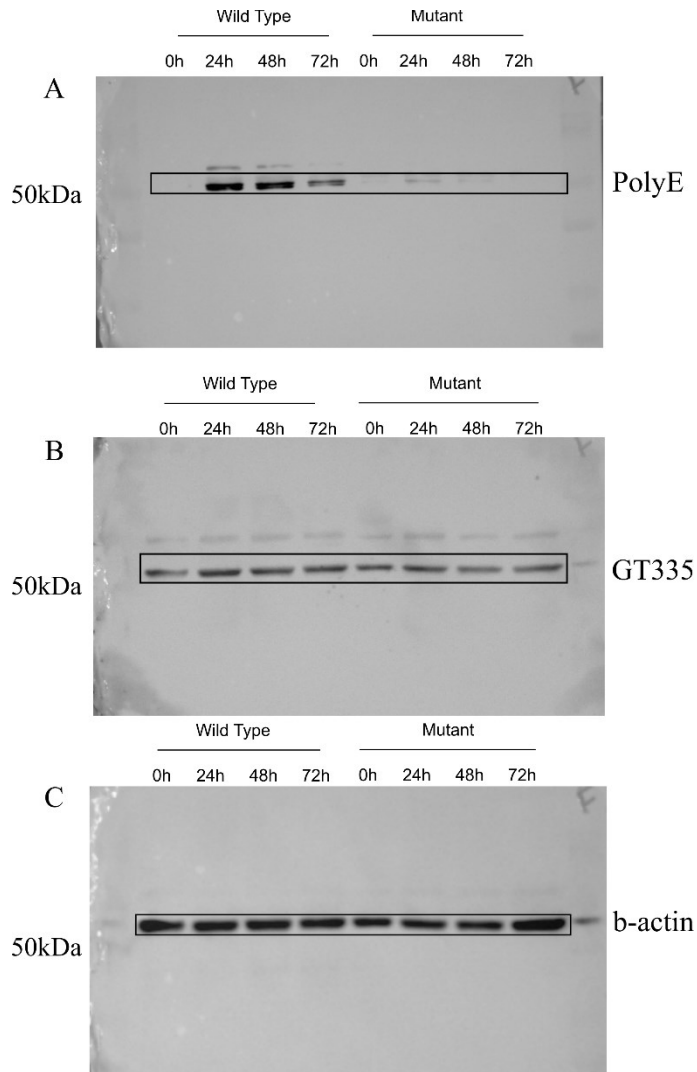
Subject	Cobb angle at diagnosis (°)	Type of curve	Treatment
			Jacket for 6 months – 1 year
III: 3	9/6/0 Scoliometer	Thoracic	Back board up to 2 years
III: 8	6/7/5 Scoliometer	Thoracolumbar	Exercise
III: 14	-	-	Back board from birth to 2 years old
III: 18	-	-	None
IV: 2	7/7/4 Scoliometer	Thoracolumbar	Exercise and brace age 13 - 16 years old
IV: 4	6/10/4 Scoliometer	Thoracolumbar	None
IV:6	5/8/3 Scoliometer	Thoracolumbar	Exercise and physiotherapy
IV: 10	5/8/3 Scoliosis	-	Exercise and Physiotherapy
V: 3 Proband	38	Thoracolumbar	Brace 8 - 12 years, spinal fusion surgery age 13 years old
SC203	NK	NK	None
SC217	NK	NK	Surgery

Supplementary Table V.3. Clinical Data of Affected Female Members of IS Patients From Family SC32, Patient SC203 and SC217 (Ocaña et al., 2008)

Table showing clinical information for affected female members of family SC32 in three generations with an average of three members affected in each generation, patient SC203 and SC217. Higher Cobb angle value indicates a greater curve, and thus severity of AIS. Three measurements were taken using scoliometer, as Thoracic, Thoracolumbar and lumbar level in forward bending position.

qPCR primers for <i>TLL11</i> detection	
TLL11-201-F (transcript variant 1 specific)	5' – GGA CT CAGGGATGTGTCTGC – 3'
TLL11-201-R (transcript variant 1 specific)	5' – GGTGGTACTCGCAAAGGTCA – 3'
TLL11-t2-F (transcript variant 2 specific)	5' – TGCACCGCATCTTTATGCAC – 3'
TLL11-t2-R (transcript variant 2 specific)	5' – GCAATGGTTACCTGGAAGCAC – 3'
GAPDH-FW	5' – ACCACAGTCCATGCCATCAC – 3'
GAPDH-RW	5' – TCCACCACCTGTTGCTGTA – 3'
Primers for PCR and sanger sequencing <i>TLL11</i> exon 4	
TLL11-FW1	5' – CAACTTCATCCACTCGGACA – 3'
TLL11-RV1	5' – CACAGCACCACCAACTG – 3'
Primers for HRM and sanger sequencing of zebrafish <i>ttl11</i> exon 4	
HRM-ttl11-F	5' – CCTGCTCATCGATAAACTCAAG – 3'
HRM-ttl11-R	5' – CCTGGACAAGCCTTCTTTAGC – 3'
SEQ-ttl11-F	5' – CGGACAGTGGATCCAAG – 3'
SEQ-ttl11-R	5' – CTGCAGCTGTCAGAGTGGAC – 3'

Supplementary Table V.4. qPCR Primers and PCR Primers for *TLL11* mRNA Detection and Sequencing Analysis Respectively.



Supplementary Figure V.3. Protein Polyglutamylation of Wild Type (DE0194) and Mutant (DE0193) Fibroblasts.

Cells were treated with medium without FBS for 0, 24, 48 and 72 hours analysed by western blot (GT335 (B) and PolyE (A) antibodies) reveal the loss of long polyglutamylate chains for the mutant DE0193 cells. (full blots)

Chapitre VI. Discussion

La SIA, la forme la plus fréquente de scoliose, est une maladie qui touche une très grande partie de la population et est diagnostiquée au cours d'une période cruciale de la vie, autant au niveau physique que psychologique : la puberté. C'est une maladie qui est massivement investiguée par la communauté scientifique, ce qui a permis l'acquisition de connaissances approfondies sur le côté clinique et l'évolution des technologies a permis le développement de traitements de pointe, par corset ou bien par chirurgie. De nombreux efforts ont aussi été mis dans les recherches fondamentales sur la SIA, ce qui a permis d'identifier de nombreuses théories concernant l'étiologie et la physiopathogenèse de la SIA. Malgré cela, aucune de ces théories n'est reproductible ou n'a pu être clairement démontrée semant ainsi la controverse. Ces constats nous permettent de statuer sur le fait que la SIA est une maladie très hétérogène et que de nombreux facteurs entrent en jeu, des facteurs génétiques/épigénétiques aux facteurs environnementaux, en passant par les facteurs biomécaniques et hormonaux.

Grâce au recrutement continu de familles atteintes de la SIA ([Annexe 1](#)), notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux facteurs génétiques, à l'implication des gènes ciliaires et du cil primaire dans la physiopathogenèse de la maladie. En effet, l'identification d'un premier gène ciliaire, *POC5*, a ouvert une nouvelle perspective selon laquelle le cil primaire défectueux serait l'évènement qui amorcerait les mécanismes de la mise en place de la SIA. L'identification d'un second gène ciliaire, le gène *TLL11* vient fortement supporter cette théorie selon laquelle la SIA pourrait être un sous-type de ciliopathie, fil conducteur de cette thèse.

Nous avons donc investigué la prévalence des trois variants du gène *POC5* qui avaient été identifiés la première fois dans une cohorte de patients d'origine française(137, 163), les variants p.(A429V), p.(A446T), et p.(A455P) ([Manuscrit 1](#)), ainsi que la prévalence du variant p.(Pro524PhefsTer4) du gène *TLL11* ([Manuscrit 3](#)), identifié dans une grande famille britannique, dans une cohorte de familles et de cas sporadiques de SIA d'origine franco-canadienne et britannique. Pour le gène *POC5*, les variants p.(A446T) et p.(A455T) ont été

décrits pour la première fois dans des familles atteintes de SIA, et le variant p.(A429V) a été observé chez des individus dont l'histoire familiale est inconnue(163). Un 4^{ème} variant (rs6892146) a été associé à la SIA dans une cohorte d'origine chinoise(191) dont l'histoire familiale des patients était inconnue. Notre étude a révélé une prévalence totale des variants du gène *POC5* de 14% chez les patients atteints de SIA de notre cohorte, correspondant à 7.5% pour le variant p.(A429V), 6.4% pour le variant p.(A446T), et 0% pour les variants p.(A455P) et rs6892146. Nous avons pu observer que ces variants étaient retrouvés autant chez les patients atteints de SIA familiale que chez les cas sporadiques. De plus, nous avons observé que les variants ne co-ségréguaient pas parfaitement dans les cas de SIA familiale. Il est à noter que la classification des patients dans la catégorie « cas sporadique » a été faite sur le témoignage de la famille (anamnèse). Les membres de la famille n'ont pas été examinés cliniquement et il n'y a pas eu d'investigation radiologique permettant de valider l'absence de déformation. Ainsi leur histoire familiale est incertaine. Cette prévalence place, à ce jour, le gène *POC5* comme étant le plus représenté chez les individus atteints de SIA et aucune corrélation avec le sexe des patients n'a pu être observée. C'est d'autant plus intéressant que ces trois mutations résultent toutes en une substitution d'alanine au niveau de la protéine codée par l'exon 10 par d'autres acides aminés de la même catégorie ou non (valine; proline ou thréonine). En effet, l'alanine est un acide aminé hydrophobe aliphatique tout comme la valine et la proline, tandis que la thréonine est un acide aminé hydrophile hydroxylé. Cependant l'alanine est le plus petit de ces quatre acides aminés, ces différentes mutations pourraient donc toutes être à l'origine d'une modification dans la structure de la protéine codée par l'exon 10 du gène *POC5*. Le fait que ces trois mutations se retrouvent dans la même région suggère que c'est une région importante pour la protéine et son altération induit un défaut dans sa fonctionnalité, comme cela a été démontré *in vitro* et *in vivo*. En effet, les travaux de notre laboratoire ont reporté un défaut de liaison de la protéine POC5 (variant p.(A429V)), avec ses partenaires protéiques et un défaut dans la localisation de la protéine au niveau cellulaire qui pourrait s'expliquer par une modification de la structure de la protéine(196). La protéine mutée (p.(A429V)) perd donc son habilité de liaison avec certaines protéines essentielles pour la fonction du cil primaire et l'organisation du cytosquelette cellulaire, menant à une rétraction du cil primaire. La

diminution de la taille du cil primaire dans les cellules provenant des patients atteints de SIA pourrait conduire à des défauts dans les voies de signalisation qu'abrite le cil primaire ou encore à une diminution de la sensibilité du cil primaire. Dans les deux cas, la réduction de la taille de cette organelle induirait notamment une perturbation de la différenciation des ostéoblastes au niveau des plaques de croissance des vertèbres. L'identification de ce défaut au niveau de la taille des cils primaires chez les individus atteints de SIA porteurs de mutations dans le gène *POC5* suggère donc que la SIA pourrait être considérée comme un sous-type de ciliopathie. Un sous-type car pendant très longtemps, cette maladie était décrite comme une maladie où seule la colonne vertébrale est affectée, alors que les ciliopathies regroupent des syndromes où plusieurs organes sont affectés. Cependant, de plus en plus de données plus ou moins récentes indiquent que la SIA pourrait être une maladie qui affecte d'autres tissus comme par exemple les yeux.

Des anomalies similaires au niveau des cils (localisation et diminution de la taille du cil primaire) ont été observées dans les cellules provenant des patients porteurs de mutation dans le gène *TLL11* ([Manuscrit 3](#)).

Le [manuscrit 3](#) décrit l'identification du gène *TLL11* dans une famille britannique atteinte de SIA sur 5 générations par la technique de séquençage du locus candidat qui avait précédemment été identifié par la technique d'analyse de liaison(135). La mutation identifiée engendre un codon STOP prématuré et donc une protéine tronquée. Le séquençage du gène *TLL11* dans notre cohorte de patients SIA franco-canadiens et britanniques n'a révélé aucun autre patient porteur de ce variant, mais nous a permis d'identifier deux autres SNPs rares (<1%) prédits comme étant pathogènes par les outils de prédiction de pathogénicité. Ces deux variants ont été identifiés chez deux patients britanniques, ce qui pourrait suggérer que les mutations dans ce gène sont spécifiquement associées à la population britannique.

Le criblage génétique de ces deux gènes ciliaires, *POC5* et *TLL11*, doit être élargi à des cohortes plus importantes afin de vérifier la prévalence des variants identifiés à l'échelle mondiale. Ceci nous permettrait d'analyser de potentielles associations, par exemple avec

l'âge d'apparition, la sévérité, le type de courbure, le sexe du patient et la zone géographique. En effet, les techniques de séquençage évoluent de manière exponentielle et malgré cela, les gènes identifiés comme étant associés à la scoliose sont en grande partie controversés car peu reproductibles, notamment du fait de la très forte hétérogénéité de la maladie et donc de la difficulté de reproduire deux cohortes exactement identiques. L'identification de ces deux gènes dans un premier temps dans de grandes familles atteintes de SIA avec une coségrégation parfaite des variants avec la maladie, et la caractérisation d'une prévalence de plus de 10% dans le cas des variants du gène *POC5* représentent une opportunité unique d'identifier pour la première fois un mécanisme biomoléculaire qui expliquerait le développement de la SIA. Une des limites dans la recherche de gène candidat est que l'on oublie souvent que cette maladie ne se développe qu'à partir de la puberté et ce critère est rarement pris en compte dans les filtres de sélection lors du tri des variants identifiés par séquençage de l'exome. En effet, l'expression génique est fortement modulée lors de cette période et le rôle de certains gènes pourrait donc être sous-estimé. Cependant, l'avancée des connaissances de la communauté scientifique sur l'épigénétique, l'exosome, la régulation de l'expression de gènes vont permettre de mieux prendre en compte ces paramètres dans les analyses génétiques de la SIA.

Suite à l'identification du gène candidat *TLL11*, nous avons investigué les effets de la mutation identifiée au niveau cellulaire. Pour cela nous avons eu accès à des fibroblastes issus de biopsies de peau d'un individu de la famille porteur de la mutation (DE0193) et d'un individu contrôle (DE0194). Ce type cellulaire n'est pas le plus adapté dans le cadre de l'étude de la SIA, cependant, les biopsies d'os sont beaucoup plus difficiles à obtenir, surtout si l'adolescent n'a pas subi de chirurgie (auquel cas il est possible d'obtenir une biopsie de vertèbre). Comme mentionné dans le [manuscrit 3](#), nous avons pu observer une perturbation de la transcription des deux transcrits du gène *TLL11* alors que la mutation identifiée impacte uniquement le transcrit 2. En effet, la mutation se trouve dans l'exon 4 du transcrit 2, qui fait partie d'un intron du transcrit 1. La transcription du transcrit 2 est diminuée, alors que la transcription du transcrit 1 est augmentée. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le transcrit 1 est plus

abondant afin de pallier la diminution du transcrit 2. Très peu d'information est disponible quant au rôle de chacun des transcrits du gène *TLL11*. Il existe deux hypothèses possibles qui sont : 1. Les défauts observés sont dus à la diminution de la quantité du transcrit 2; 2. Les défauts observés sont dus à l'augmentation de la quantité du transcrit 1. Dans les deux cas, l'insertion identifiée dans le gène *TLL11* entraîne un déséquilibre de l'expression de ses deux transcrits qui est associé à une diminution significative de l'activité de polyglutamylation au niveau du cil primaire. Nos études d'immunofluorescence et de western blot ont permis de mettre en évidence que la protéine TLL11 est requise dans l'initiation de la chaîne de glutamate et qu'elle assure le maintien du pool de longues chaînes de glutamate, nécessaire à la formation d'un cil primaire de taille normale. L'utilisation de l'anticorps anti-tubuline- α -acétylée est discutable du fait que la détection repose sur un autre type de modification post-traductionnelle (acétylation) de la tubuline et qu'il n'a jamais été exclu qu'il y ait des interactions entre les différentes enzymes assurant le « code tubuline ». Cependant, à ce jour, aucun autre substrat ni autre activité n'ont été identifiés pour la protéine TLL11 et des analyses d'immunofluorescence complémentaires utilisant l'anticorps anti-ARL13b (petite GTPase spécifique au cil primaire) ont confirmé les résultats publiés ([Annexe 2](#)). Similairement, un défaut de la taille des cils primaires avait été précédemment observé dans les ostéoblastes porteurs de mutations dans le gène *POC5*(196). Nous avons aussi observé un défaut dans la localisation, la protéine TLL11 sauvage est localisée dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme des fibroblastes, alors que la protéine mutée est retenue au niveau du noyau. Elle serait donc moins disponible pour se rendre au niveau du cil primaire et assurer son rôle. Un défaut de localisation a aussi été observé pour la protéine POC5 mutante en comparaison à la protéine contrôle. La protéine TLL11 localise à différents endroits de la cellule en fonction du type cellulaire, par exemple au niveau du cil primaire ou encore du corps basal(232, 234, 267), suggérant un rôle spécifique à chaque type cellulaire. Ceci pourrait justifier que le seul symptôme observé dans le cas de la SIA est la déformation de la colonne vertébrale plutôt qu'un syndrome touchant plusieurs organes. Une autre explication serait que l'expression différentielle d'autres protéines de la famille des TLLs selon le type cellulaire compenserait

les défauts du gène *TLL11* et limiterait ainsi les défauts dans ces tissus et les manifestations dans plusieurs organes.

De plus en plus de connaissances sont disponibles sur les différents rôles de la glutamylation et du cil primaire dans différents processus biologiques, notamment dans la formation de l'os. Cependant, les mécanismes en jeu sont encore flous et nécessitent plus d'investigation afin de faire le lien avec le développement de la SIA. En effet, une hypoglutamylation du cil primaire affecte notamment les voies de signalisations Hedgehog et de la polycystine qui sont deux voies majeures dans la formation et l'homéostasie de l'os. Elle entraîne une diminution de la translocation de GLI3, affectant la voie de signalisation Hedgehog (Indian (Ihh) et Sonic (Shh)), ainsi que la rétention de PKD1/2 au niveau de la membrane ciliaire, altérant la voie de la polycystine. La maladie induite par une hypoglutamylation de l'axonème du cil primaire la mieux décrite est le syndrome de Joubert, caractérisé par divers symptômes tels que des malformations du cerveau, des défauts de la rétine, du foie, des reins et du squelette. Ce syndrome peut être causé par des mutations dans différents gènes. Une mutation dans la protéine du centrosome CEP41 empêche l'accès de la protéine TLL6 dans le cil primaire, ce qui induit une hypoglutamylation(268). Un défaut dans la voie ARL13B-FIP5 empêche le recrutement de la protéine TLL5 au niveau du cil primaire entraînant une hypoglutamylation de l'axonème responsable du désassemblage de la tubuline et l'altération des voies de signalisation de la polycystine et de *Hh*(269).

Nous avons ensuite validé la fonctionnalité de la protéine TLL11 *in vivo*, chez le poisson zèbre, similairement à ce qui avait été fait pour le gène *POC5*. En effet, le gène *TLL11* fait partie de la famille des gènes ciliaires, tout comme le gène *POC5*. Nous avons validé la fonctionnalité du gène *ttl11* dans le développement de la colonne vertébrale du poisson zèbre, dans un premier temps par la technique de knock-down *via* l'injection d'un morpholino spécifique de l'ARNm du gène *ttl11*. Les larves de poissons zèbres ayant reçu le morpholino ont développé des déformations dans l'axe du corps, mais cette technique reste controversée quant à sa spécificité et toxicité. Nous avons donc ensuite procédé à la création d'une lignée de poissons zèbres mutante pour le gène *ttl11* grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Plusieurs ARNs guides

différents ciblant différents exons du gène ont été testés, cependant une seule mutation a pu être obtenue, une insertion de 18pb au niveau de l'exon 4 du gène *ttll11*. Cette mutation n'est pas un knock-out comme nous l'avions prévu, car elle n'engendre pas de codon STOP prématuré. Mais celle-ci induit la formation d'une protéine mutante, avec l'insertion de 6 acides aminés au sein du domaine TTL de la protéine ce qui affecte sa fonctionnalité. En effet, le gène *ttll11* fait partie de la famille des « tubulin tyrosin ligase like » et a pour rôle d'assurer la polyglutamylation de la tubuline alpha grâce à son domaine catalytique TTL. Ce domaine TTL est hautement conservé entre les différents membres de la famille des TTLs et des TTLs, et ce, au travers des différentes espèces. Ce domaine peut être divisé en deux régions : le « core TTL domain » qui est commun à tous les membres de la famille, et un domaine « extended TTL domain » qui est moins conservé. L'analyse de cette lignée mutante nous a permis d'observer des anomalies dans l'axe du corps des poissons zèbres, autant au stade de larve qu'au stade de poisson adulte, confirmant l'implication du gène *ttll11* dans le développement de la colonne vertébrale. Le gène *POC5* a été relié à la rétinite pigmentaire, les études préliminaires des poissons zèbres mutants pour ce gène ont révélé des défauts de la rétine, et un membre de la famille des TTLs (*TLL5*) a été associé à des dystrophies rétiniennes, c'est pourquoi nous avons investigué les rétines des poissons mutants pour le gène *ttll11*. Les analyses histologiques ainsi que les analyses d'immunohistochimie réalisées avec des anticorps spécifiques aux différents types cellulaires de la rétine ont mis en évidence un défaut dans l'organisation des couches de la rétine. La rétine est notamment composée de cellules photoréceptrices, qui sont des cellules sensorielles ultra spécialisées composées d'un segment interne et d'un segment externe reliés par un cil primaire modifié. Celui-ci est crucial dans la différenciation rétinienne, dans la prolifération et la survie des cellules progénitrices de la rétine. Des anomalies de l'œil sont associées à la scoliose progressive dans le cas notamment d'une maladie génétique rare, la paralysie du regard horizontale avec scoliose progressive (HGPPS)(124). Ce syndrome est caractérisé par une paralysie du regard horizontal, un nystagmus pendulaire et une scoliose progressive, mais est encore mal compris. Il est intéressant de noter que des nystagmus spontanés ou positionnels (réflexe vestibulo-oculaire qui témoigne d'une asymétrie vestibulaire) ont déjà été reportés chez des patients atteints de SIA(116, 117).

Les analyses fonctionnelles du gène *POC5* chez le poisson zèbre ont révélé que des mutations dans ce gène entraînaient des déformations de l'axe du corps accompagnées de défauts dans d'autres tissus comme la rétine. Dans le [manuscrit 2](#), nous avons donc créé des lignées de souris C57BL/6N porteuses de l'équivalent des variants retrouvés chez l'homme dans le gène *Poc5*. En effet, une première souris porteuse du variant p.A430T, équivalent du variant humain p.A446T, une lignée porteuse du variant p.A413V, équivalent du variant humain p.A429V. Le variant humain p.A455P n'ayant pas été retrouvé au sein de notre cohorte de patients ([manuscrit 1](#)), nous n'avons pas priorisé sa modélisation chez la souris. Cependant, nous avons créé la lignée de souris double mutante, porteuse des deux variants décrits précédemment. En effet, la souris est un modèle quadrupède, et aucun modèle de souris Knock-in pour la SIA n'a été décrit dans la littérature, nous avons postulé que l'effet de la combinaison des deux mutations pourrait être plus fort et donc engendrer un phénotype plus important. La condition bipède est désormais largement acceptée comme prérequis à la formation de la scoliose, c'est pourquoi l'absence de l'observation de déformation claire de la colonne vertébrale par radiographie, microCT, ou encore par dissection de nos souris âgées de 1 mois, donc au stade de puberté n'est pas surprenante. Cependant, l'analyse de la colonne vertébrale de souris plus âgées a révélé une cyphose pour la lignée de souris double mutant uniquement, venant renforcer notre hypothèse que la combinaison des deux mutations impacte plus fortement la fonctionnalité de la protéine *Poc5*. Afin d'analyser l'effet des variants dans le gène *POC5* au sein d'un organisme entier, il est nécessaire de recréer le maximum de conditions dans lesquelles se développe la SIA chez l'Homme. Une chirurgie afin de rendre ces lignées bipèdes est donc fortement envisagée pour la suite de ce projet de recherche, si les enjeux éthiques le permettent.

Une étude récente de Shi et al(270), a montré pour la première fois un lien entre le cil primaire et l'inhibition de la différenciation et minéralisation des ostéoblastes. En effet, les auteurs ont démontré que la microgravité inhibe la formation osseuse *via* la résorption du cil primaire. Le cil primaire serait donc capable de détecter la microgravité dans son environnement entraînant alors sa résorption suivie de la perturbation de l'attachement des MT à la base du

cil et la dépolymérisation des MT de la cellule. Ces perturbations au niveau du cytosquelette seraient à l'origine de la perturbation de la différenciation ostéogénique et de la minéralisation. Cette étude est très intéressante car elle est transposable avec nos recherches. En effet, nous avons montré que les cellules porteuses de mutations identifiées comme étant impliquées dans la SIA possédaient des cils plus courts que les cellules contrôles(196, 271), et cela a été confirmé par Oliazadeh et al(272). Les ostéoblastes issus des souris mutantes *Poc5* ont un potentiel de minéralisation plus faible que les cellules issues des souris contrôles, et il est largement connu que les patients atteints de SIA ont une plus faible densité osseuse(273). Il serait donc justifiable de penser que dans le cas de la SIA, les variants identifiés dans les gènes ciliaires entraînent un défaut dans la formation du cil primaire, et induisent une diminution de la différenciation ostéoblastique et du potentiel de minéralisation *via* des mécanismes identiques à une réaction à la microgravité(270). En effet, nous avons observé que les ostéoblastes issus des souris mutantes présentaient une altération de la ciliogenèse. Il est d'autant plus intéressant que dans nos cellules mutantes pour le gène *TLL11* nous avons observé un défaut de la polyglutamylation des MT de l'axonème, alors que la polyglutamylation, notamment *via* le *TLL11*, est reliée à la polymérisation/dépolymérisation des MT(234, 274). L'analyse du cytosquelette et des MT liés à la base du cil primaire devrait donc être réalisée afin de déterminer si le même phénomène se produit dans nos cellules mutantes pour le gène *POC5* ou le gène *TLL11*.

Parallèlement à l'étude des ostéoblastes issus des colonnes vertébrales de nos souris génétiquement modifiées, nous avons analysé les différents organes ciliaires afin de déterminer si des défauts étaient observables dans la structure et l'organisation générale de ces organes. L'analyse histologique du cœur, des poumons, des reins, et du cerveau grâce à la coloration hématoxyline éosine n'a pas révélé de défauts notables dans la structure générale de ces tissus par rapport aux organes extraits des souris contrôles. Des analyses d'immunofluorescence avec les anticorps correspondants doivent être réalisées afin de conclure définitivement, cependant, ces résultats sont en adéquation avec le phénotype clinique des patients atteints de SIA porteurs de variants dans le gène *POC5*. En effet, aucun

défaut dans ces organes n'a été observé chez les patients atteints de cette maladie. L'analyse histologique du foie a cependant révélé des inclusions lipidiques dans les hépatocytes des souris mutantes pour le gène *POC5* qui est similaire à la stéatose hépatique. Les souris mutantes et les souris contrôles ont été nourries avec la même diète, et ne présentaient aucun signe d'obésité. Ce phénomène a déjà été observé dans le cadre de différentes ciliopathies avec scoliose comme le syndrome d'Alström(275) et le syndrome de Bradet-Bield(276). La stéatose hépatique a été reliée à une résistance à l'insuline ainsi qu'à une diminution de la masse des muscles squelettiques(277-279), deux paramètres connus comme étant altérés chez les patients atteints de SIA. D'autres études ont montré un lien entre la stéatose hépatique et un déséquilibre dans la voie de la leptine, elle aussi altérée chez les patients atteints de SIA. De plus, l'accumulation de lipides dans les hépatocytes a été reliée à des défauts du gène *CELSR2*(280), essentiel à la ciliogenèse(281), qui a aussi été relié à la SI(282). Il est aussi intéressant de mentionner que le taux de Ca^{2+} cellulaire possède un impact sur l'accumulation de lipides au sein des hépatocytes, alors que le cil primaire possède sur sa membrane spécialisée des polycystines formant des canaux calciques. Enfin, l'analyse histologique des rétines des souris mutantes pour le gène *POC5* n'a pas révélé de défaut au niveau de l'organisation des différentes couches, ni de dégénération des couches des photorécepteurs. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons analysé les rétines de souris âgées de 1 mois, or les défauts décrits dans le cas de dystrophie ou dégénérescence de la rétine sont observés plus généralement autour de 6 mois. C'est pourquoi nos résultats n'excluent pas la possibilité que les souris mutantes pour le gène *POC5* développent des défauts au niveau de la rétine à un stade de développement plus avancé. De plus amples investigations doivent être menées afin d'analyser la rétine et de conclure définitivement si nos modèles de souris mutantes pour le gène *POC5* développent des défauts similaires à ceux que nous avons pu observer chez le poisson zèbre et qui concorderait avec la récente implication du gène *POC5* dans la rétinite pigmentaire. D'autre part, des études préliminaires de notre laboratoire ont permis d'établir un défaut similaire chez le poisson zèbre exprimant la protéine *POC5* humaine mutée. En effet, nous avons pu observer une diminution du segment externe des photorécepteurs de la rétine (données non publiées). Nous avons aussi

observé un possible défaut de la protéine POC5 au sein de l'oreille interne, mais des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de le confirmer. L'oreille interne abrite le système vestibulaire qui est connu comme étant impliqué dans la physiopathogenèse de la SIA. En effet, selon l'hypothèse stipulant que le gène *POC5* possède une fonction supplémentaire spécifique aux cils, une mutation à son niveau pourrait entraîner un défaut au niveau des cils senseurs du système vestibulaire entraînant alors une asymétrie de la voie vestibulo-spinale responsable de la déformation de la colonne vertébrale. Ces différentes observations suggèrent que le gène *POC5* muté serait impliqué dans des anomalies ciliaires à l'origine de la mise en place de la SIA. Des études plus approfondies doivent être menées sur ces modèles génétiques de souris afin de compléter ce schéma. La création de ces 3 lignées de souris représente un outil unique et de nombreuses expériences sont imaginables pour l'étude de cette maladie complexe qu'est la SIA et il serait intéressant de créer une lignée de souris mutantes pour le gène *Ttll11* et ainsi comparer les deux modèles génétiques de SIA.

Limites et Perspectives

Comme pour toutes expériences scientifiques, les travaux présentés dans cette thèse possèdent un certain nombre de limites.

Le phénotype/génotype des patients est un élément essentiel en génétique. Lors de l'examen clinique en orthopédie, au cours duquel se réalise le recrutement des patients et des familles, la recherche d'antécédents familiaux démontre certaines limites: le statut « scoliose » *versus* « absence de scoliose » se fait sur le témoignage des parents. En absence de radiographie, l'absence ou présence de déformation chez les membres de la famille des patients ne peut pas être certifiée. Puisque c'est une maladie qui apparaît à la puberté chez des patients sains auparavant et puisque la progression est imprévisible durant la croissance, le statut clinique pourrait changer au cours du temps. Cela affecterait la prévalence et les données sur l'héritabilité des variants génétiques rares.

Au niveau cellulaire, nous avons réalisé nos expériences dans des fibroblastes extraits de patients porteurs de la mutation identifiée dans le gène *TLL11*, et les cellules contrôles ont été extraites d'un individu de la même famille non porteur de la mutation. Cependant, pour cette maladie, le type cellulaire le plus adéquat serait des ostéoblastes ou encore des chondroblastes. L'accès à ces tissus est cependant limité aux patients ayant une scoliose traitée par chirurgie. Une autre option aurait été de transfecter ces types cellulaires avec un plasmide porteur de la mutation en question, cependant cette technique confère une surexpression transitoire de la protéine mutée, combinée avec l'expression de la protéine endogène. Il serait cependant intéressant de confirmer les résultats que nous avons obtenus dans des cellules osseuses génétiquement modifiées par la technique CRISPR-Cas9, mais cette technique peut engendrer des mutations non voulues, appelées « off target ». De plus, notre choix de cellules contrôles pourrait être discutable, mais nous nous sommes appuyés sur le fait que ces deux individus ont le patrimoine génétique le plus proche et que les différences observées sont dues uniquement à la mutation rare identifiée dans le gène *TLL11*.

Enfin, concernant nos modèles animaux, le modèle de poisson zèbre mutant pour le gène *TLL11* n'est pas un knockout comme nous l'aurions voulu, cependant il est porteur d'une mutation impactant le domaine catalytique de la protéine altérant sa fonction. Cependant, la possibilité que cette protéine interagisse avec d'autres partenaires n'est pas exclue. La limite majeure de nos modèles de souris mutantes pour le gène *POC5* est que ce sont des animaux quadrupèdes et non bipèdes, réduisant les chances d'observer des déformations de la colonne vertébrale. Afin de rendre les souris bipèdes, il est nécessaire de les exposer à des chirurgies jugées beaucoup trop invasives et délétères au bien-être de l'animal.

Malgré ces limites, les résultats présentés dans cette thèse représentent une avancée dans l'élucidation de l'étiologie de la SIA, et amènent un autre angle de vue à la maladie. En effet, analyser cette anomalie traduite par une déformation de la colonne vertébrale en la considérant comme un sous-type de ciliopathie est prometteur dans l'élucidation des mécanismes en jeu et ouvre tout un panel d'expérimentations qui nécessite d'être exploré.

Tout d'abord, afin de mieux caractériser la prévalence des variants du gène *POC5* et du gène *TLL11* dans la population atteinte de SIA, le recrutement de patients et le criblage de ces gènes doivent être poursuivis continuellement, dans des cohortes de populations variées. Dans cet objectif, des collaborations internationales sont en train de s'établir ou de se consolider. Dans le cas où ces deux gènes ne seraient pas porteurs de variants candidats, il est important de procéder au séquençage entier du génome afin d'identifier de nouveaux gènes candidats et de compléter le puzzle de la génétique de la SIA.

Au niveau cellulaire, il est essentiel d'identifier les voies de signalisation qui sont impactées par l'hypoglutamylation du cil primaire afin de retracer toute la cascade reliant le cil primaire à la déformation de la colonne vertébrale. En effet, l'étude de la littérature, notamment sur l'épigénétique et la génétique de la scoliose, suggère des pistes qui méritent d'être explorées. De plus, la caractérisation précise de la structure du cil primaire dans les cellules issues de patients atteints de SIA en comparaison avec des cellules contrôles en microscopie électronique devrait être réalisée afin de détecter d'éventuels défauts, notamment au niveau

des doublets de microtubules qui forment l'axonème. Le statut de la glutamylation du cil primaire devrait être analysé dans les cellules porteuses de variants dans le gène *POC5*. En effet, les travaux réalisés dans notre laboratoire, auxquels j'ai participé, ont montré une diminution de la taille des cils primaires, il serait donc important de déterminer s'ils présentent aussi un défaut de glutamylation. Pour aller plus loin dans l'analyse de la glutamylation chez le mammifère, un modèle de souris mutantes pour le gène *TLL11* devrait être créé.

D'un point de vue fonctionnel, la découverte de l'hypoglutamylation du cil primaire chez les individus atteints de SIA porteurs de mutation dans le gène *TLL11* représente l'opportunité de comprendre le rôle de l'estrogène et la somatomédine, deux hormones prépondérantes de la puberté, dans le développement de la maladie. En effet, il est largement accepté que ces hormones jouent un rôle non négligeable dans le développement de la SIA mais le mécanisme en jeu n'a pas encore été clairement établi. En effet, le cil primaire est sensible à l'œstrogène et il est connu que cette hormone module le potentiel ostéoclastogénique des ostéocytes *via* la voie Hedgehog(283). De plus, la somatomédine possède son récepteur sur la membrane du cil primaire confirmant sa capacité à détecter des variations de cette hormone dans l'environnement extracellulaire.

Chez nos souris mutantes, le phénotypage histologique et la glutamylation devraient être approfondis à différents stades de vie et en fonction du sexe. La caractérisation des cils primaires et de leur glutamylation devrait aussi être réalisée en immunohistochimie grâce à l'utilisation des anticorps correspondants. Un suivi du développement des colonnes vertébrales au cours de la puberté des souriceaux (25-35 et 45 jours de vie) devrait être réalisé afin de suivre l'évolution du développement de la colonne vertébrale des animaux mutés en comparaison aux animaux contrôles. De plus, nos lignées de souris mutantes et WT devraient être chirurgicalement rendues bipèdes afin de reproduire les charges mécaniques appliquées au niveau de la colonne vertébrale de l'Homme, très largement accepté comme étant requises dans le développement de la scoliose. Des analyses approfondies de la rétine devraient être réalisées afin de déterminer si les souris mutantes développent une dégénérescence précoce des photorécepteurs.

Enfin, chez les patients atteints de SIA, une analyse fonctionnelle de la rétine en lien avec le statut postural devrait être réalisée afin d'identifier d'éventuels défauts au niveau des photorécepteurs, comme nous avons pu l'observer dans les modèles de poissons mutants pour le gène *TLL11* et *POC5*.

Conclusion

Le travail présenté dans cette thèse a permis de mettre en évidence un nouvel aspect à la SIA et de décrire pour la première fois un phénomène fonctionnel qui permettrait de faire le lien entre un défaut génétique et le développement de la maladie. En effet la confirmation de l'implication du gène ciliaire *POC5* dans la SIA (*manuscrit 1 et 2*) et la découverte d'un second gène ciliaire, le gène *TTL11* dans une grande famille britannique (*manuscrit 3*) vient solidement supporter l'hypothèse que ces gènes ciliaires agissent sur les mécanismes cellulaires responsables de la mise en place de la SIA faisant d'elle une maladie appartenant à la grande famille des ciliopathies.

Dans le manuscrit 1, nous avons montré que les variants précédemment identifiés dans le gène *POC5* et fonctionnellement reliés à la déformation de la colonne vertébrale chez le poisson zèbre étaient retrouvés dans notre cohorte composée de patients franco-canadiens et britanniques avec une fréquence d'environ 14%. Cette prévalence fait donc du gène *POC5* le gène le plus représenté dans la population atteinte de SIA et vient fortement supporter l'importance du cil primaire dans la mise en place de la maladie. Ces résultats, combinés avec les travaux précédemment publiés par notre laboratoire notamment chez le poisson zèbre et au niveau cellulaire ont ouvert une piste de recherche originale que nous avons poursuivie au sein de notre laboratoire et au cours de mon doctorat.

En effet, dans le manuscrit 2, nous avons décrit la création de 3 lignées différentes de souris porteuses de l'équivalent de deux des variants *POC5* identifiés chez l'Homme, dont une lignée porteuse de la combinaison des deux variants. Le phénotypage des souris quadrupèdes à 1 mois n'a pas révélé de déformation majeure de la colonne vertébrale et l'analyse histologique des organes n'a montré un défaut qu'au niveau du foie où l'équivalent d'une stéatohépatite a pu être mise en évidence. Cependant, l'analyse des ostéoblastes issus des colonnes vertébrales a montré un défaut de prolifération et de différenciation de ces cellules. Ces résultats montrent une nouvelle fois que la condition bipède est un prérequis crucial dans le

développement de la déformation de la colonne vertébrale et que certains défauts semblent apparaître plus tard dans le développement de la souris.

Dans le manuscrit 3, nous avons identifié grâce à notre collaboration internationale avec l'équipe du Dr Anne Child de Londres (UK), un nouveau gène candidat dans une grande famille britannique atteinte de SI, le gène ciliaire *TLL11*. Les analyses chez le poisson zèbre ont confirmé l'implication de ce gène dans la déformation de la colonne vertébrale et nous ont permis de mettre en évidence son implication au niveau de l'organisation des couches de la rétine et notamment au niveau de la couche des cônes. Nos études *in vitro* nous ont permis de décrire pour la première fois un mécanisme reliant un gène candidat à la mise en place de la déformation de la colonne vertébrale, la polyglutamylation. En effet, les cellules mutantes présentent un plus faible de taux de glutamylation du cil primaire, induisant une réduction du nombre de cellules ciliées et de la taille du cil lorsqu'il est présent.

Pour conclure, le travail présenté dans cette thèse décrit l'implication de deux gènes ciliaires, *POC5* et *TLL11*, dans la mise en place de la déformation de la colonne vertébrale observée chez les patients atteints de SIA. Cependant, leur prévalence, bien que le gène *POC5* soit à ce jour le plus représenté dans cette population, ne représente qu'une petite partie des patients atteints de cette maladie et souligne une fois de plus la complexité et l'importante hétérogénéité génotypique. Nos résultats amènent des évidences solides que le cil primaire joue un rôle central dans le développement de cette maladie et que la polyglutamylation de la tubuline composant son axonème pourrait être le mécanisme en cause. La glutamylation a déjà été reliée à des anomalies du squelette ce qui renforce notre théorie, or d'autres analyses doivent être réalisées afin de déterminer les voies de signalisations qui entrent en jeu. De plus, les problèmes de perceptions de l'environnement et de l'équilibre observés chez les patients atteints de SIA sont encore très mal compris, et la piste du cil primaire pourrait être un élément clé dans la compréhension de ce phénotype, car il est essentiel dans le bon fonctionnement de la rétine et de l'organe sensoriel de l'oreille interne.

Nos résultats suggèrent donc que la SIA appartient à la grande famille des maladies génétiques rares que sont les ciliopathies. Cette famille de maladies regroupe des syndromes qui touchent plusieurs organes, c'est pourquoi la SIA serait un sous-type de ciliopathie se manifestant principalement par la déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale.

Références Bibliographiques

1. Carter DR. Mechanical loading history and skeletal biology. *J Biomech.* 1987;20(11-12):1095-109.
2. Rappaport EB, Snoy P, Habig WH, Bright RW. Effects of exogenous growth hormone on growth plate cartilage in rats. *Am J Dis Child.* 1987;141(5):497-501.
3. Trueta J, Amato VP. The vascular contribution to osteogenesis. III. Changes in the growth cartilage caused by experimentally induced ischaemia. *J Bone Joint Surg Br.* 1960;42-B:571-87.
4. Somerville EW. Rotational lordosis; the development of single curve. *J Bone Joint Surg Br.* 1952;34-B(3):421-7.
5. Cobb J. Technique for study of scoliosis. *AAOS Instructional Course Lectures.* 1948:261-75.
6. Kotwicki T, Chowanska J, Kinel E, Czaprowski D, Tomaszewski M, Janusz P. Optimal management of idiopathic scoliosis in adolescence. *Adolesc Health Med Ther.* 2013;4:59-73.
7. https://www.chusj.org/getmedia/a6687bea-b751-4860-814d-e62c09bef395/depliant_F-4715-Le-corset.pdf.aspx?ext=.pdf
8. Fadzani M, Bettany-Saltikov J. Etiological Theories of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Past and Present. *Open Orthop J.* 2017;11:1466-89.
9. KLEINBERG S. THE OPERATIVE TREATMENT OF SCOLIOSIS. *Archives of Surgery.* 1922;5(3):631-45.
10. James JJ. Idiopathic scoliosis; the prognosis, diagnosis, and operative indications related to curve patterns and the age at onset. *J Bone Joint Surg Br.* 1954;36-B(1):36-49.
11. Donzelli S, Zaina F, Lusini M, Minnella S, Negrini S. In favour of the definition "adolescents with idiopathic scoliosis": juvenile and adolescent idiopathic scoliosis braced after ten years of age, do not show different end results. SOSORT award winner 2014. *Scoliosis.* 2014;9:7.
12. Reamy BV, Slakey JB. Adolescent idiopathic scoliosis: review and current concepts. *Am Fam Physician.* 2001;64(1):111-6.
13. Sharma S, Gao X, Londono D, Devroy SE, Mauldin KN, Frankel JT, et al. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum Mol Genet.* 2011;20(7):1456-66.

14. Latalski M, Danielewicz-Bromberek A, Fatyga M, Latalska M, Krober M, Zwolak P. Current insights into the aetiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2017;137(10):1327-33.
15. Konieczny MR, Senyurt H, Krauspe R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop.* 2013;7(1):3-9.
16. Grivas TB, Vasiliadis E, Mouzakis V, Mihas C, Koufopoulos G. Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes. *Scoliosis.* 2006;1:9.
17. Hägglund G, Karlberg J, Willner S. Growth in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1992;17(1):108-11.
18. Miller NH. Cause and natural history of adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Clin North Am.* 1999;30(3):343-52, vii.
19. Fondation Yves Cotrel; <https://www.fondationcotrel.org/la-scoliose-idiopathique/>
20. Altaf F, Gibson A, Dannawi Z, Noordeen H. Adolescent idiopathic scoliosis. *BMJ.* 2013;346:f2508.
21. Driscoll M, Aubin C-E, Moreau A, Parent S. Biomechanical comparison of fusionless growth modulation corrective techniques in pediatric scoliosis. *Medical & Biological Engineering & Computing.* 2011;49(12):1437-45.
22. de Seze M, Cugy E. Pathogenesis of idiopathic scoliosis: a review. *Ann Phys Rehabil Med.* 2012;55(2):128-38.
23. Perez-Machado G, Berenguer-Pascual E, Bovea-Marco M, Rubio-Belmar PA, Garcia-Lopez E, Garzon MJ, et al. From genetics to epigenetics to unravel the etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Bone.* 2020;140:115563.
24. Normand E, Franco A, Moreau A, Marcil V. Dipeptidyl Peptidase-4 and Adolescent Idiopathic Scoliosis: Expression in Osteoblasts. *Sci Rep.* 2017;7(1):3173.
25. Khor EC, Wee NK, Baldock PA. Influence of hormonal appetite and energy regulators on bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2013;11(3):194-202.
26. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):854-9.
27. Villemure I, Stokes IA. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *J Biomech.* 2009;42(12):1793-803.

28. Cheung CS, Lee WT, Tse YK, Lee KM, Guo X, Qin L, et al. Generalized osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis--association with abnormal pubertal growth, bone turnover, and calcium intake? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(3):330-8.
29. Esposito T, Uccello R, Caliendo R, Di Martino GF, Gironi Carnevale UA, Cuomo S, et al. Estrogen receptor polymorphism, estrogen content and idiopathic scoliosis in human: a possible genetic linkage. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;116(1-2):56-60.
30. Kulis A, Gozdzińska A, Drag J, Jaskiewicz J, Knapik-Czajka M, Lipik E, et al. Participation of sex hormones in multifactorial pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop*. 2015;39(6):1227-36.
31. Raczkowski JW. The concentrations of testosterone and estradiol in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2007;28(3):302-4.
32. Peng Y, Liang G, Pei Y, Ye W, Liang A, Su P. Genomic polymorphisms of G-protein estrogen receptor 1 are associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop*. 2012;36(3):671-7.
33. Inoue M, Minami S, Nakata Y, Kitahara H, Otsuka Y, Isobe K, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(21):2357-62.
34. Wu J, Qiu Y, Zhang L, Sun Q, Qiu X, He Y. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(10):1131-6.
35. Dubousset J (1983) Experimental scoliosis induced by pineal and diencephalic lesions in young chickens: its relation with clinical findings. *Orthoped Trans* 7:7
36. Thillard MJ. [Vertebral column deformities following epiphysectomy in the chick]. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1959;248(8):1238-40.
37. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. *J Osteoporos*. 2010;2010:830231.
38. Machida M, Dubousset J, Yamada T, Kimura J. Serum melatonin levels in adolescent idiopathic scoliosis prediction and prevention for curve progression--a prospective study. *J Pineal Res*. 2009;46(3):344-8.
39. Sadat-Ali M, al-Habdan I, al-Othman A. Adolescent idiopathic scoliosis. Is low melatonin a cause? *Joint Bone Spine*. 2000;67(1):62-4.

40. Acaroglu E, Bobe R, Enouf J, Marcucio R, Moldovan F, Moreau A. The metabolic basis of adolescent idiopathic scoliosis: 2011 report of the "metabolic" workgroup of the Fondation Yves Cotrel. *Eur Spine J.* 2012;21(6):1033-42.
41. Machida M. Cause of idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1999;24(24):2576-83.
42. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, Kimura J. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomised chickens. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77(1):134-8.
43. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, Kimura J, et al. Pathogenesis of idiopathic scoliosis: SEPs in chicken with experimentally induced scoliosis and in patients with idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop.* 1994;14(3):329-35.
44. Man GC, Wang WW, Yim AP, Wong JH, Ng TB, Lam TP, et al. A review of pinealectomy-induced melatonin-deficient animal models for the study of etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):16484-99.
45. Pinchuk DY, Bekshaev SS, Bumakova SA, Dudin MG, Pinchuk OD. Bioelectric activity in the suprachiasmatic nucleus-pineal gland system in children with adolescent idiopathic scoliosis. *ISRN Orthop.* 2012;2012:987095.
46. Yang P, Liu H, Lin J, Yang H. The Association of rs4753426 Polymorphism in the Melatonin Receptor 1B (MTNR1B) Gene and Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pain Physician.* 2015;18(5):419-31.
47. Wang WW, Man GC, Wong JH, Ng TB, Lee KM, Ng BK, et al. Abnormal response of the proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes to melatonin in adolescent idiopathic scoliosis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):17100-14.
48. Bredoux R, Corvazier E, Dally S, Chaabane C, Bobe R, Raies A, et al. Human platelet Ca²⁺-ATPases: new markers of cell differentiation as illustrated in idiopathic scoliosis. *Platelets.* 2006;17(6):421-33.
49. Kindsfater K, Lowe T, Lawellin D, Weinstein D, Akmakjian J. Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(8):1186-92.
50. Lowe T, Lawellin D, Smith D, Price C, Haheer T, Merola A, et al. Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity? *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(7):768-75.
51. Wang Q, Wang C, Liu J, Sun J, Wang C, Zhang X. Plasma proteomics analysis of adolescent idiopathic scoliosis patients revealed by Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl.* 2021;15(4):e2100002.

52. Peng Y, Wang SR, Qiu GX, Zhang JG, Zhuang QY. Research progress on the etiology and pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(4):483-93.
53. Willner S, Nilsson KO, Kastrup K, Bergstrand CG. Growth hormone and somatomedin A in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Paediatr Scand*. 1976;65(5):547-52.
54. Yim AP, Yeung HY, Sun G, Lee KM, Ng TB, Lam TP, et al. Abnormal Skeletal Growth in Adolescent Idiopathic Scoliosis Is Associated with Abnormal Quantitative Expression of Melatonin Receptor, MT2. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):6345-58.
55. Hershkovich O, Friedlander A, Gordon B, Arzi H, Derazne E, Tzur D, et al. Association between body mass index, body height, and the prevalence of spinal deformities. *Spine J*. 2014;14(8):1581-7.
56. Zhuang QY, Wu ZH, Qiu GX. [Is polymorphism of CALM1 gene or growth hormone receptor gene associated with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis?]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007;87(31):2198-202.
57. Yang Y, Wu Z, Zhao T, Wang H, Zhao D, Zhang J, et al. Adolescent idiopathic scoliosis and the single-nucleotide polymorphism of the growth hormone receptor and IGF-1 genes. *Orthopedics*. 2009;32(6):411.
58. Burwell RG, Aujla RK, Grevitt MP, Dangerfield PH, Moulton A, Randell TL, et al. Pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis in girls - a double neuro-osseous theory involving disharmony between two nervous systems, somatic and autonomic expressed in the spine and trunk: possible dependency on sympathetic nervous system and hormones with implications for medical therapy. *Scoliosis*. 2009;4:24.
59. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111(3):305-17.
60. Qiu Y, Sun X, Qiu X, Li W, Zhu Z, Zhu F, et al. Decreased circulating leptin level and its association with body and bone mass in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(24):2703-10.
61. Liang G, Gao W, Liang A, Ye W, Peng Y, Zhang L, et al. Normal leptin expression, lower adipogenic ability, decreased leptin receptor and hyposensitivity to Leptin in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *PLoS One*. 2012;7(5):e36648.
62. Wang YJ, Yu HG, Zhou ZH, Guo Q, Wang LJ, Zhang HQ. Leptin Receptor Metabolism Disorder in Primary Chondrocytes from Adolescent Idiopathic Scoliosis Girls. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
63. Normand E, Franco A, Marcil V. Nutrition and physical activity level of adolescents with idiopathic scoliosis: a narrative review. *Spine J*. 2020;20(5):785-99.

64. Liang ZT, Guo CF, Li J, Zhang HQ. The role of endocrine hormones in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *FASEB J*. 2021;35(9):e21839.
65. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
66. Jiang H, Yang F, Lin T, Shao W, Meng Y, Ma J, et al. Asymmetric expression of H19 and ADIPOQ in concave/convex paravertebral muscles is associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. *Mol Med*. 2018;24(1):48.
67. Zhang HQ, Wang LJ, Liu SH, Li J, Xiao LG, Yang GT. Adiponectin regulates bone mass in AIS osteopenia via RANKL/OPG and IL6 pathway. *J Transl Med*. 2019;17(1):64.
68. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000;141(11):4255-61.
69. Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A. Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(4):1031-5.
70. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5992.
71. Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:518909.
72. Delhanty PJ, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. Ghrelin and bone. *Biofactors*. 2014;40(1):41-8.
73. Sales de Gauzy J, Gennero I, Delrous O, Salles JP, Lepage B, Accadbled F. Fasting total ghrelin levels are increased in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis*. 2015;10:33.
74. Yu HG, Zhang HQ, Zhou ZH, Wang YJ. High Ghrelin Level Predicts the Curve Progression of Adolescent Idiopathic Scoliosis Girls. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9784083.
75. Wang Q, Wang C, Hu W, Hu F, Liu W, Zhang X. Disordered leptin and ghrelin bioactivity in adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2020;15(1):502.
76. Liang ZT, Li J, Rong R, Wang YJ, Xiao LG, Yang GT, et al. Ghrelin up-regulates cartilage-specific genes via the ERK/STAT3 pathway in chondrocytes of patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;518(2):259-65.
77. Gomez R, Lago F, Gomez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009;60(6):1704-9.

78. Pradhan G, Samson SL, Sun Y. Ghrelin: much more than a hunger hormone. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(6):619-24.
79. Qu R, Chen X, Wang W, Qiu C, Ban M, Guo L, et al. Ghrelin protects against osteoarthritis through interplay with Akt and NF-kappaB signaling pathways. *FASEB J*. 2018;32(2):1044-58.
80. Xiao L, Zhang H, Wang Y, Li J, Yang G, Wang L, et al. Dysregulation of the ghrelin/RANKL/OPG pathway in bone mass is related to AIS osteopenia. *Bone*. 2020;134:115291.
81. Taylor JR. Scoliosis and growth. Patterns of asymmetry in normal vertebral growth. *Acta Orthop Scand*. 1983;54(4):596-602.
82. Machida M, Murai I, Miyashita Y, Dubousset J, Yamada T, Kimura J. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(19):1985-9.
83. Naique SB, Porter R, Cunningham AA, Hughes SP, Sanghera B, Amis AA. Scoliosis in an Orangutan. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(7):E143-5.
84. Dimeglio A, Bonnel F. *Le Rachis en croissance : scoliose, taille assise et puberté*. Paris; Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag; 1990.
85. Stokes IA, Dansereau J, Moreland MS. Rib cage asymmetry in idiopathic scoliosis. *J Orthop Res*. 1989;7(4):599-606.
86. Stokes IA. Mechanical effects on skeletal growth. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2(3):277-80.
87. Roaf R. The Treatment of Progressive Scoliosis by Unilateral Growth-Arrest. *J Bone Joint Surg Br*. 1963;45(4):637-51.
88. Xiong B, Sevastik JA, Hedlund R, Sevastik B. Radiographic changes at the coronal plane in early scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(2):159-64.
89. Cobetto, N. (2017). *Planification chirurgicale pour la correction 3D de la scoliose pédiatrique progressive à l'aide d'un dispositif sans fusion flexible* (Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal). Tiré de <https://publications.polymtl.ca/2627/>
90. Stokes IA, Spence H, Aronsson DD, Kilmer N. Mechanical modulation of vertebral body growth. Implications for scoliosis progression. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21(10):1162-7.
91. Arkin AM. The mechanism of the structural changes in scoliosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1949;31A(3):519-28.
92. Will RE, Stokes IA, Qiu X, Walker MR, Sanders JO. Cobb angle progression in adolescent scoliosis begins at the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(25):2782-6.

93. Brink RC, Schlosser TPC, Colo D, Vavruch L, van Stralen M, Vincken KL, et al. Anterior Spinal Overgrowth Is the Result of the Scoliotic Mechanism and Is Located in the Disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017;42(11):818-22.
94. Guo X, Chau WW, Chan YL, Cheng JC. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis. Results of disproportionate endochondral-membranous bone growth. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85(7):1026-31.
95. Hefti F. Pathogenesis and biomechanics of adolescent idiopathic scoliosis (AIS). *J Child Orthop*. 2013;7(1):17-24.
96. Porter RW. Idiopathic scoliosis: the relation between the vertebral canal and the vertebral bodies. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(11):1360-6.
97. Roth M. Idiopathic scoliosis caused by a short spinal cord. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1968;7(3):257-71.
98. BASSETT FHI. *Scoliosis and Other Deformities of the Axial Skeleton*: E. J. Riseborough and J. H. Herndon, 339 pages. Boston, Little, Brown & Company, 1975. 1976;184(3):62A.
99. Deng M, Hui SC, Yu FW, Lam TP, Qiu Y, Ng BK, et al. MRI-based morphological evidence of spinal cord tethering predicts curve progression in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine J*. 2015;15(6):1391-401.
100. Chu WC, Man GC, Lam WW, Yeung BH, Chau WW, Ng BK, et al. Morphological and functional electrophysiological evidence of relative spinal cord tethering in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(6):673-80.
101. Chu WC, Lam WW, Chan YL, Ng BK, Lam TP, Lee KM, et al. Relative shortening and functional tethering of spinal cord in adolescent idiopathic scoliosis?: study with multiplanar reformat magnetic resonance imaging and somatosensory evoked potential. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(1):E19-25.
102. Sevastik JA, Aaro S, Normelli H. Scoliosis. Experimental and clinical studies. *Clin Orthop Relat Res*. 1984(191):27-34.
103. Yang ZD, Li M. There may be a same mechanism of the left-right handedness and left-right convex curve pattern of adolescent idiopathic scoliosis. *Med Hypotheses*. 2011;76(2):274-6.
104. Tallroth K, Lohman M, Heliövaara M, Aromaa A, Knekt P, Standertskjöld-Nordenstam C-G. Dextrocardia and coronal alignment of thoracic curve: a population study. *European Spine Journal*. 2009;18(12):1941-5.

105. Cheng JC, Guo X, Sher AH, Chan YL, Metreweli C. Correlation between curve severity, somatosensory evoked potentials, and magnetic resonance imaging in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(16):1679-84.
106. Lee RK, Griffith JF, Leung JH, Chu WC, Lam TP, Ng BK, et al. Effect of upright position on tonsillar level in adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Radiol*. 2015;25(8):2397-402.
107. Shi L, Wang D, Hui SC, Tong MC, Cheng JC, Chu WC. Volumetric changes in cerebellar regions in adolescent idiopathic scoliosis compared with healthy controls. *Spine J*. 2013;13(12):1904-11.
108. Chau WW, Chu WC, Lam TP, Ng BK, Fu LL, Cheng JC. Anatomical Origin of Abnormal Somatosensory-Evoked Potential (SEP) in Adolescent Idiopathic Scoliosis With Different Curve Severity and Correlation With Cerebellar Tonsillar Level Determined by MRI. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016;41(10):E598-604.
109. Liu T, Chu WC, Young G, Li K, Yeung BH, Guo L, et al. MR analysis of regional brain volume in adolescent idiopathic scoliosis: neurological manifestation of a systemic disease. *J Magn Reson Imaging*. 2008;27(4):732-6.
110. Wang D, Shi L, Chu WC, Paus T, Cheng JC, Heng PA. A comparison of morphometric techniques for studying the shape of the corpus callosum in adolescent idiopathic scoliosis. *Neuroimage*. 2009;45(3):738-48.
111. Lee JS, Kim SJ, Suh KT, Kim IJ, Kim YK. Adolescent idiopathic scoliosis may not be associated with brain abnormalities. *Acta Radiol*. 2009;50(8):941-6.
112. Domenech J, Garcia-Marti G, Marti-Bonmati L, Barrios C, Tormos JM, Pascual-Leone A. Abnormal activation of the motor cortical network in idiopathic scoliosis demonstrated by functional MRI. *Eur Spine J*. 2011;20(7):1069-78.
113. Joly O, Rousie D, Jissendi P, Rousie M, Franko E. A new approach to corpus callosum anomalies in idiopathic scoliosis using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Eur Spine J*. 2014;23(12):2643-9.
114. Manzoni D, Miele F. Vestibular mechanisms involved in idiopathic scoliosis. *Arch Ital Biol*. 2002;140(1):67-80.
115. Rousie DL, Deroubaix JP, Joly O, Baudrillard JC, Berthoz A. Abnormal connection between lateral and posterior semicircular canal revealed by a new modeling process: origin and physiological consequences. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1164:455-7.
116. Sahlstrand T, Petruson B, Ortengren R. Vestibulospinal reflex activity in patients with adolescent idiopathic scoliosis. Postural effects during caloric labyrinthine stimulation recorded by stabilometry. *Acta Orthop Scand*. 1979;50(3):275-81.

117. Sahlstrand T, Petruson B. A study of labyrinthine function in patients with adolescent idiopathic scoliosis. I. An electro-nystagmographic study. *Acta Orthop Scand.* 1979;50(6 Pt 2):759-69.
118. Antoniadou N, Hatzitaki V, Stavridis S, Samoladas E. Verticality perception reveals a vestibular deficit in adolescents with idiopathic scoliosis. *Exp Brain Res.* 2018;236(6):1725-34.
119. Carry PM, Duke VR, Brazell CJ, Stence N, Scholes M, Rousie DL, et al. Lateral semi-circular canal asymmetry in females with idiopathic scoliosis. *PLoS One.* 2020;15(4):e0232417.
120. Fortin C, Pialasse JP, Knoth IS, Lippe S, Duclos C, Simoneau M. Cortical dynamics of sensorimotor information processing associated with balance control in adolescents with and without idiopathic scoliosis. *Clin Neurophysiol.* 2019;130(10):1752-61.
121. Lanthier J, Simoneau M, Knoth IS, Lippe S, Bluteau C, Fortin C. Increased EEG alpha peak frequency in adolescents with idiopathic scoliosis during balance control in normal upright standing. *Neurosci Lett.* 2020;722:134836.
122. Patten SA, Moldovan F. Could genetic determinants of inner ear anomalies be a factor for the development of idiopathic scoliosis? *Med Hypotheses.* 2011;76(3):438-40.
123. Anderson KL, Ding M. Attentional modulation of the somatosensory mu rhythm. *Neuroscience.* 2011;180:165-80.
124. Kurian M, Megevand C, De Haller R, Merlini L, Boex C, Truffert A, et al. Early-onset or rapidly progressive scoliosis in children: Check the eyes! *European Journal of Paediatric Neurology.* 2013;17(6):671-5.
125. Burwell RG, Dangerfield PH, Moulton A, Grivas TB. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: a molecular perspective of postnatal normal spinal growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy. *Scoliosis.* 2011;6(1):26.
126. Simony A, Carreon LY, Hjmark K, Kyvik KO, Andersen MO. Concordance Rates of Adolescent Idiopathic Scoliosis in a Danish Twin Population. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016;41(19):1503-7.
127. Faber A. Skoliose bei eineugen zwillingen. *Der Erbarzt.* 1935;2:102
128. Mongird-Nakonieczna J, Kozłowski B. [Functional and structural scoliosis in monozygotic twins]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol.* 1976;41(1):34-6.
129. Staub HA. Eine skoliotikerfamilie ein beitrag zur frage der kongenitalen skoliose und der hereditaet der skoliosen. 1922

130. Miller NH. Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;462:6-10.
131. Mongird-Nakonieczna J, Kozlowski B. [Familial occurrence of idiopathic scoliosis]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol.* 1976;41(2):161-5.
132. Cowell HR, Hall JN, MacEwen GD. Genetic aspects of idiopathic scoliosis. A Nicholas Andry Award essay, 1970. *Clin Orthop Relat Res.* 1972;86:121-31.
133. Ward K, Ogilvie J, Argyle V, Nelson L, Meade M, Braun J, et al. Polygenic inheritance of adolescent idiopathic scoliosis: a study of extended families in Utah. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(5):1178-88.
134. The Genetics and Development of Behavior. *Animal Behavior*1995. p. 77-118.
135. Ocaña L, Zhao C, Reed JA, Ebenezer ND, Brice G, Morley T, et al. Assignment of two loci for autosomal dominant adolescent idiopathic scoliosis to chromosomes 9q31.2-q34.2 and 17q25.3-qtel. *J Med Genet.* 2008;45(2):87-92.
136. Gurnett CA, Alaei F, Bowcock A, Kruse L, Lenke LG, Bridwell KH, et al. Genetic linkage localizes an adolescent idiopathic scoliosis and pectus excavatum gene to chromosome 18 q. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(2):E94-100.
137. Edery P, Margaritte-Jeannin P, Biot B, Labalme A, Bernard JC, Chastang J, et al. New disease gene location and high genetic heterogeneity in idiopathic scoliosis. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(8):865-9.
138. Chan V, Fong GC, Luk KD, Yip B, Lee MK, Wong MS, et al. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet.* 2002;71(2):401-6.
139. Raggio CL, Giampietro PF, Dobrin S, Zhao C, Dorshorst D, Ghebranious N, et al. A novel locus for adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 12p. *J Orthop Res.* 2009;27(10):1366-72.
140. Salehi LB, Mangino M, De Serio S, De Cicco D, Capon F, Semprini S, et al. Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet.* 2002;111(4-5):401-4.
141. Justice CM, Miller NH, Marosy B, Zhang J, Wilson AF. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(6):589-94.
142. Gao X, Gordon D, Zhang D, Browne R, Helms C, Gillum J, et al. CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *Am J Hum Genet.* 2007;80(5):957-65.

143. Mao SH, Qian BP, Shi B, Zhu ZZ, Qiu Y. Quantitative evaluation of the relationship between COMP promoter methylation and the susceptibility and curve progression of adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2018;27(2):272-7.
144. Shi B, Xu L, Mao S, Xu L, Liu Z, Sun X, et al. Abnormal PITX1 gene methylation in adolescent idiopathic scoliosis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19(1):138.
145. Shi B, Mao S, Xu L, Li Y, Sun X, Liu Z, et al. Quantitation Analysis of PCDH10 Methylation in Adolescent Idiopathic Scoliosis Using Pyrosequencing Study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2020;45(7):E373-E8.
146. Meng Y, Lin T, Liang S, Gao R, Jiang H, Shao W, et al. Value of DNA methylation in predicting curve progression in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *EBioMedicine.* 2018;36:489-96.
147. Liu G, Wang L, Wang X, Yan Z, Yang X, Lin M, et al. Whole-Genome Methylation Analysis of Phenotype Discordant Monozygotic Twins Reveals Novel Epigenetic Perturbation Contributing to the Pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:364.
148. Makki N, Zhao J, Liu Z, Eckalbar WL, Ushiki A, Khanshour AM, et al. Genomic characterization of the adolescent idiopathic scoliosis-associated transcriptome and regulome. *Hum Mol Genet.* 2021;29(22):3606-15.
149. Rajasekaran S, Tangavel C, Anand K, Soundararajan DCR, Nayagam SM, Sunmathi R, et al. Can Scoliotic Discs Be Controls for Molecular Studies in Intervertebral Disc Research? Insights From Proteomics. *Global Spine J.* 2020:2192568220959038.
150. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology.* 2012;8(4):212-27.
151. Arfat Y, Xiao WZ, Ahmad M, Zhao F, Li DJ, Sun YL, et al. Role of microRNAs in osteoblasts differentiation and bone disorders. *Curr Med Chem.* 2015;22(6):748-58.
152. Zhang J, Chen H, Leung RKK, Choy KW, Lam TP, Ng BKW, et al. Aberrant miR-145-5p/beta-catenin signal impairs osteocyte function in adolescent idiopathic scoliosis. *FASEB J.* 2018:fj201800281.
153. Yeh C-H, Jin L, Shen F, Balian G, Li XJ. miR-221 attenuates the osteogenic differentiation of human annulus fibrosus cells. *The Spine Journal.* 2016;16(7):896-904.
154. Penolazzi L, Lambertini E, Bergamin LS, Roncada T, De Bonis P, Cavallo M, et al. MicroRNA-221 silencing attenuates the degenerated phenotype of intervertebral disc cells. *Aging.* 2018;10(8):2001-15.

155. Liu H, Huang X, Liu X, Xiao S, Zhang Y, Xiang T, et al. miR-21 promotes human nucleus pulposus cell proliferation through PTEN/AKT signaling. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4007-18.
156. Hui S, Yang Y, Li J, Li N, Xu P, Li H, et al. Differential miRNAs profile and bioinformatics analyses in bone marrow mesenchymal stem cells from adolescent idiopathic scoliosis patients. *The Spine Journal.* 2019;19(9):1584-96.
157. García-Giménez JL, Rubio-Belmar PA, Peiró-Chova L, Hervás D, González-Rodríguez D, Ibañez-Cabellos JS, et al. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis. *Scientific Reports.* 2018;8(1):2646.
158. Zaydman AM, Strokova EL, A OS, Laktionov PP, Shevchenko AI, Subbotin VM. A New Look at Causal Factors of Idiopathic Scoliosis: Altered Expression of Genes Controlling Chondroitin Sulfate Sulfation and Corresponding Changes in Protein Synthesis in Vertebral Body Growth Plates. *Int J Med Sci.* 2019;16(2):221-30.
159. Liu XY, Wang L, Yu B, Zhuang QY, Wang YP. Expression Signatures of Long Noncoding RNAs in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:276049.
160. Zhuang Q, Ye B, Hui S, Du Y, Zhao RC, Li J, et al. Long noncoding RNA IncAIS downregulation in mesenchymal stem cells is implicated in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Cell Death Differ.* 2019;26(9):1700-15.
161. Zaydman AM, Strokova EL, Pahomova NY, Gusev AF, Mikhaylovskiy MV, Shevchenko AI, et al. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. *Med Hypotheses.* 2021;151:110585.
162. Gorman KF, Julien C, Moreau A. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2012;21(10):1905-19.
163. Patten SA, Margaritte-Jeannin P, Bernard JC, Alix E, Labalme A, Besson A, et al. Functional variants of POC5 identified in patients with idiopathic scoliosis. *J Clin Invest.* 2015;125(3):1124-8.
164. Oliazadeh N, Gorman KF, Eveleigh R, Bourque G, Moreau A. Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients. *Sci Rep.* 2017;7:44260.
165. Buchan JG, Gray RS, Gansner JM, Alvarado DM, Burgert L, Gitlin JD, et al. Kinesin family member 6 (kif6) is necessary for spine development in zebrafish. *Dev Dyn.* 2014;243(12):1646-57.

166. Jacquet BV, Salinas-Mondragon R, Liang H, Therit B, Buie JD, Dykstra M, et al. FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*. 2009;136(23):4021-31.
167. Hayes M, Gao X, Yu LX, Paria N, Henkelman RM, Wise CA, et al. ptk7 mutant zebrafish models of congenital and idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease. *Nat Commun*. 2014;5:4777.
168. Bin-Nun N, Lichtig H, Malyarova A, Levy M, Elias S, Frank D. PTK7 modulates Wnt signaling activity via LRP6. *Development*. 2014;141(2):410-21.
169. Peradziryi H, Kaplan NA, Podleschny M, Liu X, Wehner P, Borchers A, et al. PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J*. 2011;30(18):3729-40.
170. Shnitsar I, Borchers A. PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. *Development*. 2008;135(24):4015-24.
171. Grimes DT, Boswell CW, Morante NF, Henkelman RM, Burdine RD, Ciruna B. Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature. *Science*. 2016;352(6291):1341-4.
172. Caron A, Xu X, Lin X. Wnt/beta-catenin signaling directly regulates Foxj1 expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle. *Development*. 2012;139(3):514-24.
173. Baschal EE, Swindle K, Justice CM, Baschal RM, Perera A, Wetthey CI, et al. Sequencing of the TBX6 Gene in Families with Familial Idiopathic Scoliosis. *Spine Deform*. 2015;3(4):288-96.
174. Wardle FC, Papaioannou VE. Teasing out T-box targets in early mesoderm. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(5):418-25.
175. Hofmann M, Schuster-Gossler K, Watabe-Rudolph M, Aulehla A, Herrmann BG, Gossler A. WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev*. 2004;18(22):2712-7.
176. Hadjantonakis AK, Pisano E, Papaioannou VE. Tbx6 regulates left/right patterning in mouse embryos through effects on nodal cilia and perinodal signaling. *PLoS One*. 2008;3(6):e2511.
177. Concepcion D, Hamada H, Papaioannou VE. Tbx6 controls left-right asymmetry through regulation of Gdf1. *Biol Open*. 2018;7(5).
178. Makrythanasis P, Temtamy S, Aglan MS, Otaify GA, Hamamy H, Antonarakis SE. A novel homozygous mutation in FGFR3 causes tall stature, severe lateral tibial deviation, scoliosis, hearing impairment, camptodactyly, and arachnodactyly. *Hum Mutat*. 2014;35(8):959-63.

179. Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* 2015;29(14):1463-86.
180. Martin L, Kaci N, Estibals V, Goudin N, Garfa-Traore M, Benoist-Lasselain C, et al. Constitutively-active FGFR3 disrupts primary cilium length and IFT20 trafficking in various chondrocyte models of achondroplasia. *Hum Mol Genet.* 2018;27(1):1-13.
181. Kunova Bosakova M, Varecha M, Hampl M, Duran I, Nita A, Buchtova M, et al. Regulation of ciliary function by fibroblast growth factor signaling identifies FGFR3-related disorders achondroplasia and thanatophoric dysplasia as ciliopathies. *Hum Mol Genet.* 2018;27(6):1093-105.
182. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996;273(5275):613-22.
183. Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, et al. A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet.* 2011;43(12):1237-40.
184. Fan YH, Song YQ, Chan D, Takahashi Y, Ikegawa S, Matsumoto M, et al. SNP rs11190870 near LBX1 is associated with adolescent idiopathic scoliosis in southern Chinese. *J Hum Genet.* 2012;57(4):244-6.
185. Guo L, Yamashita H, Kou I, Takimoto A, Meguro-Horike M, Horike S, et al. Functional Investigation of a Non-coding Variant Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis in Zebrafish: Elevated Expression of the Ladybird Homeobox Gene Causes Body Axis Deformation. *PLoS Genet.* 2016;12(1):e1005802.
186. Cheng L, Samad OA, Xu Y, Mizuguchi R, Luo P, Shirasawa S, et al. Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci.* 2005;8(11):1510-5.
187. Schafer K, Neuhaus P, Kruse J, Braun T. The homeobox gene Lbx1 specifies a subpopulation of cardiac neural crest necessary for normal heart development. *Circ Res.* 2003;92(1):73-80.
188. Schmitteckert S, Ziegler C, Kartes L, Rolletschek A. Transcription factor lbx1 expression in mouse embryonic stem cell-derived phenotypes. *Stem Cells Int.* 2011;2011:130970.
189. Watanabe S, Matsushita S, Hayasaka M, Hanaoka K. Generation of a conditional null allele of Lbx1. *Genesis.* 2011;49(10):803-10.
190. Gao B. Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr Top Dev Biol.* 2012;101:263-95.

191. Xu L, Sheng F, Xia C, Li Y, Feng Z, Qiu Y, et al. Common Variant of POC5 Is Associated With the Susceptibility of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2018;43(12):E683-E8.
192. Le Guennec M, Klena N, Gambarotto D, Laporte MH, Tassin AM, van den Hoek H, et al. A helical inner scaffold provides a structural basis for centriole cohesion. *Sci Adv*. 2020;6(7):eaaz4137.
193. Azimzadeh J, Hergert P, Delouvee A, Euteneuer U, Formstecher E, Khodjakov A, et al. hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J Cell Biol*. 2009;185(1):101-14.
194. Dantas TJ, Daly OM, Conroy PC, Tomas M, Wang Y, Lalor P, et al. Calcium-binding capacity of centrin2 is required for linear POC5 assembly but not for nucleotide excision repair. *PLoS One*. 2013;8(7):e68487.
195. Chang CW, Hsu WB, Tsai JJ, Tang CJ, Tang TK. CEP295 interacts with microtubules and is required for centriole elongation. *J Cell Sci*. 2016;129(13):2501-13.
196. Hassan A, Parent S, Mathieu H, Zaouter C, Molidperee S, Bagu ET, et al. Adolescent idiopathic scoliosis associated POC5 mutation impairs cell cycle, cilia length and centrosome protein interactions. *PLoS One*. 2019;14(3):e0213269.
197. Weisz Hubshman M, Broekman S, van Wijk E, Cremers F, Abu-Diab A, Khateb S, et al. Whole-exome sequencing reveals POC5 as a novel gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*. 2018;27(4):614-24.
198. Cayouette M, Whitmore AV, Jeffery G, Raff M. Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci*. 2001;21(15):5643-51.
199. Ferkol TW, Leigh MW. Ciliopathies: the central role of cilia in a spectrum of pediatric disorders. *J Pediatr*. 2012;160(3):366-71.
200. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *Bioscience*. 2014;64(12):1126-37.
201. Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 4):499-503.
202. Ma M, Stoyanova M, Rademacher G, Dutcher SK, Brown A, Zhang R. Structure of the Decorated Ciliary Doublet Microtubule. *Cell*. 2019;179(4):909-22 e12.
203. Ichikawa M, Liu D, Kastritis PL, Basu K, Hsu TC, Yang S, et al. Subnanometre-resolution structure of the doublet microtubule reveals new classes of microtubule-associated proteins. *Nat Commun*. 2017;8:15035.

204. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187(6):921-33.
205. Yang J, Gao J, Adamian M, Wen XH, Pawlyk B, Zhang L, et al. The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol Cell Biol.* 2005;25(10):4129-37.
206. Kobayashi T, Dynlacht BD. Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol.* 2011;193(3):435-44.
207. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, et al. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 10):1785-95.
208. Yang WT, Hong SR, He K, Ling K, Shaiv K, Hu J, et al. The Emerging Roles of Axonemal Glutamylolation in Regulation of Cilia Architecture and Functions. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:622302.
209. Scholey JM. Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J Cell Biol.* 2008;180(1):23-9.
210. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):331-44.
211. Burke MC, Li FQ, Cyge B, Arashiro T, Brechbuhl HM, Chen X, et al. Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *J Cell Biol.* 2014;207(1):123-37.
212. Veleri S, Manjunath SH, Fariss RN, May-Simera H, Brooks M, Foskett TA, et al. Ciliopathy-associated gene *Cc2d2a* promotes assembly of subdistal appendages on the mother centriole during cilia biogenesis. *Nat Commun.* 2014;5:4207.
213. Insinna C, Besharse JC. Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors. *Dev Dyn.* 2008;237(8):1982-92.
214. Kuhara A, Okumura M, Kimata T, Tanizawa Y, Takano R, Kimura KD, et al. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science.* 2008;320(5877):803-7.
215. Christensen ST, Voss JW, Teilmann SC, Lambert IH. High expression of the taurine transporter TauT in primary cilia of NIH3T3 fibroblasts. *Cell Biol Int.* 2005;29(5):347-51.
216. Moorman SJ, Shorr AZ. The primary cilium as a gravitational force transducer and a regulator of transcriptional noise. *Dev Dyn.* 2008;237(8):1955-9.

217. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol*. 2001;184(1):71-9.
218. Nguyen AM, Jacobs CR. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes. *Bone*. 2013;54(2):196-204.
219. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*. 2003;426(6962):83-7.
220. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*. 2009;137(1):32-45.
221. Wallingford JB, Mitchell B. Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev*. 2011;25(3):201-13.
222. Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, Pazour GJ, Hoffmann EK, Satir P, et al. PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol*. 2005;15(20):1861-6.
223. Gaertig J, Wloga D. Ciliary tubulin and its post-translational modifications. *Curr Top Dev Biol*. 2008;85:83-113.
224. Wloga D, Joachimiak E, Louka P, Gaertig J. Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(6).
225. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(12):773-86.
226. Janke C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol*. 2014;206(4):461-72.
227. Konno A, Setou M, Ikegami K. Ciliary and flagellar structure and function--their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;294:133-70.
228. Yu I, Garnham CP, Roll-Mecak A. Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem*. 2015;290(28):17163-72.
229. Janke C, Rogowski K, van Dijk J. Polyglutamylolation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*. 2008;9(7):636-41.
230. Mahalingan KK, Keith Keenan E, Strickland M, Li Y, Liu Y, Ball HL, et al. Structural basis for polyglutamate chain initiation and elongation by TTL family enzymes. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(9):802-13.

231. Garnham CP, Vemu A, Wilson-Kubalek EM, Yu I, Szyk A, Lander GC, et al. Multivalent Microtubule Recognition by Tubulin Tyrosine Ligase-like Family Glutamylases. *Cell*. 2015;161(5):1112-23.
232. van Dijk J, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Edde B, Janke C. A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylolation. *Mol Cell*. 2007;26(3):437-48.
233. Kimura Y, Tsutsumi K, Konno A, Ikegami K, Hameed S, Kaneko T, et al. Environmental responsiveness of tubulin glutamylation in sensory cilia is regulated by the p38 MAPK pathway. *Sci Rep*. 2018;8(1):8392.
234. Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, et al. Tubulin polyglutamylolation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol*. 2010;189(6):945-54.
235. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol*. 2014;16(4):335-44.
236. Hong SR, Wang CL, Huang YS, Chang YC, Chang YC, Pusapati GV, et al. Spatiotemporal manipulation of ciliary glutamylation reveals its roles in intraciliary trafficking and Hedgehog signaling. *Nat Commun*. 2018;9(1):1732.
237. Yuan X, Serra RA, Yang S. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1335:78-99.
238. Tummala P, Arnsdorf EJ, Jacobs CR. The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment. *Cell Mol Bioeng*. 2010;3(3):207-12.
239. Bodle JC, Rubenstein CD, Phillips ME, Bernacki SH, Qi J, Banes AJ, et al. Primary cilia: the chemical antenna regulating human adipose-derived stem cell osteogenesis. *PLoS One*. 2013;8(5):e62554.
240. Yuan X, Yang S. Primary Cilia and Intraflagellar Transport Proteins in Bone and Cartilage. *J Dent Res*. 2016;95(12):1341-9.
241. Song B, Haycraft CJ, Seo HS, Yoder BK, Serra R. Development of the post-natal growth plate requires intraflagellar transport proteins. *Dev Biol*. 2007;305(1):202-16.
242. McGlashan SR, Haycraft CJ, Jensen CG, Yoder BK, Poole CA. Articular cartilage and growth plate defects are associated with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737orpk mice lacking the primary cilia protein polaris. *Matrix Biol*. 2007;26(4):234-46.

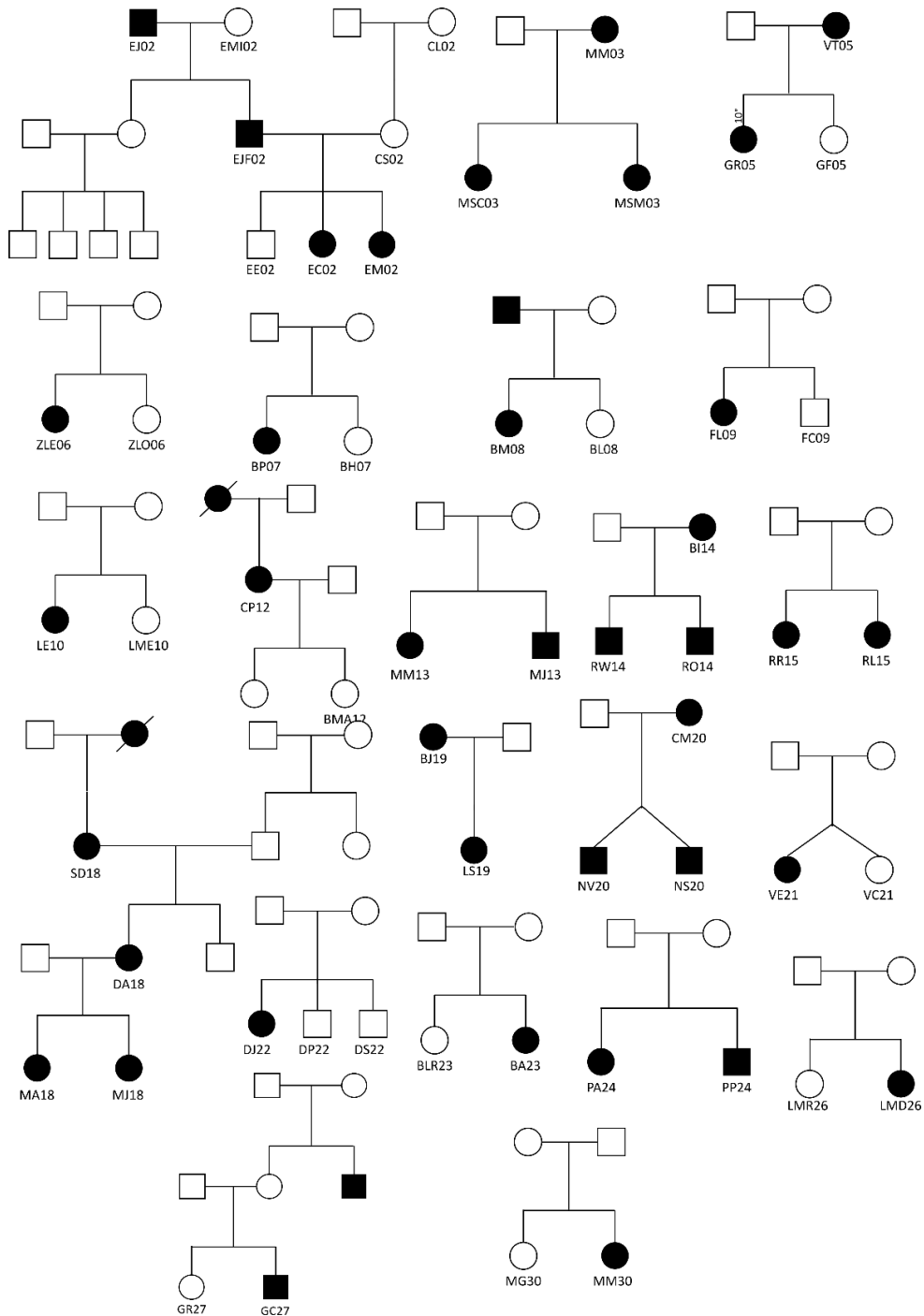
243. McGlashan SR, Knight MM, Chowdhury TT, Joshi P, Jensen CG, Kennedy S, et al. Mechanical loading modulates chondrocyte primary cilia incidence and length. *Cell Biol Int*. 2010;34(5):441-6.
244. Janssen MM, de Wilde RF, Kouwenhoven JW, Castelein RM. Experimental animal models in scoliosis research: a review of the literature. *Spine J*. 2011;11(4):347-58.
245. Ouellet J, Odent T. Animal models for scoliosis research: state of the art, current concepts and future perspective applications. *Eur Spine J*. 2013;22 Suppl 2:S81-95.
246. Langenskiold, Michelsson JE. Experimental progressive scoliosis in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:116-20.
247. Bobyn JD, Little DG, Gray R, Schindeler A. Animal models of scoliosis. *J Orthop Res*. 2015;33(4):458-67.
248. Alexander MA, Bunch WH, Ebbesson SO. Can experimental dorsal rhizotomy produce scoliosis? *J Bone Joint Surg Am*. 1972;54(7):1509-13.
249. Pincott JJS. Observations on the afferent nervous system in idiopathic scoliosis. 1979:45-59.
250. Deguchi M, Kawakami N, Kanemura T, Mimatsu K, Iwata H. Experimental scoliosis induced by rib resection in chickens. *J Spinal Disord*. 1995;8(3):179-85.
251. Robin GC, Stein H. Experimental scoliosis in primates. Failure of a technique. *J Bone Joint Surg Br*. 1975;57(2):142-5.
252. Thomas S, Dave PK. Experimental scoliosis in monkeys. *Acta Orthop Scand*. 1985;56(1):43-6.
253. Cheung KM, Wang T, Poon AM, Carl A, Tranmer B, Hu Y, et al. The effect of pinealectomy on scoliosis development in young nonhuman primates. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(18):2009-13.
254. Kim HK, Aruwajoye O, Sucato D, Richards BS, Feng GS, Chen D, et al. Induction of SHP2 deficiency in chondrocytes causes severe scoliosis and kyphosis in mice. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(21):E1307-12.
255. Henry SP, Liang S, Akdemir KC, de Crombrughe B. The postnatal role of Sox9 in cartilage. *J Bone Miner Res*. 2012;27(12):2511-25.
256. Settle SH, Jr., Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Dev Biol*. 2003;254(1):116-30.

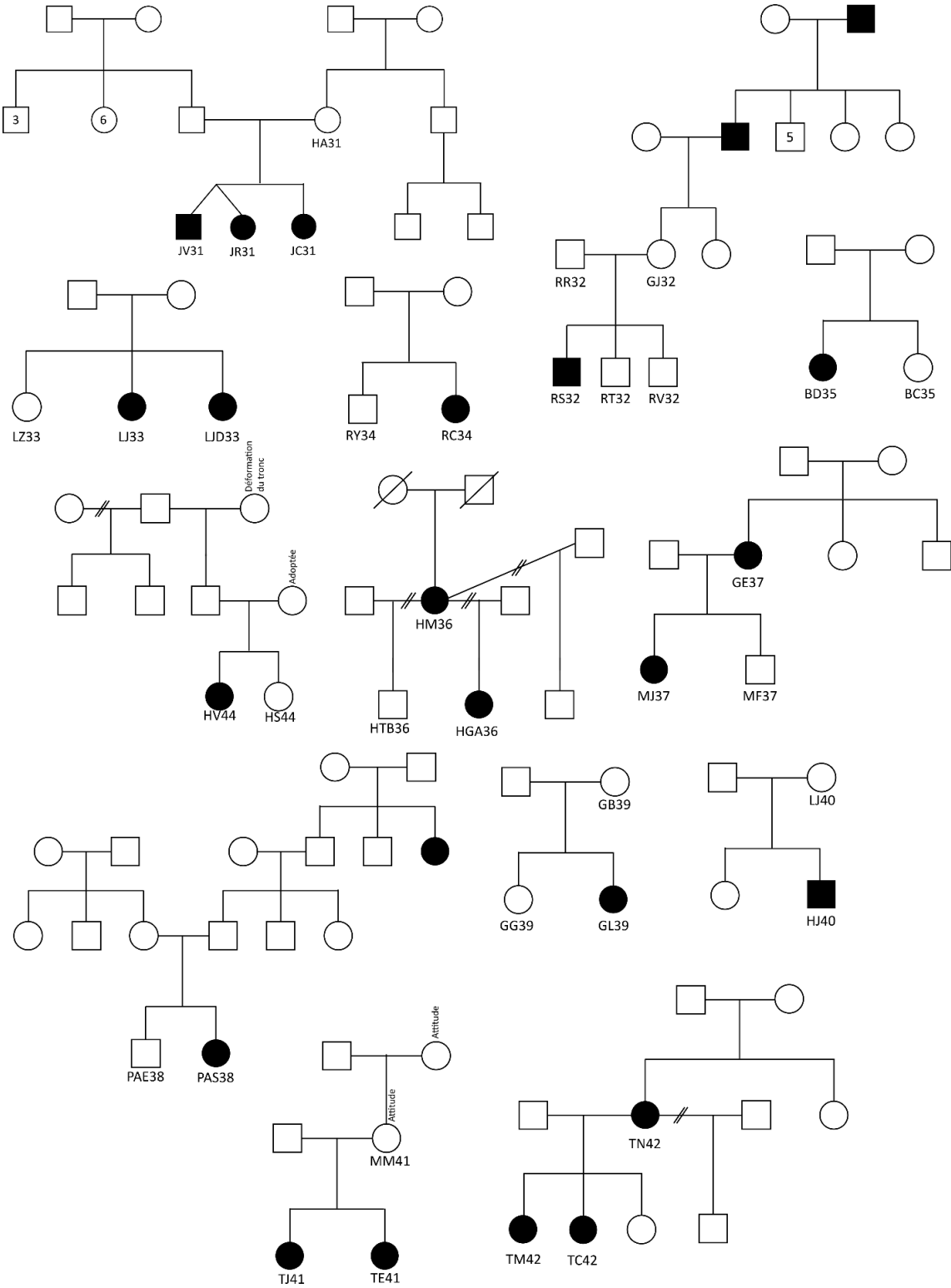
257. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996;84(6):911-21.
258. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 1996;12(4):390-7.
259. Karner CM, Long F, Solnica-Krezel L, Monk KR, Gray RS. Gpr126/Adgrg6 deletion in cartilage models idiopathic scoliosis and pectus excavatum in mice. *Hum Mol Genet*. 2015;24(15):4365-73.
260. Seok SH, Koo HC, Kasuga A, Kim Y, Lee EG, Lee H, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of zoonotic mycobacteriosis in zebrafish caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *Vet Microbiol*. 2006;114(3-4):292-7.
261. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.
262. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.
263. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct*. 2011;6:38.
264. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015;12(10):982-8.
265. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W242-W5.
266. Westerfield, M. *The zebrafish book A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* 4th edn. (Univ. of Oregon Press, XXX,2000).
267. O'Hagan R, Silva M, Nguyen KCQ, Zhang W, Bellotti S, Ramadan YH, et al. Glutamylation Regulates Transport, Specializes Function, and Sculpts the Structure of Cilia. *Curr Biol*. 2017;27(22):3430-41 e6.
268. Lee JE, Silhavy JL, Zaki MS, Schroth J, Bielas SL, Marsh SE, et al. CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nat Genet*. 2012;44(2):193-9.

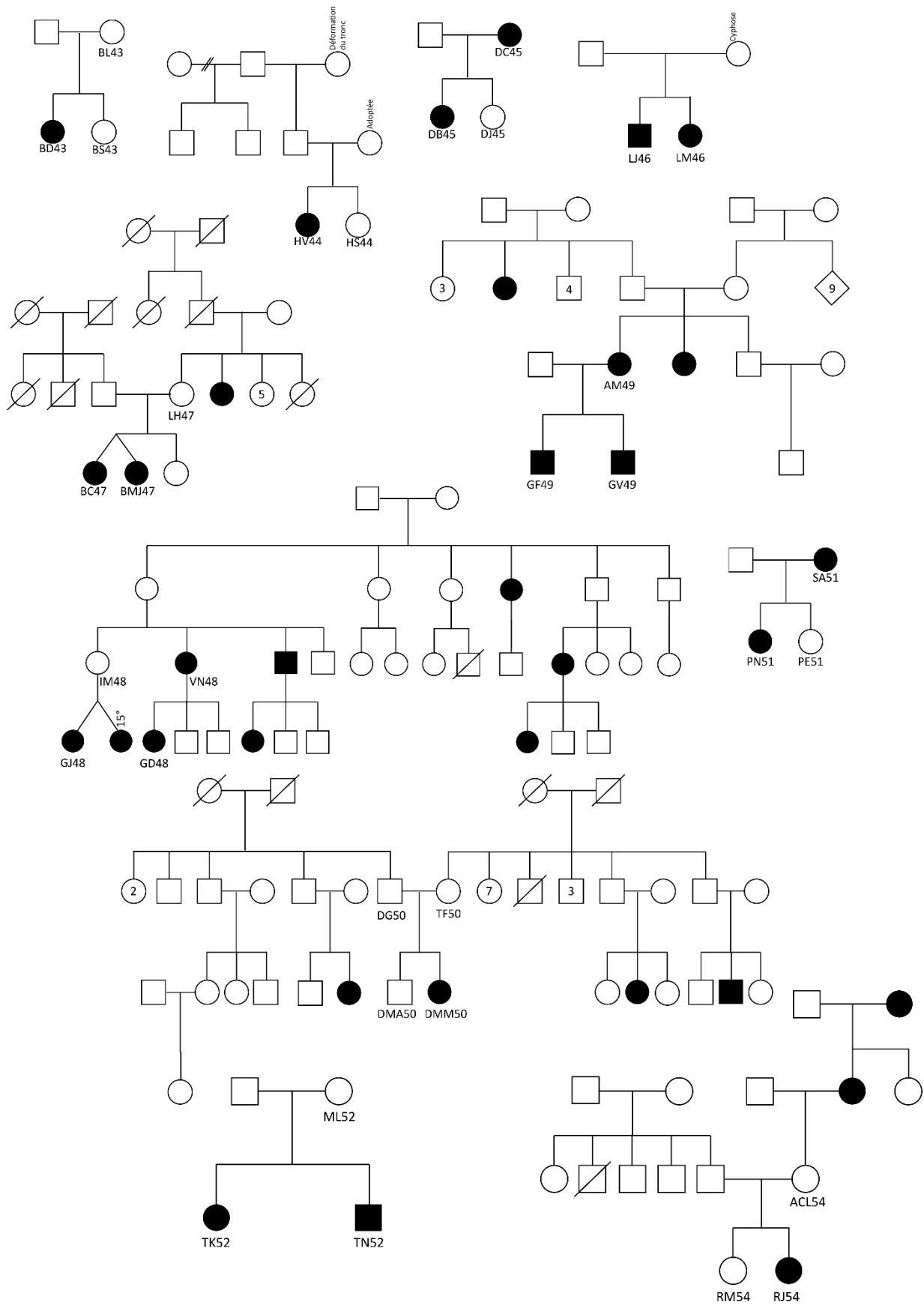
269. He K, Ma X, Xu T, Li Y, Hodge A, Zhang Q, et al. Axoneme polyglutamylation regulated by Joubert syndrome protein ARL13B controls ciliary targeting of signaling molecules. *Nat Commun.* 2018;9(1):3310.
270. Shi W, Zhang Y, Chen K, He J, Feng X, Wei W, et al. Primary cilia act as microgravity sensors by depolymerizing microtubules to inhibit osteoblastic differentiation and mineralization. *Bone.* 2020;136:115346.
271. Mathieu H, Patten SA, Aragon-Martin JA, Ocaka L, Simpson M, Child A, et al. Genetic variant of TLL11 gene and subsequent ciliary defects are associated with idiopathic scoliosis in a 5-generation UK family. *Scientific Reports.* 2021;11(1):11026.
272. Oliazadeh N, Gorman KF, Elbakry M, Moreau A. Altered mechanotransduction in adolescent idiopathic scoliosis osteoblasts: an exploratory in vitro study. *Sci Rep.* 2022;12(1):1846.
273. Diarbakerli E, Savvides P, Wihlborg A, Abbott A, Bergstrom I, Gerdhem P. Bone health in adolescents with idiopathic scoliosis. *Bone Joint J.* 2020;102-B(2):268-72.
274. Valenstein ML, Roll-Mecak A. Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation. *Cell.* 2016;164(5):911-21.
275. Ali ES, Girard D, Petrovsky N. Impaired Ca²⁺ signaling due to hepatic steatosis mediates hepatic insulin resistance in Alstrom syndrome mice that is reversed by GLP-1 analog treatment. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021;321(1):C187-C98.
276. Horiuchi K, Kogiso T, Sagawa T, Ito T, Tani M, Miura K, et al. Bardet-Biedl Syndrome Caused by Skipping of SCLT1 Complicated by Microvesicular Steatohepatitis. *Intern Med.* 2020;59(21):2719-24.
277. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010;52(5):1836-46.
278. Cai C, Song X, Chen Y, Chen X, Yu C. Relationship between relative skeletal muscle mass and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int.* 2020;14(1):115-26.
279. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology.* 2002;36(2):403-9.
280. Tan J, Che Y, Liu Y, Hu J, Wang W, Hu L, et al. CELSR2 deficiency suppresses lipid accumulation in hepatocyte by impairing the UPR and elevating ROS level. *Faseb j.* 2021;35(10):e21908.

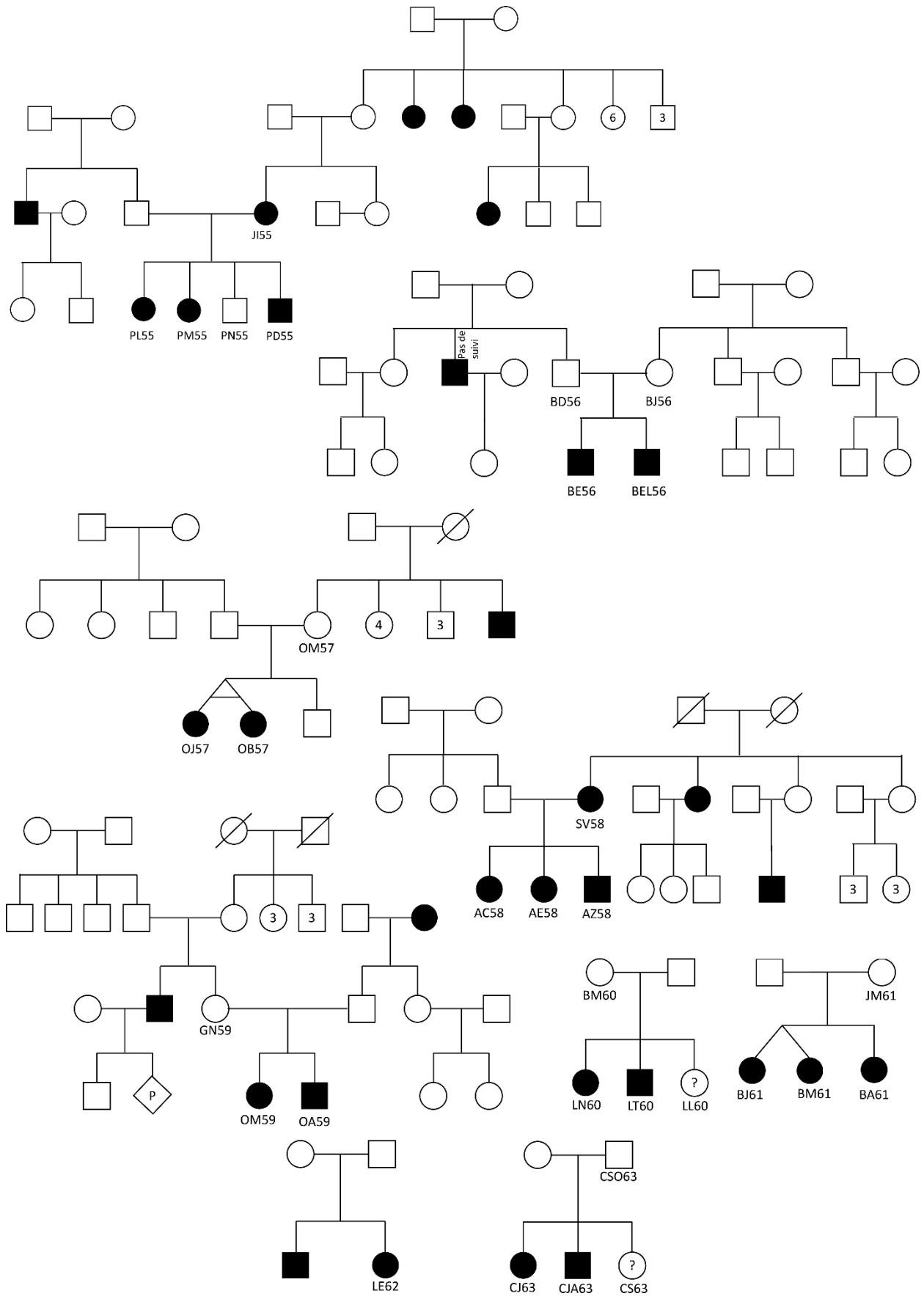
281. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, et al. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci.* 2010;13(6):700-7.
282. Einarsdottir E, Grauers A, Wang J, Jiao H, Escher SA, Danielsson A, et al. CELSR2 is a candidate susceptibility gene in idiopathic scoliosis. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189591.
283. Geoghegan IP, McNamara LM, Hoey DA. Estrogen withdrawal alters cytoskeletal and primary ciliary dynamics resulting in increased Hedgehog and osteoclastogenic paracrine signalling in osteocytes. *Sci Rep.* 2021;11(1):9272.

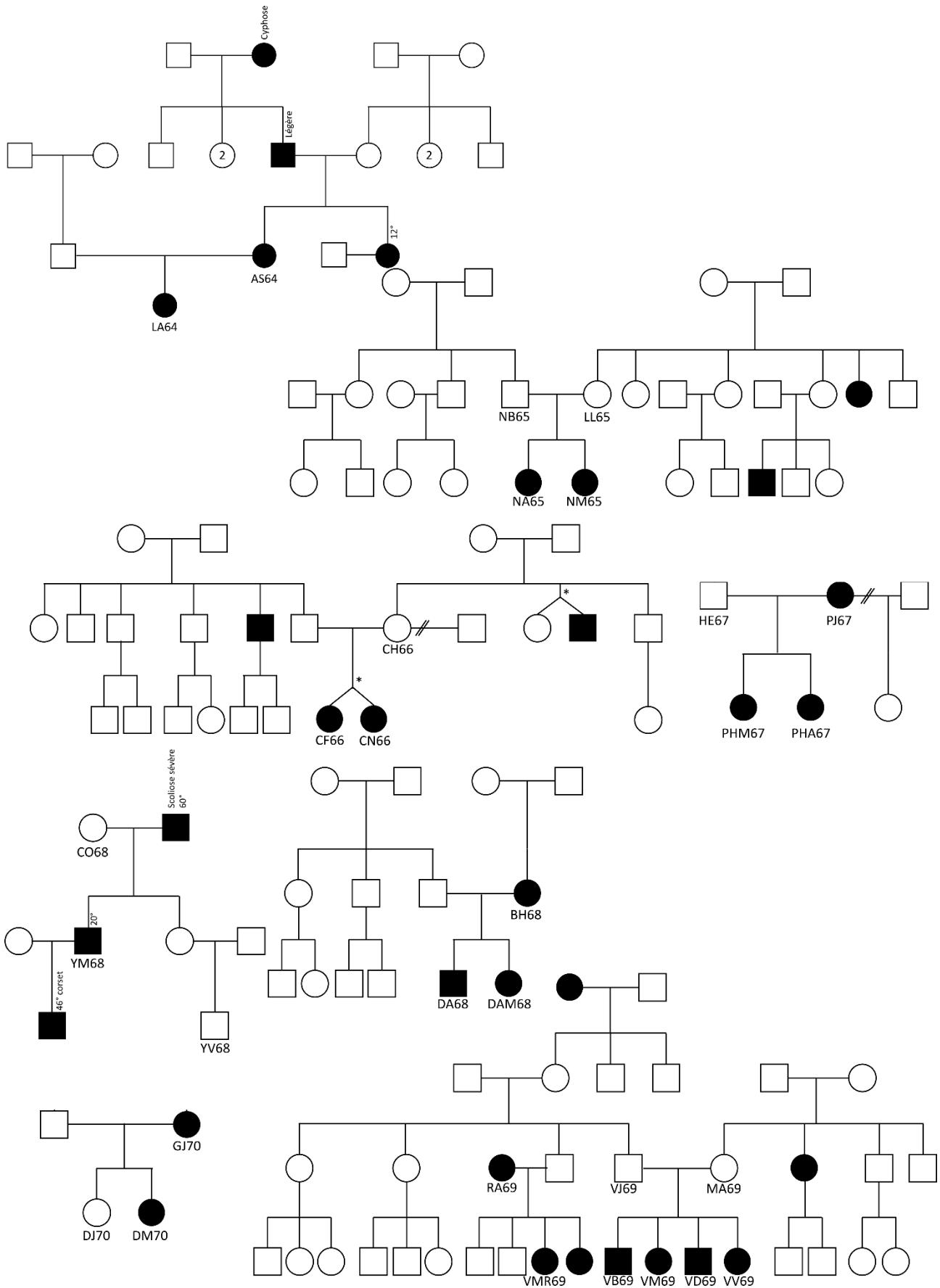
Annexe 1. Arbres généalogiques des familles atteintes de SIA recrutées par notre laboratoire en collaboration avec les médecins orthopédistes du CHU Sainte-Justine, QC

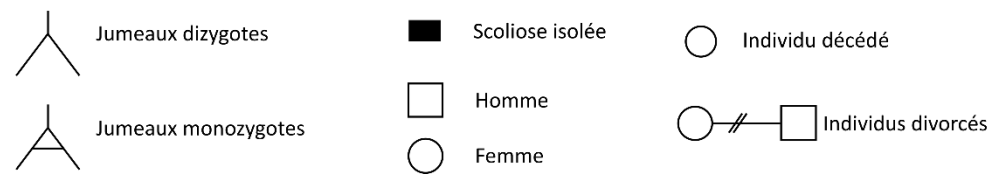
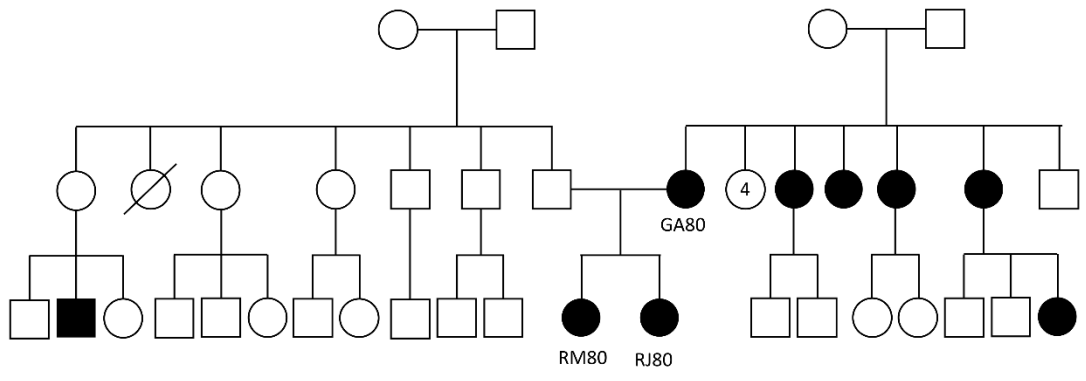
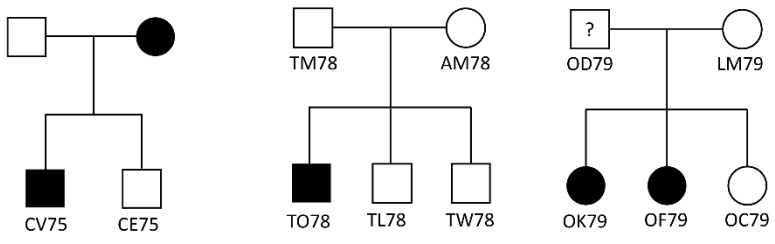
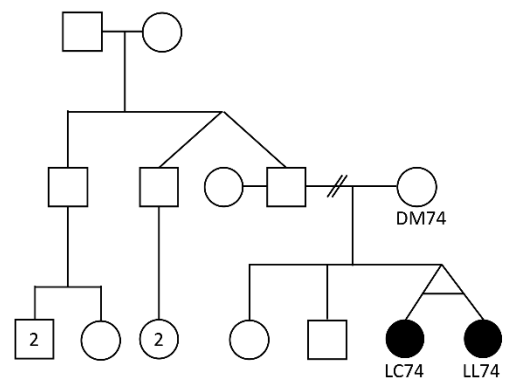
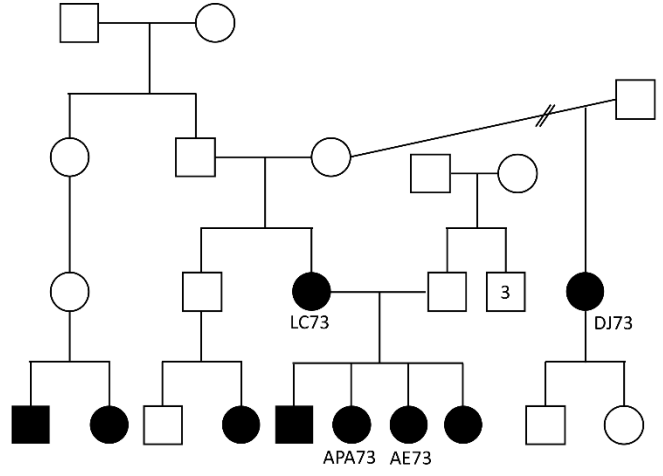
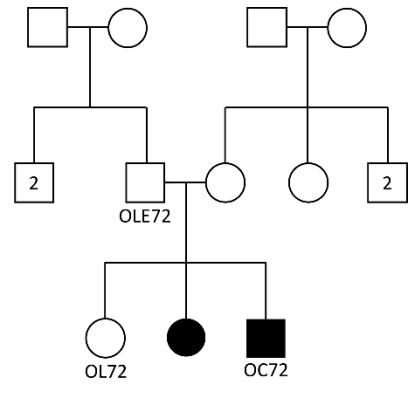
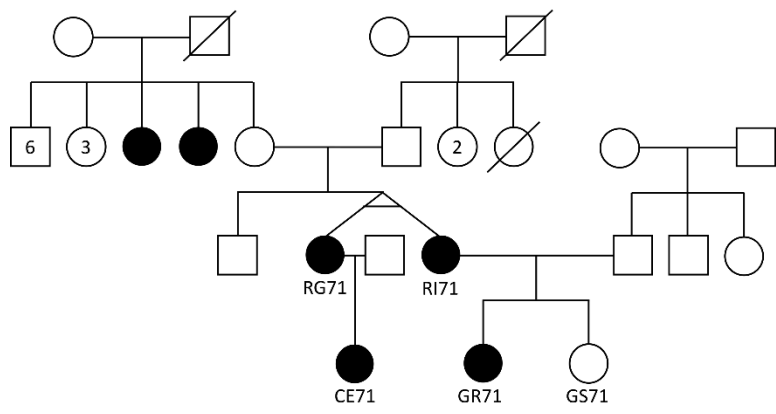




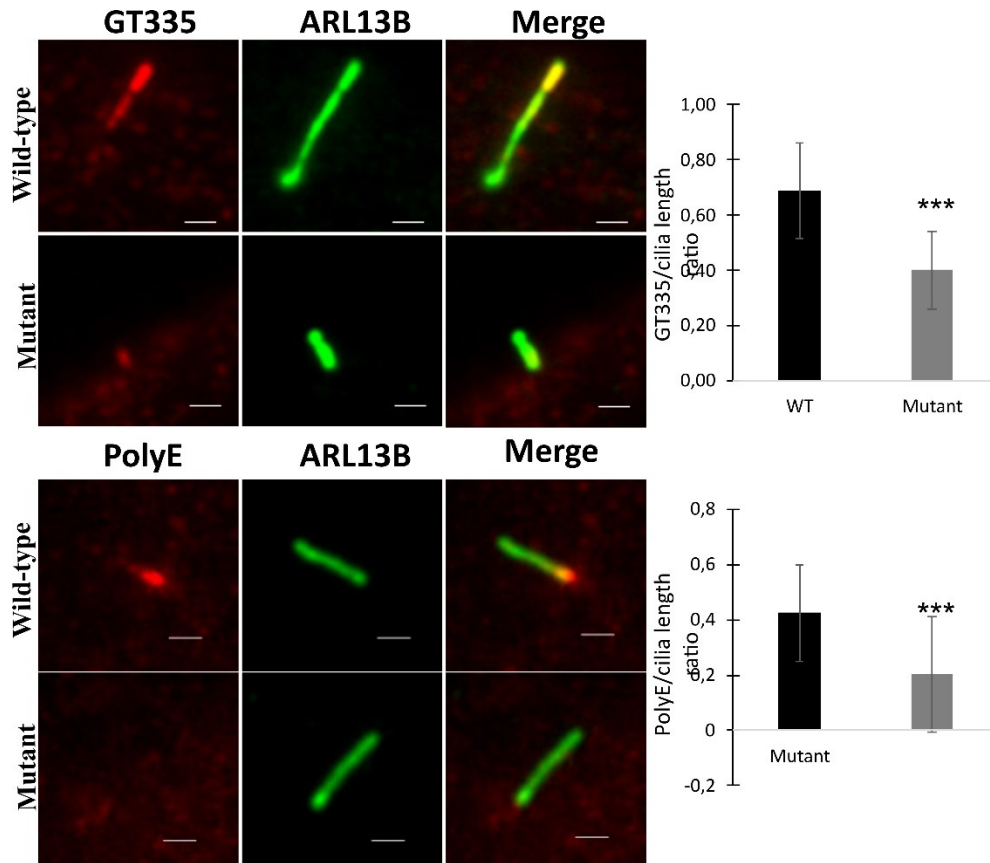








Annexe 2. L'élongation des cils primaires requiert les longues chaînes de polyglutamate générées par TTLL11



Partie supérieure : fibroblastes WT (DE0194) et mutants (DE0193) traités avec du milieu sans FBS pour 24 heures. Les cellules ont été marquées en immunofluorescence pour la protéine ARL13B (rouge) et la GT335 (vert) et montrent une diminution significative de la polyglutamylation, représentée graphiquement par le ratio GT335/taille du cil (ARL13b). n=75; barre d'échelle 5µm. Partie inférieure : fibroblastes WT (DE0194) et mutants (DE0193) traités avec du milieu sans FBS pour 24 heures. Les cellules ont été marquées en immunofluorescence pour la protéine ARL13B (rouge) et la PolyE (vert) et montrent une diminution significative de la polyglutamylation, représentée graphiquement par le ratio PolyE/taille du cil (ARL13b). n=75; barre d'échelle 5µm. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SD, la différence entre deux groupes indépendants a été analysée par un test de Student t-test, ***P ≤ 0.001.