

Université de Montréal

**Le rôle du gène de la polarité apico-basale *SCRIBBLE1*  
dans les anomalies de tube neural**

par

Kharfallah Fares

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

en Biochimie option Génétique Moléculaire

Avril, 2017

© Kharfallah Fares, 2017

## Résumé

*Scribble (Scrib)* est un régulateur clé de la polarité apicobasale (A-B) des cellules épithéliales dans la *Drosophile*. Chez les mammifères, son homologue *Scrib1* a été aussi impliqué dans la polarité A-B et a été étudié dans le cancer comme un suppresseur de tumeurs. Cependant, *Scrib1* a été également impliqué dans une autre forme de polarité appelée la polarité planaire cellulaire (PCP) où les cellules épithéliales sont polarisées sur le plan de l'épithélium. Ce processus implique une voie de signalisation appelée la voie non canonique *Wnt / Frizzled (Wnt / Fz)* ou la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) qui est responsable de la polarité des tissus et qui active le processus d'extension convergente (EC) pendant la gastrulation et la formation du tube neural chez les vertébrés. Dans les souris modèles, les mutations dans *Scrib1* provoquent une forme sévère des anomalies du tube neural (ATN) suite à un défaut dans la signalisation de la voie PCP. Dans cette étude, nous avons analysé le rôle de *Scrib1* dans la pathogenèse des ATN dans les souris mutantes *Circletail (Cre)*, dans les lignées cellulaires et dans une cohorte des ATN humaines. Bien qu'il n'y ait pas de défauts évidents dans la polarité A-B dans les cellules neuroépithéliales *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>*, nous avons identifié une localisation anormale de la protéine apicale Par-3 et de la protéine Vangl2 de la voie PCP. Ces résultats étaient concordants avec ceux obtenus suite à une suppression partielle de *Scrib1* dans les cellules MDCK II. Par-3 a été en mesure de sauver le défaut de localisation de Vangl1 (paralogue de Vangl2) causé par la suppression partielle de *Scrib1* suggérant que Scrib1 exerce son effet sur la localisation Vangl1 indirectement via Par-3. Cette conclusion est soutenue par nos résultats d'un enrichissement apical de Vangl1 suite à une suppression partielle de Par-3. L'analyse de re-séquençage de *SCRIB1* chez 473 patients atteints d'ATN a mené à l'identification de 5 mutations hétérozygotes faux sens et rares et qui sont prédites pathogéniques. Deux de ces mutations, p.Gly263Ser et p.Gln808His, et 2 mutations qui causent les ATN chez les souris, p.Ile285Lys et p.Glu814Gly, ont affecté la localisation de Scrib1 sur la membrane et son rôle comme un modulateur de la localisation de Par-3 et Vangl1. Notre étude démontre un rôle important de *Scrib1* dans la pathogenèse des ATN à travers son effet comme un médiateur de la localisation de Par-3 et Vangl 1/2 et qui est probablement indépendante de la polarité A-B.

**Mots-clés :** Scribble1, Anomalie du tube neural, polarité cellulaire planaire, polarité apicobasale.

## Abstract

*Scribble* (*Scrib*) is a key regulator of apicobasal polarity (ABP) of epithelial cells, presynaptic architecture, and short-term synaptic plasticity in *Drosophila*. In mammals, its homolog *Scrib1* has been implicated in AB polarity and has long been studied as a tumor suppressor gene. However, *Scrib1* was also implicated in another form of polarity called planar cell polarity (PCP) where epithelial cells become polarized along the plane of the epithelium. In vertebrates, PCP, also called the non-canonical Frizzled/Dishevelled (Fz/Dvl) pathway, mediates a morphogenetic process called convergent extension (CE) during gastrulation and neural tube formation. In mouse models, mutations in *Scrib1* cause a severe form of neural tube defects (NTDs) as a result of a defective planar cell polarity (PCP) signaling. In this study, we dissected the role of *Scrib1* in the pathogenesis of NTDs in its mouse mutant *Circletail* (*Crc*), in cell lines and in a human NTD cohort. While there were no obvious defects in ABP in the *Scrib1*<sup>*Crc/Crc*</sup> neuroepithelial cells, we identified an abnormal localization of the apical protein Par-3 and of the PCP protein Vangl2. These results were concordant with those obtained following a partial knockdown of *Scrib1* in MDCK II cells. Par-3 was able to rescue the localization defect of Vangl1 (paralog of Vangl2) caused by partial knockdown of *Scrib1* suggesting that Scrib1 exerts its effect on Vangl1 localization indirectly through Par-3. This conclusion is supported by our findings of an apical enrichment of Vangl1 following a partial knockdown of *Par-3*. Re-sequencing analysis of *SCRIB1* in 473 NTD patients led to the identification of 5 rare heterozygous missense mutations that were predicted to be pathogenic. Two of these mutations, p.Gly263Ser and p.Gln808His, and 2 mouse NTD mutations, p.Ile285Lys and p.Glu814Gly, affected Scrib1 membrane localization and its modulating role of Par-3 and Vangl1 localization. Our study demonstrates an important role of *Scrib1* in the pathogenesis of NTDs through its mediating effect of Par-3 and Vangl1/2 localization and most likely independently of ABP.

**Keywords:** Scribble1, neural tube defects, planar cell polarity, apicobasal polarity.

# Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Organisation du système nerveux.....	1
1.2. Développement du système nerveux central .....	3
1.2.1. Gastrulation .....	3
1.2.2. Neurulation .....	5
1.2.2.1. La neurulation primaire.....	5
1.2.2.2. La neurulation secondaire .....	11
1.3. Les anomalies de tube neural (ATN) .....	12
1.3.1. Définition des anomalies de tube neural.....	12
1.3.2. Les formes cliniques des ATN .....	13
1.3.2.1. Les ATN ouvertes .....	13
1.3.2.2. Les ATN fermées .....	15
1.4. Prévalence et espérance de vie des ATN .....	17
1.5. Syndromes associés aux ATN.....	18
1.6. Diagnostic anténatal des ATN.....	19
1.6.1. Biomarqueurs présents dans le sérum maternel.....	19
1.6.2. L'échographie.....	20
1.6.3. L'imagerie par Résonnance Magnétique.....	21
1.7. Étiologie des ATN .....	21
1.7.1. Les facteurs environnementaux .....	21
1.7.2. Les facteurs génétiques .....	23
1.8. Les souris modèles pour les ATN.....	26
1.9. SCRIBBLE1 .....	27
1.9.1. Le gène <i>SCRIBBLE1</i> .....	27
1.9.2. La protéine Scribble1.....	28
1.9.3. L'expression de <i>Scribble1</i> .....	29
1.9.4. <i>Scribble1</i> et le système nerveux central (SNC). .....	31
1.9.5. Rôle de <i>Scribble1</i> pendant le phénomène de l'extension convergente.....	31

1.9.6. Rôle de <i>Scribble1</i> dans la migration cellulaire et le guidage axonale.....	32
1.9.7. <i>Scribble1</i> et la polarité.....	33
1.9.7. 1. <i>Scribble1</i> et la polarité apicobasale.....	34
1.9.7.1.1. Le complexe Scribble1.....	36
1.9.7.1.2. Le complexe Par.....	37
1.9.7.1.3. Le complexe Crumbs.....	38
1.9.7.1.4. Stabilité de la polarité apico-basale.....	39
1.9.7.2. <i>Scribble1</i> et la voie PCP.....	41
1.9.7.2.1. Stabilité de la voie PCP .....	41
1.9.7.2.1.1. Chez la <i>Drosophile</i> .....	41
1.9.7.2.1.2. Chez les vertébrés.....	44
1.9.7.2.2. <i>Scribble1</i> au sein de la voie PCP. ....	45
1.9.7.2.3. Interaction de <i>Scribble1</i> avec Vangl2.....	48
1.9.8. Le rôle de <i>SCRIB1</i> dans les ATN humaines .....	49
1.9.9. <i>Scribble1</i> et la formation des jonctions adhérentes.....	50
1.10. La relation entre la PCP et la polarité apicobasale.....	51
2. Problématique, Hypothèse et Objectifs.....	53
2.1. Problématique.....	53
2.2. Hypothèse et objectifs.....	54
3. Matériels et méthodes.....	55
3.1 Maintenance des souris.....	55
3.2 Génotypage des souris.....	55
3.3 Plasmides utilisé.....	56
3.4 Mutagenèse dirigée.....	56
3.5 Culture cellulaire.....	58
3.5.1 Transfection.....	58
3.5.2 Électroporation .....	59

3.6 Immunofluorescence.....	60
3.6.1 Immunofluorescence des tissus neuro-épithéliales de souris.....	60
3.6.2 Immunofluorescence pour des cultures cellulaires.....	61
3.7 Le système double hybride chez les levures (Y2H).....	62
3.8 Western blot.....	63
3.9 Tests statistiques.....	64
4. Résultats .....	65
4.1. Effet de l'absence de la protéine Scrib1 sur l'expression des marqueurs de la polarité apicobasale et du membre de la voie PCP Vangl2.....	65
4.1.1. Expression des marqueurs de la polarité apicobasale et de Vangl2 dans le tube neural des souris <i>Scrib1<sup>Cre/Cre</sup></i> .....	65
4.1.2. Expression des marqueurs de la polarité apicobasale et de Vangl2 suite à la suppression de <i>Scrib1</i> dans les cellules MDCK II.....	72
4.2. Effet de la suppression de Par-3 sur la localisation de Vangl1 .....	78
4.3. La validation fonctionnelle des mutations du gène <i>Scrib1</i> humain et souris.....	80
4.3.1 Des mutations rares dans <i>SCRIB1</i> associées à des ATN affectent sa localisation membranaire.....	82
4.3.2 Des mutations dans <i>SCRIB1</i> associées aux ATN ne sauvent pas l'effet de la suppression de <i>SCRIB1</i> sur la localisation de Par-3.....	84
4.3.3 Des mutations dans <i>SCRIB1</i> associées aux ATN ne sauvent pas l'effet de la suppression <i>SCRIB1</i> sur la localisation de Vangl1.....	86
4.3.4 Des mutations dans <i>SCRIB1</i> associées aux ATN interrompent son interaction avec VANGL2.....	88
5. Discussion.....	91

5.1 Scrib1 exerce un effet spécifique sur les tissus des souris mutantes <i>Scrib1<sup>Cre/Cre</sup></i>	91
5.2 Scrib1 contrôle la localisation de Vangl 1/2 à travers son effet sur la localisation Par3	93
5.3 Scrib1, Vangl2, Par-3 et l'extension convergence	95
5.4 Des mutations dans <i>SCRIB1</i> associées aux ATN chez l'humain et la souris affectent son association membranaire, sa capacité à moduler la localisation subcellulaire de Par3 et Vangl1 et son interaction physique avec Vangl2	97
6. Futurs directions et défis	101
6.1. Rôle de la protéine Par-3 dans le confinement de la protéine Vangl 1/2 à la membrane basolatérale	101
6.2. Investiguer le rôle des autres membres des deux polarités A-B et PCP au cours du développement de tube neural dans les souris mutantes <i>Scrib1<sup>Cre/Cre</sup></i>	103
6.3. Investiguer plus en détails la structure des jonctions adhérentes et du cytosquelette dans les souris mutantes <i>Scrib1<sup>Cre/Cre</sup></i>	103
6.4. Investiguer les modifications épigénétiques de <i>SCRIB1</i> dans les ATN	104
6.5. Rôle de <i>Scrib1</i> dans le guidage axonale	105
8. Bibliographies	
Contribution des Co-auteur: Article « <i>Scribble1</i> plays an important role in the pathogenesis of neural tube defects through its mediating effect of Par-3 and Vangl1/2 localization»	ii



## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée pour introduire les mutations humaines et souris dans hScrib-GFP et hSCRIB1-PDZ-pGADT7.....56

**Tableau 2.** Mutations rares (<1%) identifiées dans *SCRIB1* chez les patients atteints des ATN.....80

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la moelle épinière.....	2
<b>Figure 2</b> : présentatif du processus morphogénétique d'extension convergente.....	7
<b>Figure 3</b> : Schéma présentatif du phénomène de la constriction apicale.....	7
<b>Figure 4</b> : Schéma présentatif du phénomène de fermeture de tube neural.....	9
<b>Figure 5</b> : Schéma présentatif des sites d'initiations multiples et séquentielles de la fermeture du tube neural.....	11
<b>Figure 6</b> : Schéma présentatif de la neurulation secondaire.....	12
<b>Figure 7</b> : Vue latérale de la moelle épinière dans trois cas d'ATN.....	15
<b>Figure 8</b> : Schéma présentatif de la structure générale des protéines LAP.....	28
<b>Figure 9</b> : Schéma présentatif de la structure générale de Scrib1 chez l'humain.....	29
<b>Figure 10</b> : Schéma présentatif de la polarité A-B et la PCP dans les cellules épithéliales....	34
<b>Figure 11</b> : Schéma présentatif montrant le rôle du Scribble1 au sein de la polarité apico-basale.....	35
<b>Figure 12</b> : La polarité planaire cellulaire chez la <i>Drosophila</i> .....	43
<b>Figure 13</b> : Schéma présentatif des différentes interactions des protéines de la voie chez la <i>Drosophila</i> et chez la souris.....	45
<b>Figure 14</b> : Schéma présentatif des mutations dans les différentes lignes de souris.....	47
<b>Figure 15</b> : Illustration schématique qui montre l'interaction entre Scrib1 et Vangl2.....	49
<b>Figure 16</b> : Immunohistochimie d'une cryosection transversale de la partie ventrale de tube Neural qui montre les deux parties apicale et subapicale.....	60
<b>Figure 17</b> : La polarité apicobasale, la structure cytosquelettique et la distribution de Vangl2 dans le tube neural des souris <i>Scrib1<sup>Crc/Crc</sup></i> .....	66
<b>Figure 18</b> : Études d'expression des marqueurs de la polarité apicobasale, la structure cytosquelettique et la distribution de Vangl2 dans le tube neural des embryons E11.5 <i>Scrib1<sup>Crc/Crc</sup></i> .....	68
<b>Figure 19</b> : Mort cellulaire dans les embryons des souris de type sauvage et mutant.....	70
<b>Figure 20</b> : Expression de Scrib1 lors de sa suppression avec ScrbKD.....	71
<b>Figure 21</b> : La suppression de <i>Scrib1</i> n'affecte pas la localisation de Lgl2.....	72

<b>Figure 22</b> : Effet de la suppression du Scrib1 sur la localisation Par-3 et Vangl1.....	74
<b>Figure 23</b> : Expression des protéines Scrib1 et Par-3 lors de la suppression de <i>Scrib1</i> avec ScrbKD.....	75
<b>Figure 24</b> : La capacité de Vangl2 et Par3 de sauver les phénotypes perturbés de Par3 et Vangl2 respectivement suite à la suppression de <i>SCRIB1</i> .....	76
<b>Figure 25</b> : Expression de Par3 lors de sa suppression avec Par-3KD.....	77
<b>Figure 26</b> : Effet de Par-3 sur la localisation cellulaire de VANGL1.....	78
<b>Figure 27</b> : Des mutations rares dans <i>SCRIB1</i> associées aux ATN et leur effet sur la localisation membranaire de Scrib1.....	82
<b>Figure 28</b> : Effet des mutations rares de <i>SCRIB1</i> associées aux ATN sur sa capacité de moduler la localisation de Par-3.....	84
<b>Figure 29</b> : Effet des mutations rares de <i>SCRIB1</i> associées aux ATN sur sa capacité de moduler la localisation de Vangl1/2.....	86
<b>Figure 30</b> : Effet des mutations rares du gène <i>SCRIB1</i> associées aux ATN sur son interaction avec VANGL2 à l'aide d'un Système double hybride chez la Levure (Yeast two hybrid, Y2H).....	88

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>aPKC</b>	Protéine kinase atypique C
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATN</b>	Anomalies du tube neural
<b>Bcat</b>	$\beta$ -caténine
<b>Bbs</b>	Syndrome de Bardet-Biedl
<b>BMP</b>	Protéine morphogénétique osseuse
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CAMKII</b>	Kinase calcium/calmodulin dépendante II
<b>EC</b>	Extension convergente
<b>Crc</b>	Circletail
<b>Dg</b>	Diego
<b>Ds</b>	Dachsous
<b>Dvl/Dsh</b>	Dishevelled
<b>Fj</b>	Four-jointed
<b>Ft</b>	Fat
<b>Fy</b>	Fuzzy
<b>Fz</b>	Frizzled
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogène-synthase-kinase 3 $\beta$
<b>Int</b>	Inturned
<b>JNK</b>	Kinase Jun
<b>KD</b>	Knockdown
<b>LAP</b>	Leucine-rich repeat and PDZ domain
<b>LCS</b>	Liquide cérébro-spinal
<b>LEF</b>	Lymphoid Enhancer-binding factor
<b>Lp</b>	Loop-tail
<b>MT</b>	Microtubule

<b>MTHFR</b>	5,10-methylene-tetrahydrofolate réductase
<b>PCP</b>	Polarité planaire cellulaire
<b>Polarité A-B</b>	Polarité apico-basale
<b>Pk</b>	prickle - spiny legs
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PTK7</b>	Protéine tyrosine kinase
<b>Rho</b>	Ras homolog
<b>ROCK</b>	Kinase associée à Rho
<b>Scrib</b>	Scribble
<b>Shh</b>	Sonic Hedgehog
<b>shRNA</b>	petit ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA)
<b>siRNA</b>	Petit ARN interférent (Small interfering RNA)
<b>SNC</b>	Système Nerveux Centrale
<b>SNP</b>	Système Nerveux périphérique
<b>SNP</b>	Polymorphisme d'un nucléotide simple
<b>stan/fmi</b>	Starry night/Flamingo
<b>Vang/Stbm</b>	Van gogh/Strabismus
<b>VANGL</b>	Vang-like
<b>Wnt</b>	Wingless

*À mes très chers parents*

## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier ma directrice, Dr Zoha Kibar, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour travailler sur un sujet de recherche assez captivant. Je la remercie aussi de toute la confiance qu'elle avait en moi, ainsi que pour tout le savoir qu'elle m'a transmis dans le domaine de la génétique moléculaire et de m'avoir fait découvrir la beauté de la recherche scientifique. Ainsi je remercie ma codirectrice Graziella Di Cristo pour son support.

Je remercie également tous les étudiants de mon laboratoire particulièrement Marie-Claude Guyot et Abdulrahman Alhassen pour leurs conseils et leurs soutiens techniques ainsi que pour leurs amitiés. J'aimerais remercier aussi les autres membres des laboratoires du groupe de neurosciences et spécialement Abdullah Al Mahmud et Patricia Awad pour leurs aides précieuses pendant mon PhD.

Merci à mes parents auxquels je suis très fier d'être leurs fils et je leur dis qu'aucune dédicace et aucun mot ne pourraient exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je leur porte. Mes chers parents, je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour et de votre tendresse et de longs jours d'apprentissage. Loin de vous, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous expriment la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

Ainsi, une pensée pour toute ma famille et ma belle famille et surtout à mes chers frères Salah, Belgacem, Ali et Brahim ainsi qu'à ma chère sœur Nacéra et notamment à l'esprit de mes deux chers frères Ismail et Djamel, qui n'ont pas pu voir le terme de ce projet.

Je remercie la personne sans laquelle rien n'aurait été possible, qui a changé ma vie et qui en rend chaque moment merveilleux : merci à Rahma, pour son soutien, de me donner toujours le sourire et de m'aider à garder la force et l'optimisme dans les moments difficiles et pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse. Et surtout, merci pour son amour. Et bien sûr, je n'oublie pas ma chère princesse Djana et mes deux beaux anges Adam et Mouhamed qui rendent chaque moment de ma vie spécial.

Enfin, un grand merci pour tous les patients qui ont participé à cette étude.

**Et évidemment, un grand merci à ALLAH (DIEU), sans qui je ne serais rien.**

# Introduction

## 1.1. Organisation du système nerveux

Le système nerveux (SN) est un système très complexe responsable de toutes les fonctions de l'organisme. Il se compose de plusieurs **centres nerveux** qui interviennent dans le réglage de toutes les fonctions en relation entre l'être humain et son entourage (l'environnement). Il est divisé en deux parties : le système nerveux central et le système nerveux périphérique.

**Le système nerveux central (SNC)** est le lieu de traitement et d'organisation de toutes les commandes motrices et sensorielles dans le corps humain qui permettent la réaction au stimulus. Il est composé de deux parties principales : **le cerveau** et **la moelle épinière**.

**Le cerveau** est l'organe principal le plus complexe du SNC qui contient des milliards des cellules neuronales (neurones), qui se communiquent entre elles par l'intermédiaire des axones assurant ainsi la transmission de l'influx nerveux à des cellules cibles spécifiques qui se situent à des distances plus ou moins loin du cerveau, pour assurer le bon fonctionnement du corps humain. Cette structure est protégée par une barrière osseuse qu'on appelle la boîte crânienne (ou neurocrâne), composée par **la voûte** (structure osseuse formée de plusieurs plaques osseuses soudées entre elles pour assurer la protection du cerveau) et **le plancher** ou la base de crâne (formé de trois fosses crâniennes) dans lequel on trouve des trous pour assurer le passage des éléments innervants, comme le nerf olfactif, le nerf ethmoïdal et les nerfs optiques, ou des éléments qui permettent la circulation sanguine, comme l'artère ethmoïdale antérieure et l'artère ophthalmique, pour assurer l'alimentation de cerveau, où la plus grande partie d'oxygène qui circule dans le corps humain est consommée par le cerveau (20 % d'oxygène qui rentre dans le corps). Le cerveau humain est composé de six régions importantes bien distinctes : **le télencéphale**, **le diencéphale**, **le mésencéphale**, **le cervelet**, **le pont** et **le bulbe rachidien**. Chaque région assure une fonction bien précise.

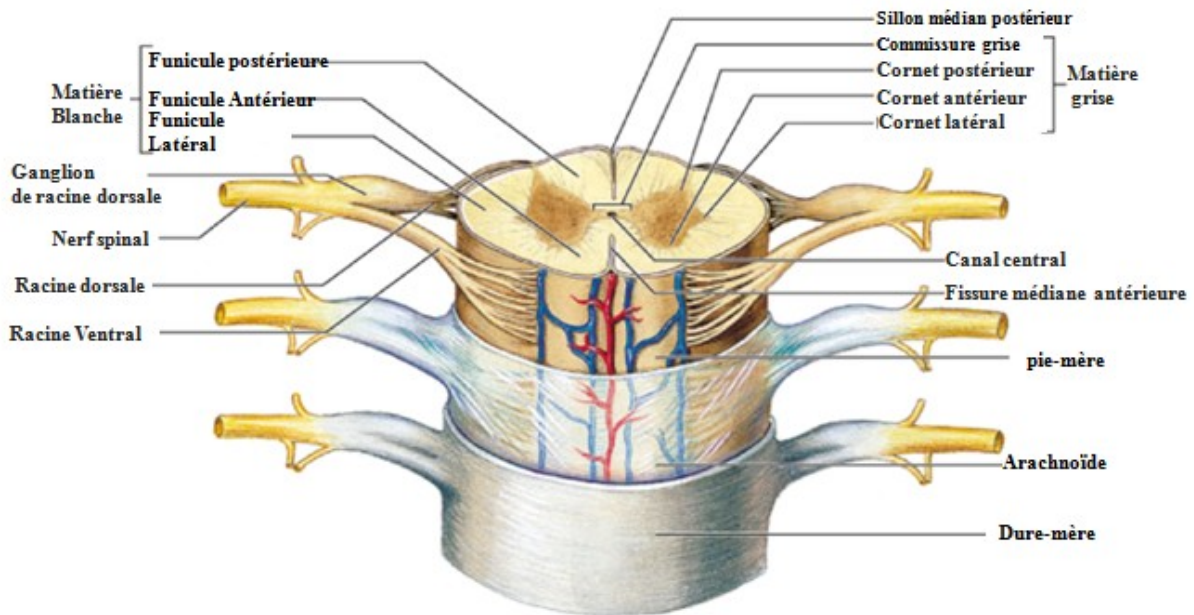
**La moelle épinière** est le résultat du prolongement caudal du cerveau et de la boîte crânienne. Il s'agit d'un cordon blanc de ~ 1 cm de diamètre et de 45 à 50 cm de long qui se



loge dans le canal rachidien ménagé dans les vertèbres pour assurer sa protection. Il s'étend du trou occipital jusqu'à la deuxième vertèbre lombaire. À partir de cette dernière partent trente et une paires de nerfs rachidiens (gauche et droite) qui se ramifient dans le tronc et dans les membres. D'un point de vue fonctionnel, tous les nerfs rachidiens qui s'étendent directement de la moelle épinière sont soit **moteurs** ou **sensitifs**, tandis que de point de vue structural chaque nerf rachidien naît par deux racines au niveau de la moelle, l'une antérieure centrifuge et l'autre postérieure centripète. Une coupe transversale démontre que la moelle épinière est constituée de deux régions :

**La région centrale** en forme de H, formée principalement des corps de neurones et de la névroglie (tissu qui assure la protection des cellules neuronales). Cette région est de couleur grisâtre due à l'absence de la myéline, d'où provient son nom **la substance grise (Figure 1)**.

**La région périphérique**, entoure complètement la substance grise et composée principalement de prolongements axoniques protégés par un gain de myéline qui lui donne la couleur blanche, d'où provient son nom **la substance blanche**. Cette substance assure la transmission de signal vers le haut et le bas de l'axe neuronal **(Figure 1)** (1-3).



**Figure 1.** Représentation schématique de la moelle épinière. Adaptée de Levy, R. M. 2014 (4).

**Le système nerveux périphérique (SNP)** est la partie des ganglions et des nerfs situés à l'extérieur du cerveau et de la moelle épinière. Il est divisé en nerfs crâniens numérotés de III à XII fournissant des nerfs crâniens et spinaux, dont le rôle principal est de connecter le SNC avec les membres supérieurs et inférieurs ainsi qu'avec les organes corporels. L'anatomie générale du SNP est organisée selon l'agencement des fibres le long de l'axe rostrocaudal. Les nerfs moteurs proviennent du tube neural ventral. Cette centralisation est induite par des molécules morphogénétiques telles que Sonic hedgehog. En revanche, les éléments sensoriels du SNP proviennent d'une population spécifique de cellules provenant de la voûte du tube neural, à savoir la crête neurale. Ces cellules donnent naissance aux neurones des ganglions de la racine dorsale et des ganglions autonomes, y compris les neurones adrénergiques des surrénales. En outre, les cellules gliales de soutien de Schwann du SNP proviennent à leurs tours des cellules de la crête neurale. Des facteurs de croissance ainsi que des protéines myélinisées sont impliqués dans le développement du SNP (5).

## **1.2. Développement du système nerveux central**

À partir de la troisième semaine du développement embryonnaire, les premiers signes de la formation du SNC commencent à apparaître. Ce développement suit le processus de la gastrulation qui se déroule à partir de 15<sup>e</sup> journée de la vie embryonnaire humaine et qui est essentiel pour la mise en place des 3 feuillets fondamentaux des métazoaires (règne animal).

### **1.2.1. Gastrulation**

Dans le règne animal, la gastrulation est le processus par lequel les couches germinales primaires sont formées. Ce processus implique des transformations considérables dans la topologie cellulaire, ce qui donne naissance à tous les tissus de l'adulte (6).

Initialement formé de monocouche (l'épiblaste), ce tissu se subdivise par une internalisation cellulaire, permettant le remaniement des blastomères formant ainsi un embryon à deux couches (bi-laminaire) ou trois couches (tri-laminaire). Ce processus morphogénétique assure le développement des trois différents plans et un axe fondamental (**antéropostérieur, dorsoventral et gauche-droite**) du corps, ce qui va stimuler une orientation précise des cellules vers des destins de développement divergents (6, 7). À ce stade l'embryon est composé de trois couches cellulaires : **l'ectoderme, l'endoderme et le**

**mésoderme.** L'**ectoderme** est la couche externe qui donnera naissance au système nerveux de l'embryon ainsi qu'à son épiderme. Le **mésoderme** est la couche qui se positionne entre l'ectoderme et l'endoderme et qui donnera naissance aux os du squelette et aux muscles. L'**endoderme** est la couche la plus interne qui donnera à la fin du développement le foie, les viscères ainsi que les poumons (1, 2, 7).

À la fin de la deuxième semaine et au début de la troisième semaine du développement embryonnaire, on assistera au déclenchement de la **gastrulation**. Le premier événement est l'apparition d'un disque embryonnaire formé de l'épiblaste et de l'hypoblaste. Aux alentours de la 14-16<sup>e</sup> journée de la vie embryonnaire, l'apparition de la ligne primitive sur la ligne médiane dorsale de l'embryon va donner une symétrie bilatérale du disque embryonnaire, constituant la première rupture dans la symétrie de l'embryon, ainsi qu'une orientation crânio-caudale de son axe. La formation de la ligne primitive formée des cellules épiblastiques omnipotentes constitue la porte d'entrée à partir de laquelle les cellules épiblastiques commencent à pénétrer et à coloniser l'espace entre l'épiblaste et l'hypoblaste. Ensuite, l'extrémité crâniale de la ligne primitive montre un épaississement en forme de bouton appelé **nœud de Hensen**, par lequel la migration des cellules épiblastiques est assurée, ce qui va permettre la formation des lèvres de la ligne primitive et va faciliter l'invagination des cellules épiblastiques à travers le sillon primitif. Une fois en profondeur, ces cellules vont migrer par des mouvements amiboïdes dans la majorité du disque embryonnaire entre l'épiblaste et l'hypoblaste d'une part, et dans l'hypoblaste lui-même d'autre part. Les premières cellules qui traversent le nœud et la ligne primitive vont déplacer les cellules de l'hypoblaste pour les remplacer, tandis que le reste des cellules qui migrent à travers le nœud de Hensen vont rester sur la ligne médiane et donner des structures mésodermiques axiales et le mésoderme préchordal, qui va donner à son tour la future tête de l'embryon et le canal chordal tout au long du reste du corps de l'embryon. Ainsi, **la notochorde** qui aura un rôle primordial dans l'induction de l'ectoderme neural sera formée aux alentours de la 19<sup>e</sup> journée à partir des cellules mésodermiques. En plus, les cellules épiblastiques qui ingressent l'hypoblaste vont le remplacer pour devenir le futur endoderme. Finalement, les cellules qui restent au niveau de l'épiblaste formeront l'ectoderme qui assurera la protection et la sensibilité de l'embryon et qui donnera à son tour deux structures importantes qui sont **l'épiderme** et **la neuroectoderme** (1-4, 7, 8).

## 1.2.2. Neurulation

La neurulation est parmi les stades embryologiques de base, au cours desquels se forme le tube neural qui est le précurseur du cerveau et de la moelle épinière (semaines 3-6). C'est un processus morphogénétique complexe, dans lequel les cellules doivent changer de forme, migrer et se différencier différemment pour transformer une feuille de cellules épithéliales (la plaque neurale) en un tube creux, ce qui mènera à la formation de tube neural. Chez l'humain, la neurulation se déroule en deux phases distinctes qui auront lieu dans des différents sites le long de l'axe rostrocaudal de l'embryon (7, 9).

### 1.2.2.1. La neurulation primaire

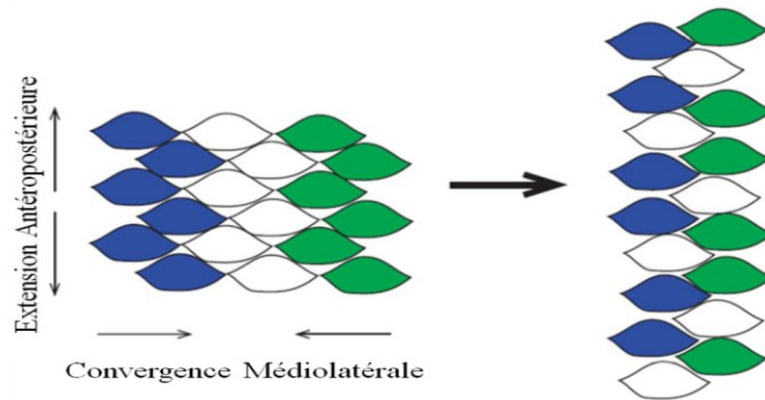
La principale caractéristique de la neurulation primaire est qu'elle se produit à partir d'un tissu épithélial préexistant, qui se plie et se coude pour former **le tube neural**. Elle est nommée « primaire » parce qu'elle implique les premières couches germinales (endoderme, mésoderme et ectoderme) qui résultent du phénomène de la gastrulation (10). On considère l'apparition de **la plaque neurale** aux alentours de la 19<sup>e</sup> journée (3<sup>e</sup> semaine) de grossesse comme l'élément déclencheur de la neurulation primaire. La formation de la plaque neurale survient en réponse à certains inhibiteurs des protéines morphogéniques osseuses (BMP, Bone Morphogenetic Proteins), qui stimulent la formation de l'épiderme, tel que chordin, noggin et follistatin émis par l'organisateur de Spemann. Ces derniers ont comme cible les cellules situées dans la ligne médiane de l'ectoderme, et en inhibant les BMP, vont les transformer en cellules neuroépithéliales qui vont se différencier en neuroectoderme puis former la plaque neurale (9). D'autres facteurs sont impliqués pendant ce processus, comme les facteurs de croissance des fibroblastes FGF (fibroblast growth factors), la signalisation par la voie canonique des Wnt et des facteurs de croissance analogues à l'insuline (2).

Au cours des premières semaines de développement, la notochorde est considérée comme le centre de signalisation. Des facteurs de croissance sécrétés et des morphogènes sont responsables du destin des tissus environnants, y compris le tube neural. La meilleure caractéristique de la notochorde est sa capacité à diriger la neurogénèse du tube neural au cours de sa fermeture dorso-ventrale. Des études chez les souris mutantes ont démontré que les mutations qui perturbent la formation de la notochorde entraînent une modification dans

l'induction de la plaque neurale. En revanche, des expériences de greffe d'une notocorde ectopique adjacente au tube neural ont démontré l'établissement d'une plaque neurale secondaire, ce qui prouve le rôle inducteur de la notochorde. Plusieurs protéines produites par la notochorde interviennent dans le processus d'induction, où des études ont démontré que la transplantation des billes microporeuses de morphogène Sonic hedgehog (Shh) et de chordin aboutit également à la formation d'une plaque neurale secondaire (11).

Ensuite, deux formes de prolongement s'appliqueront sur la plaque neurale : un élargissement à l'extrémité céphalique qui donnera le futur cerveau et une élongation étroite dans la région spinale, sous forme d'un épaissement médio-sagittal de l'ectoblaste. Au cours de ce processus de mise en forme, la principale force motrice de ces prolongements est un événement morphogénétique appelé **l'extension convergente (EC) (Figure 2)** (9). Pendant ce processus complexe, les cellules s'allongent médio-latéralement et produisent des protrusions cellulaires polarisées qui leur permettent de se déplacer directionnellement et s'intercaler avec d'autres cellules voisines. Ces changements de forme et de mouvement entraînent une **convergence** de tissus vers la ligne médiane et en même temps une **extension** le long de l'axe antéropostérieur (d'où le nom d'extension convergence) (1, 2, 9). Selon l'expérience de Keller en 1985, les différents processus qui se produisent pendant la CE sont indépendants des tissus avoisinants. Pendant son expérience, Keller a mis en culture des nouveaux explants de mésoderme ou de tissu neural de Xénope et il a observé que les tissus étaient capables de s'affiner et de s'étendre de façon autonome (12), expliquant la spécificité de ce phénomène juste pour la plaque neurale à ce stade embryonnaire.

L'EC est contrôlée par la voie non-canonique Wnt / frizzled (Wnt/Fz), contrairement à la voie Wnt canonique qui agit par la stabilisation de la  $\beta$ -Caténine en contrôlant la spécification du destin cellulaire. Cette voie est l'équivalent de la voie appelée **la polarité planaire cellulaire (PCP)** chez la mouche (la voie **PCP** sera décrite plus en détails dans la section 1.5.) (9).



**Figure 2** : Schéma présentatif du processus morphogénétique d'extension convergente. Adaptée de Kibar et al., 2007 (13).

Le pliage de la plaque neurale pour former un tube cylindrique est accompagné par un changement morphologique fondamental au niveau des cellules neuroépithéliales. Ces dernières vont subir une forme de contraction au niveau apical, ce qui réduira le diamètre des cellules à ce pôle et produira ainsi des cellules en forme de coin, facilitant le processus de pliage de la plaque neurale (**Figure 3**). Ce phénomène appelé **la constriction apicale** est le résultat d'interaction entre les filaments d'actine et les unités motrices de la myosine II pour donner une force mécanique qui facilitera la contraction des cellules au niveau apical. Cette théorie a été confirmée par des études qui ont démontré l'enrichissement des pôles apicaux des cellules de l'épithélium neuronal par les filaments d'actine (14).



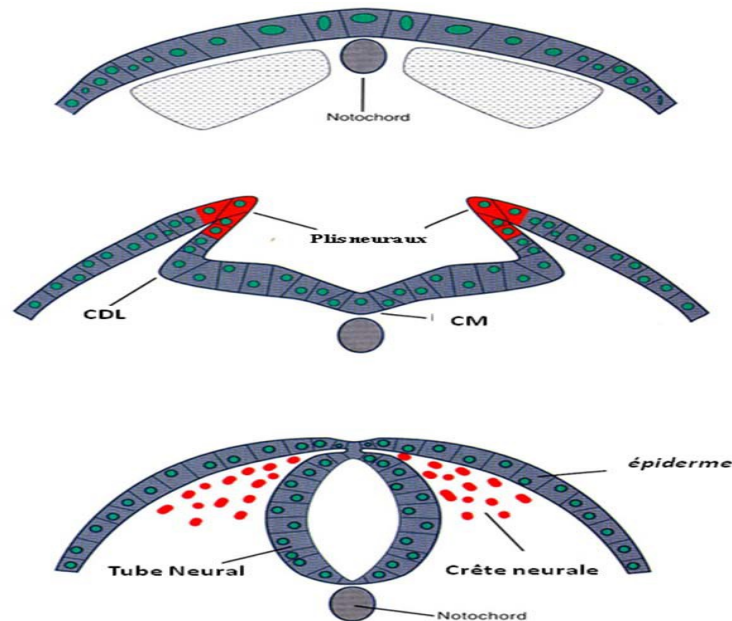
**Figure 3 : Schéma représentatif du phénomène de la constriction apicale.** (A) la plaque neurale avant le phénomène de la constriction apicale (B) la flexion de la plaque neurale par la constriction apicale (cellules bleues) peut faciliter la fermeture du tube neural. La convergence de la ligne médiane (cellules grises et noires) peut également contribuer à la fermeture du tube neural, en diminuant progressivement la distance entre les plis neuraux. Adapté de Wallingford JB, 2005 (15).

D'autres études ont démontré que deux gènes liés à l'actine sont impliqués dans ce processus : *p190RhoGap* (un régulateur négatif de la Rho GTPase) impliqué dans la régulation de la dynamique d'actine et *Shroom* qui code pour une protéine de liaison à l'actine, où il a été démontré que la perte de fonction de ces protéines inhibe la fermeture du tube neural (16). D'autres études réalisées sur des embryons de souris traités avec la cytochalasine D (un inhibiteur des microfilaments d'actine) ont abouti au même résultat, ce qui confirme la théorie de la contraction apicale (17).

Les deux bords de la plaque neurale vont se soulever, se rapprocher et finalement se fusionner aux alentours du 28<sup>e</sup> jour de la gestation humaine. Ceci est dû aux différents changements morphologiques au niveau cellulaire, plus précisément aux phénomènes d'extension convergente et de la constriction apicale qui facilitent le soulèvement et le rapprochement des bourrelets neuraux qui délimitent la gouttière neurale (**Figure 4**) (18).

Pour faciliter le pliage des plis neuraux, plusieurs points d'articulation vont se créer : les charnières dorsolatérales (CDL) qui se situent sur les côtés latéraux des plis neuraux et la charnière médiane (CM) qui se situe sur la longueur de l'axe rostrocaudal (**Figure 4**). Des expériences ont montré que la suppression de la notochorde empêche la formation du CM, ce

qui nous permet de conclure que la formation de ce point nécessite l'intervention de signaux provenant de la notochorde (19).



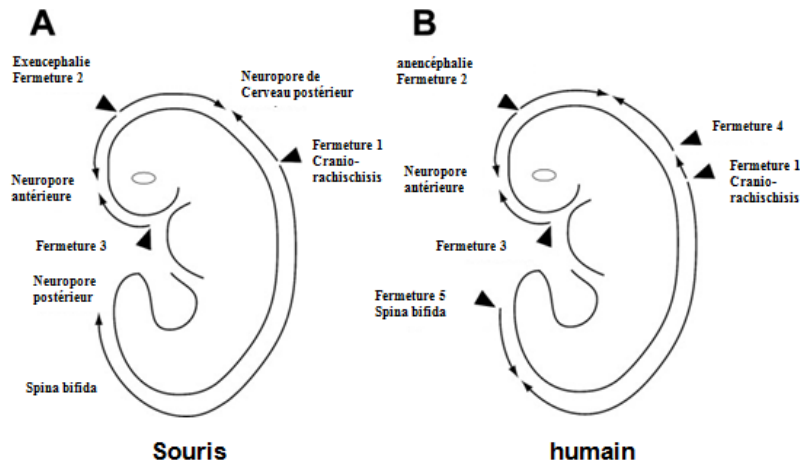
**Figure 4 : Schéma représentatif du phénomène de fermeture de tube neural.** Pendant la neurulation primaire, la plaque neurale nécessite plusieurs points d'articulation le long de l'axe dorsoventral pour former un tube neural, y compris un à la ligne médiane ventrale en développement (CM) qui devient la plaque de plancher, ainsi qu'un autre dorsal (CDL). Ces points d'articulation permettent la fermeture de la plaque neurale et le soulèvement des plis neuraux pour qu'ils se fusionnent à la ligne médiane dorsale. En même temps, les cellules de la crête neurale vont se former (rouge) et migrer. Adaptée de Larry Squire et al., 2012 (20).

Plusieurs voies de signalisations interviennent dans le processus de la fermeture de tube neural, incluant : la voie PCP qui est nécessaire pour le processus de l'extension convergente du tube neural, la voie de Shh (une hyper-activation de cette voie provoque des ATN), la voie de BMP, la voie de Notch qui règle la neurogénèse, la voie rétinolide et enfin le métabolisme de l'inositol avec la phosphorylation des protéines par les Protéines kinase C. Une régulation complexe de ces différentes voies conduit à une fermeture complète du tube neural (21). L'arrivée des plis neuraux au niveau de la ligne médiane est considérée comme le



point de rencontre et de fusionnement de ces derniers; ce qui permettra leur intercalation et fusionnement dans **trois points** chez la souris (**Figure 5**). Plusieurs recherches ont été faites pour mieux comprendre la nature et les mécanismes par lesquels le fusionnement des plis neuraux se fait, mais ces mécanismes restent largement inconnus. Après le rapprochement des plis neuraux vers la ligne médiane, plusieurs projections cellulaires se forment à partir des cellules de la première ligne de chaque pli (les cellules apicales), ce qui va permettre la formation des contacts cellulaires permanents entre les deux plis (22). Ce phénomène est contrôlé par des récepteurs activés par les protéases (Protease Activated Receptors - PAR) Par1 et Par2 ainsi que les récepteurs des tyrosines-kinase Eph (23). Le contact cellule-cellule est primordial pour initier cette fermeture du tube neural. Des études ont montré que l'enlèvement du matériel riche en carbohydrates (glucides) à la membrane des cellules, qui se considère comme un facteur crucial pour l'adhérence des cellules, par la phospholipase C, empêche la fusion des plis neuraux et mène à des ATN (24).

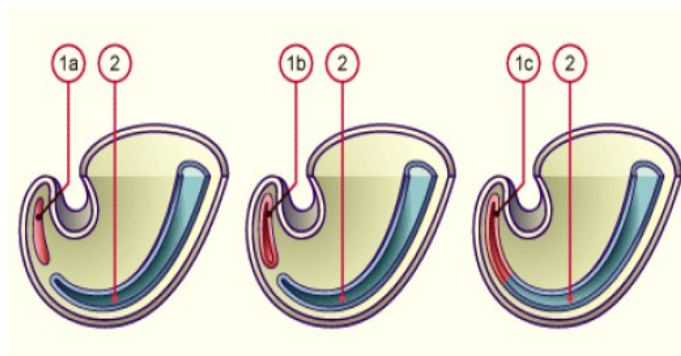
Le premier point de fermeture (point de fermeture 1) s'effectuera dans la région cervicale (au jour embryonnaire E8.5), plus précisément à la limite entre le rhombencéphale et la région cervicale, et continuera pour atteindre les régions du futur cerveau et de la colonne vertébrale. Le deuxième point de fermeture se dirige dans les deux directions antérieures et postérieures et se localise au niveau prosencéphale/mésencéphale. Le troisième point se situe à l'extrémité rostrale du prosencéphale et se dirige vers le point de fermeture 2 (21, 25, 26). En plus des fermetures 1, 2 et 3 équivalentes à celles décrites chez la souris, Van Allen a proposé un modèle qui rajoute deux points de fermeture chez l'humain : le point 4 qui se situe au neuropore du mésencéphale et le point 5 qui se localise au neuropore postérieur (**Figure 5**) (27, 28). Enfin, la fermeture du tube neural s'achève avec une fermeture éclair entre les différents points de fusionnement pour donner naissance à **un tube neural** (13)



**Figure 5 :** Schéma présentatif des sites d’initiation multiples et séquentielles de la fermeture du tube neural chez l’humain (B) et chez la souris (A). Adaptée de Bassuk AG et Kibar Z, 2009 (9).

#### 1.2.2.2. La neurulation secondaire

Comme la neurulation primaire, le terme de neurulation secondaire désigne le « développement du corps secondaire » qui complète la première partie de tube neural déjà formée par la neurulation primaire. Dans cette étape, la région caudale de la queue de tube neural se développe à partir du tissu d’un bourgeon indifférencié, entre la 4<sup>e</sup> et la 7<sup>e</sup> semaine du développement humain pour donner un tube neural primitif (10, 29). Cette partie caudale du tube neural s’appelle **l’émminence caudale** et provient d’une population de cellules mésenchymateuses, plutôt que d’une population épithéliale comme dans la neurulation primaire. **L’émminence caudale** va se vider de l’intérieur pour former une lumière qui s’unira par la suite avec le canal neural, pour former une continuité de tube neural. Dans cette lumière, le tube neural sacro-caudal se formera en continuité avec celle du tube neural primaire situé du côté rostral. Finalement, une couche neuro-épithéliale revêtira cette lumière pour finaliser la formation de tube neural (9, 30, 31).



**Figure 6 :** Schéma présentatif de la neurulation secondaire. Adaptée de <http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete01.html>. 2017 (32).

1a ; éminence caudale mésenchymateuse pleine

1 b ; éminence caudale creuse

1c ; le canal neural s'unit à l'éminence caudale

2 ; tube neural

À partir de la 4e semaine du développement embryonnaire, des défauts de fermeture de tube neural peuvent arriver à tous les niveaux de l'axe embryonnaire et conduiront à ce qu'on appelle les **anomalies de tube neural (ATN)**. Ces derniers peuvent être au niveau crânial comme ils peuvent être au niveau caudal ou bien dans certains cas dans les deux.

### **1.3. Les anomalies de tube neural (ATN)**

#### **1.3.1. Définition des Anomalies de tube neural.**

Les anomalies du tube neural (ATN), incluant l'anencéphalie et le spina-bifida, représentent un groupe de malformations congénitales très fréquentes chez l'homme. Elles touchent 1-2 enfants par 1000 naissances et représentent une cause majeure de mortalité périnatale. Ces anomalies sont causées par un défaut partiel ou complet de la fermeture du tube neural au cours de développement embryonnaire. Les séquelles d'une fermeture incomplète de tube neural sont nombreuses et elles peuvent être également absentes. Les enfants atteints de ces maladies ont un risque de mortalité plus élevé, comparé aux enfants non atteints (33-35).

### 1.3.2. Les formes cliniques des ATN

Le spectre des ATN est très considérable et peut être souvent très compliqué, ce qui rend la compréhension de ces anomalies très complexe. Pour mieux comprendre les ATN, plusieurs classifications ont été proposées. En 1988, une classification basée sur la localisation des ATN a été proposée par **Lemire** et a généré deux classes d'ATN, crânielles et spinales (36). En 1997, une autre classification a été proposée par **McComb** basée sur une question principale ; est-ce que la malformation est recouverte ou non ? Ce qui lui a mené à deux classes d'ATN, ouvertes ou fermées (37). La plus récente classification est proposée en 2003 par **Rasmussen** qui s'est concentré sur le type d'organe touché par la lésion causée par les ATN (classification anatomique) (38).

En résumé, la majorité des classifications des ATN utilisées actuellement se base sur leur localisation, la structure touchée au long de tube neural et si elles sont recouvertes ou non (une combinaison des trois classifications a été décrite brièvement dans le paragraphe précédent).

#### 1.3.2.1. Les ATN ouvertes

Elles représentent la forme clinique la plus fréquente des ATN. Dans ce type d'ATN, le tissu neural est exposé à l'extérieur et n'est pas couvert de peau, ce qui accélère le processus de sa dégénérescence (7, 39). Ces ATN sont classées en deux sous classes selon leurs localisations soit Crâniale ou Spinale.

**Les ATN ouvertes crânielles** incluent l'anencéphalie et la céphalocèle. **L'anencéphalie**, sans encéphale, survient entre le 20<sup>e</sup> et le 28<sup>e</sup> jour de grossesse (40), et est causée par un défaut de fermeture du tube neural crâniale au niveau du point de fermeture 2 (**Figure 5**). À cause de ce défaut de fermeture, la majorité des structures qui composent l'encéphale ne se développent pas et toute la partie crâniale restera ouverte, ce qui exposera le reste des structures incluant les structures osseuses à une dégénérescence partielle ou totale, impliquant d'autres types de malformations des systèmes osseux et nerveux (41, 42). À cause de toutes ces complications, les bébés atteints de l'anencéphalie naissent morts ou meurent peu après leurs naissances (quelques heures à plusieurs jours). Dans des cas très rares, les enfants arrivent à vivre jusqu'à 10 jours (35).

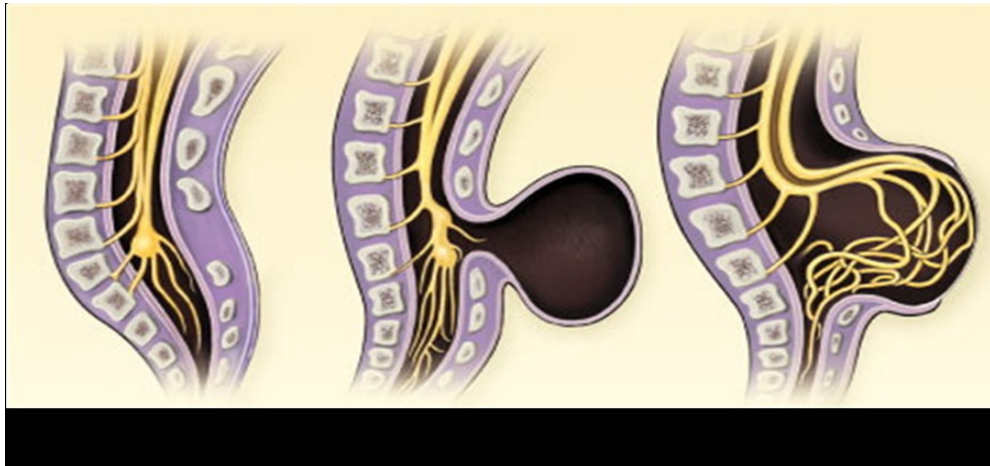
**Céphalocèle.** Bien que l'encéphalocèle soit le terme le plus couramment utilisé pour la description de ce genre de lésion, **bifidum de crâne** ou bien **céphalocèle** sont les termes qui décrivent le plus correctement le spectre des malformations qui incluent à la fois les encéphalocèles (une région du cerveau qui est herniée à travers l'os crânien) et les méningocèles crâniennes (une hernie de la dure-mère). Ce type de malformation se caractérise par des dommages dans la boîte crânienne avec des hernies au niveau de cerveau et des méninges, ce qui va former des poches contenant dans certains cas des tissus cérébraux (l'encéphalocèle). Les céphalocèles peuvent être classifiés en plusieurs sous classes selon leur lieu de formation au niveau de la boîte crânienne : frontale, médiane, dans la base de la boîte crâniale ou latérale. La majorité des céphalocèles (75 % des cas) sont occipitales. Plusieurs syndromes sont associés avec les encéphalocèles comme les trisomies 13, 18, la trisomie mosaïque 28, ainsi que les syndromes de Meckel et de Turner (42).

**Les ATN ouvertes spinales**, encore appelées les myélodysraphies ouvertes, sont des malformations qui touchent la partie spinale de la moelle épinière. Dans cette catégorie des ATN, il existe deux formes cliniques : la myéloméningocèle et la myélocèle.

**La myéloméningocèle** (signifiant épine divisée en deux), encore appelée spina bifida est la plus fréquente et la plus sévère forme des ATN spinales. Cette division cause l'absence de soudure entre les vertèbres de la colonne vertébrale dans la région touchée, causant la formation d'un sac clairement visible au niveau du dos (**Figure 7**). Dans ce sac, une quantité importante de la moelle épinière manquera la protection osseuse à cause de sa pénétration entre les espaces sous-arachnoïdiens (dans les régions non soudées), ce qui va produire des dommages pour les nerfs ainsi que pour la moelle épinière (35, 43). **La myélocèle** est une forme très rare des ATN, qui se manifeste par une hernie de la moelle épinière, caractérisée par une ouverture du tube neural qui siège au niveau lombosacré pour affecter la partie terminale de la moelle épinière et dont tous les tissus nerveux sont exposés à l'extérieur. Elle se diffère de la myéloméningocèle par l'absence d'expansion des espaces sous-arachnoïdiens.

En plus des ATN ouvertes crâniale et spinales, une forme rare d'ATN existe appelée **le craniorachischisis** qui se classe dans les deux catégories précédentes parce qu'elle touche les deux parties, crâniale et spinale, du tube neural. Cette forme clinique d'ATN est l'une des formes les plus sévères qui se caractérise par une anencéphalie et du spina-bifida dans toute la colonne vertébrale, laissant le cerveau et les nerfs de la colonne vertébrale complètement

exposés à l'environnement extérieur (liquide amniotique), ce qui conduira à leur dégénérescence. La gravité de la maladie est variable et entraîne généralement la mort avant ou peu de temps après la naissance. Souvent, d'autres défauts tels que l'anus imperforé ou l'hernie sont également associés avec cette forme d'ATN (43-45).



**Figure 7 :** Vue latérale de la moelle épinière dans trois cas d'ATN. Adaptée de Botto LD. Et al., 1999 (46).

### 1.3.2.2. Les ATN fermées

Le deuxième groupe des ATN est la forme fermée sans tissu neural visible ni fuite du liquide céphalo-rachidien (LCR). Dans ce groupe, la malformation est limitée à la moelle épinière et le cerveau est rarement touché (39). On compte plusieurs formes des ATN dans cette catégorie. Les formes les plus connues sont les suivantes :

**Le lipomyeloschisis** est aussi appelé **cauda equina lipoma** : Cette terminologie est composée de deux parties, **lipo** qui signifie graisse et **myeloschisis** qui signifie un défaut du développement caractérisé par une fente dans la moelle épinière. Le lipomyeloschisis est la forme d'ATN dont le défaut siègera dans la vertèbre dorsale où un lipome sous-cutané se forme au niveau lombo-sacré. Elle est caractérisée par une fissure en continuité avec la lumière de la colonne vertébrale. Cette forme clinique d'ATN peut être associée à un sinus dermique qui peut se terminer par un kyste épidermoïde ou dermoïde (47).

**La lipomyéломéningocèle** est l'un des lipomes spinaux congénitaux du cône médullaire. Elle est caractérisée par une moelle épinière attachée au bas du canal rachidien et se termine par une masse lipomateuse sous forme d'un sac formé des méninges sous-cutanées.

Cette masse est causée par une expansion de l'espace sub-arachnoïdien ventral menant à une protrusion postérieure de la placode, la moelle, l'arachnoïde et la dure-mère (48, 49).

**La méningocèle** représente la forme la plus rare de spina bifida où la moelle épinière dans la plupart des cas n'est pas touchée (**Figure 7**), mais les méninges sont endommagées. Ces dernières sont poussées à l'extérieure à cause d'un échec du fusionnement du tube neural à l'extrémité postérieure où certaines vertèbres sont fondues et ne peuvent plus tenir les méninges à leurs places. Tous ces événements conduiront à la formation d'une protrusion méningée qui sera couverte par la peau. Cette forme clinique est dans la plupart des cas asymptomatique et les enfants touchés par cette malformation ont des sensations normales (7, 50, 51).

**La myélocystocèle** est une lésion rare qui constitue 5 % des lésions lombo-sacrées avec un lipome. Dans cette forme clinique, causée par une dilatation de la portion terminale du canal central, un kyste à épendymocyte (de cellules gliales du système nerveux central) va se former. Ce dernier sera déconnecté de l'espace sous-arachnoïdien. Les lésions de ce type sont difficiles à identifier compliquant le diagnostic précoce (52).

**Le sinus dermique** est caractérisé par une communication bordée par l'épithélium, ouverte entre la peau et l'espace intradural de système nerveux central et qui se termine à l'intérieure d'un sac. Cette forme clinique est due à la séparation incomplète entre la peau et la moelle épinière. Elle est localisée sur la ligne médiane, à tous les niveaux de l'axe neural et elle touche 1/2500 naissances (53, 54)

**La diastématomyélie** vient du grec **diastème** (interstice) et **myélos** (moelle), ou encore appelé Split spinal cord malformation (SCM). C'est une malformation vertébrale médullaire rare et complexe qui se caractérise par un fractionnement de la moelle épinière en deux parties de dimension identique dans le plan sagittal. La moelle épinière est doublée suite au maintien d'une communication anormale entre le sac embryonnaire et l'amnios par une fistule, après la fermeture du canal neurentérique primaire. Selon l'emplacement des deux parties de la moelle épinière, la diastématomyélie est classée en deux catégories : Type 1 dans laquelle on trouve les deux hémimoelles enveloppées dans deux sacs durs séparés, tandis que pour le Type 2 les deux hémimoelles s'enveloppent dans le même sac dural. Cette forme clinique se trouve associée avec le spina-bifida dans la plupart des cas (55, 56)

**Le syndrome de régression caudale** est une forme rare d'ATN qui représente un spectre de malformations qui siège au niveau des segments inférieurs de la colonne vertébrale incluant des agénésies (absence de formation d'organe) du coccyx, des vertèbres sacrales, lombaires et même thoraciques. Ces malformations sont associées avec d'autres malformations comme l'aplasie ou l'hypoplasie des vertèbres sacrées et lombaires, la déformation du bassin (l'anus imperforé), des membres inférieures, de l'intestin postérieur et du système urogénital (57-59)

**La dysgénésie spinale segmentaire** est une anomalie spinale congénitale rare dans laquelle une partie de la colonne vertébrale (lombaire ou thoraco-lombaire) et de la moelle épinière subit une agénésie ou une dysgénésie. Elle est aussi caractérisée par une sévère cyphose ou cyphoscoliose congénitale, des anomalies focales de la moelle épinière et des racines nerveuses sous-jacentes, ainsi qu'une paraplégie et une déformation congénitale des membres inférieurs chez certains patients (60).

La dysgénésie spinale segmentaire et le syndrome de régression caudale représentent probablement deux faces d'un seul spectre de malformations segmentaires de la colonne vertébrale et de la moelle épinière (60).

Des autres types de classifications essaient d'expliquer les différents types d'ATN en se basant sur différents critères. Par exemple, la plus récente classification proposée par Nobuhito Morota en 2017 se concentre sur les lipomes spinaux et se base sur les différents changements embryonnaires observés pendant la neurulation primaire et secondaire (61).

## **1.4. Prévalence et espérance de vie des ATN**

Les malformations congénitales sont la principale cause du décès dans la première année de la vie humaine, où les nourrissons qui survivent risquent d'invalidité à long terme. Malgré les différentes voies de prévention, les ATN se considèrent toujours comme une cause importante du décès et d'invalidité permanente dans le monde entier. Chaque année, il y a plus de 300 000 à 400 000 bébés qui naissent avec des ATN à l'échelle mondiale. En Europe, environ 4 500 grossesses chaque année sont affectées par les ATN, tandis qu'aux États-Unis 2500 bébés sont affectés par ces malformations chaque année. Le plus grand nombre de cas



d'ATN enregistrés jusqu'à date est en Chine avec 100 000 nourrissons affectés chaque année (62, 63). Cependant, ces estimations peuvent être affectées en raison du manque de données, en particulier dans les pays à faibles ressources. Ce manque de données découle de la variabilité, l'absence de registres d'état civil, la capacité de diagnostiquer ces anomalies congénitales et enfin l'absence d'un système de surveillance bien établi pour ce genre de défauts de naissance. Ces malformations se produisent partout dans le monde dans différentes populations et zones géographiques avec différents niveaux du développement socioéconomique (62). À cause de l'étiologie complexe des ATN, ces derniers se diffèrent d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre. Les différences culturelles et éducatives (par exemple ne pas savoir qu'il faut prendre des suppléments d'acide folique dans des régions rurales) ainsi que l'exposition à différents facteurs environnementaux pourraient expliquer la différence existante entre ces différentes régions, comme c'est le cas par exemple entre certaines régions rurales au nord de la Chine où la prévalence est presque 10 fois plus élevée qu'aux certaines régions aux États-Unis (64, 65). L'espérance de vie varie entre des heures et des années selon le type d'ATN et en raison des progrès de la technologie médicale, l'espérance de vie des patients atteints de spina bifida par exemple augmente chaque année, avec 85% à 90% des enfants nés avec cette maladie survivant jusqu'à l'âge adulte (63).

## 1.5. Syndromes associés aux ATN

Plusieurs maladies et syndromes sont associés aux ATN, parmi lesquelles on trouve le syndrome de **Meckel** caractérisé par des reins polykystiques, le syndrome de **Walker-Warburg** qui se caractérise par des défauts au niveau des muscles et des yeux et le syndrome de **Knobloch** qui se caractérise par une dégénération des vitreaux réiniens et musculaires associée à une anencéphalie occipitale (13, 66). Ainsi, le dysfonctionnement de certains gènes impliqués dans le syndrome de **Bardet-Biedl** (BBS) chez les souris conduit aux mêmes phénotypes que ceux trouvés chez des mutants de la voie PCP, y compris les ATN (exencéphalie) (13). D'autres syndromes qui sont associés aux ATN incluent le syndrome du **complexe d'ADAM**, un défaut sporadique d'origine inconnue, qui cause une malformation du crâne et des membres. Il s'agit d'une fusion fibreuse unissant la membrane du sac amniotique à l'embryon à cause d'une inflammation de la membrane et du liquide amniotique qui entourent l'embryon. Cette malformation pourrait être à l'origine de certaines amputations dans

l'embryon ou laisser des traces (sillons) sur ses doigts ou ses orteils. Les ATN sont aussi associées à des anomalies chromosomiques telles que les trisomies 13, 18, et la trisomie mosaïque 28 dans le syndrome de Meckel, ainsi que la monosomie du chromosome X chez syndrome de **Turner** (42, 67).

## **1.6. Diagnostic anténatal des ATN**

La fermeture du tube neural se produit très précocement entre le 21<sup>e</sup> et le 28<sup>e</sup> jour de la gestation humaine. Par conséquent, le dépistage des ATN à ce stade représentait un grand défi à cause de la petite taille de l'embryon de ~ 2 mm. Les avancements technologiques et le développement de la recherche ont significativement amélioré le diagnostic anténatal des ATN. Plusieurs types d'ATN sont détectés à des étapes précoces du développement embryonnaire, en utilisant des techniques de dépistage prénatal intégré où on combine des techniques échographiques avec des analyses sanguines.

### **1.6.1. Biomarqueurs présents dans le sérum maternel**

Plusieurs marqueurs sont testés à partir de sérum maternel afin d'évaluer le risque du bébé à présenter des ATN. Depuis plusieurs années, **l'alpha-foetoprotéine** (AFP) est utilisé comme un marqueur efficace pour les ATN. L'AFP est une glycoprotéine qui est produite dans le sac vitellin et le foie et se retrouve normalement dans le sérum maternel à des concentrations de 0.20 ng/mL (hors grossesse) qui augmente à environ 250 ng/mL au cours de la 32<sup>e</sup> semaine de grossesse. Dans les fœtus qui présentent des ATN, la concentration de l'AFP augmente dans la circulation maternelle jusqu'aux 2,5 fois de sa valeur pour l'âge gestationnel au moment du prélèvement. Ce biomarqueur est utilisé pour les ATN ouverts avec un taux de détection de l'anencéphalie supérieur à 95 % et des autres ATN ouvertes à 65- 80 %, avec une marge d'erreur entre 1 et 3 % (68, 69). **L'acétylcholinestérase** est une enzyme spécifique du tissu nerveux qui n'est pas présente normalement dans le liquide amniotique. Dans le cas des ATN ouvertes, cette enzyme est détectée dans le liquide amniotique (comme le liquide céphalo-rachidien ou LCR coule de tube neural ouvert dans le liquide amniotique). Le test de détection de l'acétylcholinestérase est réalisé par une électrophorèse des protéines du liquide amniotique sur un gel polyacrylamide à partir de la 16<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée (70). Ces deux biomarqueurs sont utilisés pour la détection des ATN ouverts à cause du contact direct entre les tissus nerveux du fœtus et le liquide amniotique. Dans le cas des ATN fermées, le

dépistage biochimique n'est pas efficace à cause de l'absence de contact entre le liquide amniotique et le système nerveux central (69, 70).

**1.6.2. L'échographie.** Cette technique d'imagerie utilise des ultrasons pour donner des images en temps réel et permet au médecin d'examiner avec précision l'anatomie des embryons. Elle a connu des développements considérables pendant les 30 dernières années. L'échographie traditionnelle 2D a largement remplacé la technique de dépistage par le biomarqueur maternel AFP. En suivant des normes bien déterminées par des politiques nationales de dépistage, certains pays européens ont atteint un taux de dépistage prénatal de 88 % après le développement énorme des techniques d'échographie où l'âge gestationnel et le type d'ATN sont des facteurs importants qui influencent grandement les taux de détection. Dès le premier trimestre, des échographies réalisées sur les embryons peuvent atteindre généralement des taux de détection > 90 % pour l'anencéphalie et 80 % pour l'encéphalocèle. Pour le spina bifida, les taux de détection par l'échographie pendant le premier trimestre sont faibles (44 %), mais ils peuvent être améliorés à 92-95% au deuxième trimestre où une deuxième échographie sera réalisée (69).

Il existe trois types d'échographie. **L'échographie 2D** est la méthode la plus utilisée de nos jours pour examiner en détails l'anatomie du bébé en 2D. Cependant, cette technique présente des limitations telles que des artefacts de réverbération provenant des os du calvarium et une faible sensibilité en cas des malformations cérébrales (notamment en rapport avec la maturation corticale) (69, 71). **L'échographie 3D** est une technique qui se base sur la technologie 2D et qui permet de voir les embryons en volume. Cette image est construite par ordinateur qui utilise 150 positions du faisceau en 2D pour reconstruire l'image en 3D pour donner des vues plus claires de la colonne vertébrale (une vue de haut et une vue avec une section sagittale). Pour obtenir la meilleure vue possible, la région d'intérêt doit être bien choisie pour inclure la longueur maximale de la colonne vertébrale, tandis que l'angle de balayage peut être réduit entre 35° à 40° en améliorant la résolution latérale et le temps d'acquisition (69, 72). **L'échographie 4D** inclut une 4<sup>e</sup> dimension qui est le temps. En combinant des images provenant de la technique 3D et la dimension du temps, cette technique produira des vidéos. Un balayage 3D statique fournira toujours plus de détails qu'un vidéo 4D,

puisque les structures en mouvement ne seront pas très bien examinées dans ce dernier. Par contre, utiliser le mode 4D squelettique a l'avantage de permettre des ajustements en temps réel des réglages d'image, en particulier le réglage précis du gain, du seuil et de l'angle d'acquisition. Ce dernier est utilisé pour éviter l'artefact d'ombre des membres fœtaux ou de l'os pelvien (69).

**1.6.3. L'imagerie par Résonance magnétique.** Les différents types d'échographie sont réalisés pour détecter les éventuelles malformations à environ 20 semaines de gestation. L'échographie permet une évaluation précise du tube neural. L'imagerie par résonance magnétique fœtale (IRM), une technique qui utilise les propriétés quantiques des noyaux atomiques, nous permet de confirmer l'anomalie suspectée par l'échographie et détecte ainsi les malformations qui n'ont pas été détectées à l'échographie. L'information supplémentaire fournie par l'IRM peut entraîner des changements dans la prise en charge de la grossesse et/ou de l'avortement. (73, 74)

## 1.7. Étiologie des ATN

Les ATN sont des malformations complexes et multifactorielles, impliquant des facteurs génétiques et environnementaux qui restent mal connus jusqu'à date.

### 1.7.1. Les facteurs environnementaux

Le facteur environnemental le plus important jusqu'à date qui affecte le risque pour les ATN est l'acide folique (vitamine B9) avec son effet protecteur. Cet effet a été découvert depuis plus de 30 ans par le travail de Smithells et al. mené sur plus de 900 femmes enceintes. Cette étude a montré que les régimes alimentaires et le sang post-partum des femmes qui avaient accouché un fœtus avec une ATN étaient déficients en plusieurs micronutriments, en particulier **les folates** (75). Les petits essais non randomisés réalisés chez les femmes qui avaient déjà eu des grossesses affectées par des ATN ont montré que la prise d'acide folique ou des multivitaminés contenant des folates pendant la période périconceptionnelle entraînait une réduction approximative du risque des ATN (76). Plusieurs études ont démontré qu'une consommation périconceptionnelle de cette vitamine peut diminuer l'incidence des ATN

jusqu'à 70 % (76, 77). L'acide folique est une vitamine hydrosoluble très importante dans la méthylation de l'ADN, où il joue un rôle d'accepteur et de donneur des radicaux méthylés pour assurer la synthèse des nucléotides purines (adénine et guanine) (76, 78). L'administration de l'acide folique se fait généralement sous forme de comprimé (0,4 mg tous les jours). Suite à un grand nombre d'études démontrant un effet protecteur de l'acide folique contre les ATN, Le Canada a commencé à enrichir plusieurs produits alimentaires avec de l'acide folique, comme les pâtes qui contiennent 0,20 à 0,27 mg d'acide folique pour 100 g, la farine qui contient 0,15 mg pour 100 g. Cette stratégie d'enrichissement obligatoire a mené à une grande diminution des taux d'ATN au Canada (77, 79).

Les mécanismes par lesquels l'acide folique protège contre les ATN restent inconnus. Deux études ont été réalisées en 2004 et 2009 sur la présence des anticorps contre les récepteurs des folates sur la membrane placentaire. La première étude a montré que 70 % des grossesses affectées par les ATN produisent ces anticorps spécialement sur la membrane placentaire empêchant la liaison de l'acide folique et son absorption par la membrane placentaire. La deuxième étude a été réalisée sur des femmes enceintes irlandaises et n'a montré aucune association entre la présence de ces anticorps et les grossesses affectées par des ATN. Actuellement, les recherches sont toujours en cours pour mieux comprendre les facteurs qui affectent les différentes voies d'absorption de l'acide folique, son transport, son métabolisme ainsi que son rôle dans la pathogenèse des ATN (80-82).

D'autres facteurs environnementaux reliés à la santé maternelle augmentent le risque pour les ATN. L'obésité maternelle est considérée comme un facteur de risque important pour les ATN où les femmes appartenant aux catégories d'indice de masse corporelle avant la grossesse supérieur à  $\geq 29 \text{ kg/m}^2$  présentent un risque de 1,5 à 3,5 fois plus élevé que les femmes ayant des indices inférieurs à cette valeur. L'obésité est un facteur principal de diabète qui est considéré à son tour comme un facteur de risque pour les ATN (83, 84). Des recherches ont démontré également que l'hyperthermie maternelle augmente le risque d'avoir un enfant atteint d'ATN jusqu'au double (83, 85). Plusieurs autres facteurs de risque pour les ATN existent, mais nécessitent des recherches plus approfondies pour établir leurs relations avec les ATN. Ces derniers incluent les aliments contaminés par des fumonisines (une classe de mycotoxines émise par des champignons), les différents champs électromagnétiques, les

sites de déchets dangereux, les pesticides utilisés dans l'agriculture, le chlorure utilisé pour la désinfection dans l'eau potable, le stress maternel qui nécessite un soutien social (83) et enfin, l'alcool et la cigarette qui ont aussi des effets néfastes sur l'incidence des ATN (86).

### **1.7.2. Les facteurs génétiques**

Plusieurs évidences indiquent l'existence d'une composante génétique associée aux ATN. L'un des arguments les plus forts pour un rôle important des facteurs génétiques dans l'étiologie des ATN est le risque plus élevé d'avoir des ATN pour les frères et sœurs, après avoir une grossesse affectée. Ce risque est de 10 à 50 fois comparativement à la population en général. (9, 35). Des autres évidences incluent l'association des ATN avec des anomalies chromosomiques, où environ 6.5 % des ATN sont associées avec les trisomies 13 et 18, et 5-17 % sont associées avec l'aneuploïdie (35). Plusieurs syndromes génétiques sont aussi associés avec les ATN tels qu'il est déjà indiqué dans la section 1.5.

Les ATN sont des maladies complexes avec une héritabilité estimée à 60 % qui n'est pas basée sur un modèle mendélien, mais sur un modèle multifactoriel oligogénique. Dans ce modèle, plusieurs gènes interagissent entre eux et avec plusieurs facteurs environnementaux afin de moduler l'incidence et la pénétrance de la maladie. Des mutations dans plus que 200 gènes sont connues pour causer des ATN chez les souris (87-89). La plupart des études génétiques sur les ATN chez l'humain se concentrent sur deux grands axes : les gènes de la voie métabolique des folates et les gènes candidats inférés des souris modèles.

Le mécanisme exact par lequel la consommation maternelle d'acide folique périconceptionnelle empêche certaines ATN de se former reste incertain. Cependant, de nombreuses études ont montré une augmentation dans la concentration des folates (indispensables à la synthèse des nucléotides purine) à la fois dans les globules rouges et dans le sérum sanguin en réponse à une augmentation de l'apport d'acide folique. La variation génétique du métabolisme de la folate due à un polymorphisme d'un nucléotide simple (Single Nucleotide Polymorphism - SNP), c.677C>T au niveau du gène *MTHFR* (méthylène-tétrahydrofolate réductase) s'est associée à une diminution des concentrations en folate dans les globules rouges maternels avec un risque accru de défauts du tube neural (89-91). Ce SNP a été associé avec une diminution de l'activité enzymatique de *MTHFR*. Le gène *MTHFR*

représente un excellent candidat pour les ATN, car il code pour un enzyme responsable de régulation des niveaux des folates disponibles pour la re-méthylation de l'homocystéine (une étape importante du cycle des folates). Une autre mutation dans ce gène, c.1298A>C, a été aussi associée avec une diminution de l'activité enzymatique de MTHFR et un risque élevé pour les ATN (90, 92). Deux autres SNPs, c.2756A>G et c.66A>G, identifiés respectivement dans *la méthionine synthèse* et *la méthionine synthétase réductase* qui sont aussi impliqués dans le métabolisme des folates, étaient associés aux ATN (93, 94).

Malgré toutes ces données sur des associations génétiques entre la voie du métabolisme de l'acide folique et les ATN chez l'humain, les différents mécanismes qui gèrent le métabolisme des folates via la supplémentation par l'acide folique pour diminuer les risques de développement des ATN restent inconnus. Par exemple, la souris knockout pour le gène *Mthfr* présente une hyper-homocystéinémie (due au dysfonctionnement de l'enzyme *Mthfr*) et une diminution dans la capacité de méthylation, mais en même temps cette souris ne développe aucune forme d'ATN même si elle est privée de l'acide folique (95).

À cause de leurs grandes portées, leurs courtes durées de gestation, leurs grandes similarités anatomiques aux mammifères surtout au niveau de la neurulation pendant la formation de tube neural et enfin la grande similarité de leur génome avec le génome humain, les souris modèles représentent des outils puissants qui nous aident à mieux comprendre les ATN chez les humains (96). Plusieurs gènes ont été identifiés chez les souris modèles des ATN incluant des gènes de la voie de la polarité cellulaire planaire (*Vangl2*, *Celsr1*, *Scribble1*), des gènes du cytosquelette (*shroom*, *vinculin*, *mena* et *palladin*), des gènes contrôlant la différenciation neuronale (*Neurofibromine 1* et *Paired box 3*), des gènes du cycle cellulaire (ex. la *Phosphatase et régulateur de l'actine 4*), des gènes liés à l'apoptose (*B cell lymphoma/leukemia- 10*, les *kinases IκB 1 et 2*), des gènes de transduction du signal (les *kinases JNK* et la *kinase C riche en alanine myristilée*) et d'autres gènes des voies de signalisation, incluant *Notch*, *Shh* et les *BMP* qui contrôlent la fermeture du tube neural (Chapitre 1.2.2). Des études génétiques et moléculaires sur des homologues de ces gènes causant des ATN chez la souris modèle ont été effectuées chez de patients humains atteints des ATN, mais aucun gène majeur prédisposant aux ATN n'a été identifié. Ce qui confirme que ces malformations sont des maladies complexes et multifactorielles chez l'humain.

Plusieurs études ont été réalisées sur les souris mutantes, pour comprendre la relation entre les gènes de la voie PCP et le phénomène de la fermeture du tube neural (section 1.8). Ces études ont confirmé un rôle important de cette voie dans le phénomène de la fermeture du tube neural et donc sa relation avec les pathologies des ATN. Des mutations ont été identifiées sur plusieurs gènes de cette voie *Celsr1*, *Ptk7*, *Vangl2* et *Scribble1* (**Section 1.7.1**) et qui causent la forme la plus sévère des ATN, la craniorachischisis, ainsi que pour les doubles knockouts de *Dvl1/ Dvl2*, *Dvl2/ Dvl3* et *Fz3/Fz6* et pour les doubles hétérozygotes *Vangl2:Scrib1* et *Vangl2:Dvl3* (82, 97, 98).

Chez l'humain, plusieurs études ont aussi confirmé l'association de la voie PCP avec les ATN, trois nouvelles et rares mutations, p.Val239Ile, p.Arg274Gln et la p.Met328Thr, étaient identifiées, incluant une mutation *de novo* (p.Val239Ile) qui affecte l'interaction de VANGL1 avec ces partenaires Dishevelled (Dvl) 1, 2 et 3. Des études de validation fonctionnelle ont été réalisées sur les poissons zèbres et qui ont montré que deux (p.Val239Ile et p.Met328Thr) des trois mutations affectent le phénomène de la CE à cause d'une perte de fonction qui affectent l'activité de la protéine au cours du développement embryonnaire. Plusieurs autres études ont suivi cette étude, réalisées sur une plus grande cohorte de différentes origines ethniques et ont identifié 5 autres mutations sur le gène *VANGL1* (33, 99, 100). D'autres études menées sur *VANGL2*, *CELSR1*, *PRICKLE1*, *FZ6* ont identifié des mutations rares dans ces gènes dans différentes cohortes de patients atteints d'ATN (101-103). Toutes ces études appuient l'hypothèse que les gènes de la voie PCP sont impliqués dans le phénomène de la fermeture du tube neural et donc dans la pathogenèse des anomalies de tube neural (104, 105).

Bien qu'il existe plusieurs preuves d'une forte composante génétique dans l'étiologie des ATN, la nature de ces gènes de risque, leur interaction mutuelle, leur nombre chez un individu affecté, et le degré de leur partage par les différentes populations restent largement indéterminés (106-110).

## **1.8. Les souris modèles pour les ATN**

Les souris mutantes qui présentent des défauts de neurulation nous ont fournis des modèles puissants afin d'examiner les mécanismes pathogéniques sous-jacents ainsi que les



processus et les interactions génétiques moléculaires qui contrôlent la fermeture du tube neural (111). Le nombre de souris mutantes qui présentent des ATN continue d'augmenter régulièrement, passant de 200 en 2007 à environ 245 en 2010, dont 205 représentent des gènes spécifiques, 30 des gènes non identifiés et 9 sont des souches multifactorielles (96, 112). Dans les paragraphes suivants, je décrirai deux souris mutantes de la voie PCP, *Looptail* et *Circletail*, qui sont particulièrement pertinentes pour mon projet.

**La souris mutante looptail (Lp)** a été décrite la première fois en 1949 par L.C. Strong et W. F. Hollander (113). Les souris hétérozygotes (*Lp/+*) ont une queue complètement déformée ou en boucle (d'où leur nom) et montre un mouvement désordonné de la tête. Tandis que les souris homozygotes (*Lp/Lp*) meurent in utero à cause d'une forme très sévère d'ATN, la craniorachischisis, qui résulte d'un défaut de fermeture du tube neural au site de fermeture 1 (section 1.3.2) (114).

En utilisant le clonage positionnel et la complémentation fonctionnelle chez des souris mutantes, le gène muté chez la souris *Lp* a été identifié sur le chromosome 1 sous le nom de *Vangl2*, qui code pour une protéine membranaire hautement hydrophobe (97, 115). La protéine *Vangl2* est composée de 521 acides aminés répartis sur quatre domaines transmembranaires et deux domaines extra membranaires (cytoplasmique) N-terminal et C-terminal intra cellulaire (97, 116, 117).

**La souris mutante Circletail (Crc)** montre une queue en forme de cercle d'où vient son nom (118). Cette mutation est apparue d'une façon spontanée lors de la construction d'une lignée transgénique contenant un minigène de la tyrosinase dans son génome (qui n'a aucun lien avec les ATN) (111). Deux phénotypes sont associés à cette souris, le défaut de la queue en forme de cercle chez les hétérozygotes et la sévère ATN de craniorachischisis chez les souris homozygotes (118). Ainsi, toutes les souris mutantes *Crc* homozygotes présentent également une gastroschisis (ouverture de ventre) (119).

Cette mutante a été cartographiée sur une région de 8.8 cM (centimorgan) sur le chromosome 15 entre les marqueurs D15Mit93 et D15Mit68. Une stratégie de clonage positionnel a identifié *SCRIBBLE1* (*Scrib1*) comme le gène muté chez les *Crc* (111, 120). Le séquençage de la région codante du gène *Scrib1* dans cette souris a révélé une insertion d'une

base unique de Cytosine - C - entre les positions 3182-3183 qui a créé un décalage du cadre de lecture et une terminaison prématurée de la protéine. Les différentes études d'expression de la protéine Scrib1 montre une réduction de 50 % dans les souris hétérozygotes *Crc/+* et une absence totale de la protéine dans les souris homozygotes *Crc/Crc* (111, 121, 122)

## **1.9. SCRIBBLE1 (*SCRIB1*)**

### **1.9.1. Le gène *Scribble1***

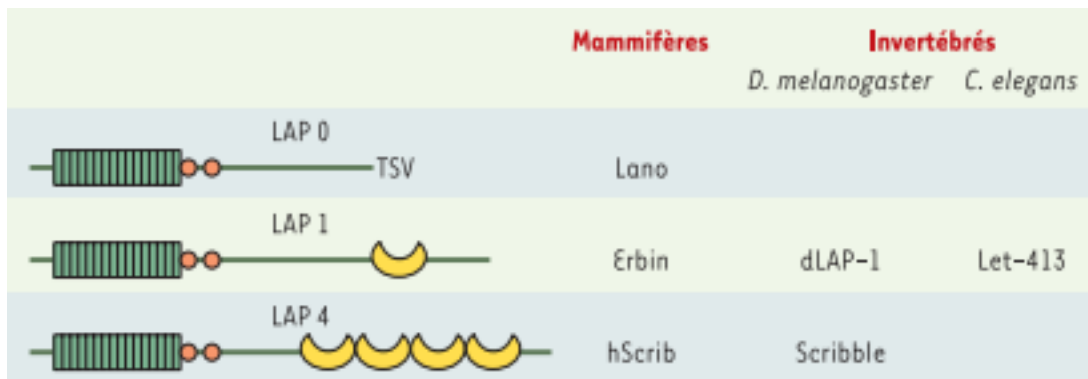
*Scrib* est un gène suppresseur de tumeur qui a été d'abord identifié comme un suppresseur de tumeur néoplasique chez la *Drosophile*. Chez l'humain, le gène *SCRIB1* a été découvert comme une cible pour être dégradé par les protéines E6 du papillomavirus humain (HPV) et la protéine ligase E6AP, qui ciblent également la protéine DLG1 humaine. Les carcinomes cervicaux sont couramment associés au HPV et présentaient une expression réduite de la protéine SCRIB1 et DLG1(123). Ce gène est aussi impliqué dans la polarité apicobasale (A-B) qui déterminera deux régions de la cellule, apicale et basolatérale dans l'axe apicobasal et qui semble être une exigence fondamentale dans une large gamme de fonctions cellulaires (124, 125). Chez la *drosophile*, le gène *Scrib* comprend 53 kb d'ADN génomique unique qui se positionne entre les nucléotides 197.179 et 256.157 sur le chromosome 3 R selon le contig de Celera génomique (AE003756). Ce gène code pour deux isoformes de protéine qui résultent de phénomène d'épissage alternatif, *Scrib1* qui présente le long transcrit et qui est composé de 23 exons avec ARN messenger de 5,268 kb et *Scrib2* qui présente le court transcrit et qui est composé de 14 exons dont les 13 premiers sont identiques à ceux du grand transcrit avec un ARN messenger de 3,429 kb (126, 127).

Chez la souris, ce gène se localise sur le chromosome 15 où il se positionne entre les nucléotides 760.471.62 et 760.697.84 (NC\_000081.6) pour couvrir une région de 22,622 kb et comprend 38 exons avec un ARN messenger de 5,599 kb de taille (111, 120). Selon le NCBI, 6 isoformes (5,599 kb, 5,545 kb, 5,440 kb, 3,071 kb, 0,423 kb, 0,353 kb) de *Scrib1* existent jusqu'à date chez la souris. Tandis que chez l'humain, le gène *SCRIB1* est composé de 37 exons qui couvrent une taille de 24,460 kb en positions 143, 790,920- 143, 815,379 du chromosome 8. Son ARN messenger est d'une taille de 5,276 kb. Selon le NCBI, 5 isoformes

(5,218 kb, 5,143 kb, 5,108 kb, 2,189 kb, 0,421 kb) de *SCRIB1* existent jusqu'à date chez l'humain.

### 1.9.2. La protéine Scribble1

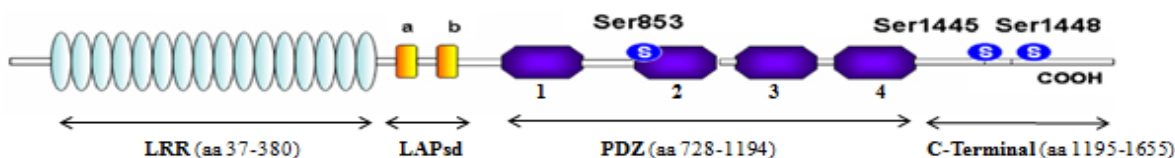
Scrib1 est une protéine cytosolique d'échafaudage qui peut être ciblée à la membrane à cause de son interaction avec plusieurs protéines membranaires. Elle appartient à une famille de protéines connue sous le nom des protéines LAP (*LRR AND PDZ*), contenant des domaines LRR et PDZ (PSD-95/Disc-large/ZO-1) (**Figure 8**). Les membres de cette famille sont uniques, car ils partagent les mêmes domaines dans leur structure, les domaines LRR (Leucine Rich Repeats) du côté N-terminale chacun constitué de 20-29 motifs d'acides aminés en forme de fer à cheval pour assurer les interactions protéine-protéine. Ces domaines sont en nombre de 16, suivis par des motifs LAPsd (LAP specific domain) suivis à leurs tours par des domaines PDZ (PSD-95 /Dlg /ZO-1). Les domaines PDZ ont une structure globulaire compacte dont le repliement est un baril de six brins  $\beta$  ( $\beta$ A- $\beta$ F) encadré par deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A et  $\alpha$ B). Ces domaines se retrouvent au niveau protéique pour assurer deux rôles principaux, la localisation des protéines et la régulation des voies de signalisation. Selon le nombre de domaines PDZ (0, 1 ou 4), les protéines LAP sont classées en trois classes LAP0, LAP1 et LAP4 (**Figure 8**) (128, 129).



**Figure 8** : Schéma présentatif de la structure générale des protéines LAP, **Lano**, **Erbin** et **hScrib**. Ces derniers possèdent 16 motifs LRR (rectangles verts), un domaine LAPSD a et b (cercles orange) et enfin des domaines PDZ (croissants jaunes), à l'exception de la protéine Lano qui ne contient pas des domaines PDZ. Adaptée de Jaulin-Bastard Et al., 2005 (129).

Chez la *Drosophile*, la protéine Scrib existe sous deux isoformes (tel que mentionné dans la section 1.9.1) : Scrib1 composé de 1756 acides aminés qui comporte toutes les parties de la protéine Scrib LRR, LAPsd, PDZ et la partie C-terminale et Scrib2 composé de 1247 acides aminés et qui perd les deux domaines PDZ 3 et 4 ainsi que la partie C-terminale à cause du phénomène de l'épissage alternatif pendant la transcription (126). Chez la souris, la protéine Scrib1 présente 44 % d'identité avec la protéine Scrib de la *Drosophile* et elle est moins longue que cette dernière. Elle comporte 1665 acides aminés et elle contient toutes les parties LRR, LAPsd, PDZ et la partie C-terminale(120).

Chez l'humain, la protéine SCRIB1 fait partie de la famille LAP4 et présente 88 % d'identité avec la protéine Scrib1 de la souris. Elle est composée de 1655 acides aminés repartis sur trois domaines LRR, LAPsd et PDZ, avec une partie C-terminale constituée de 436 acides aminés et qui représente la partie la moins conservée à travers l'évolution (120, 129, 130). Il a été rapporté que hScrib1 contient trois sites KIM (Motif d'Interaction de Kinase) où la protéine kinase ERK (Extracellular signal-regulated kinases) se lie pour assurer la phosphorylation de la protéine, deux dans la partie C-terminale en position 1445 et 1448 et un dans le domaine PDZ2 à la position 553 (**Figure 9**) (131).



**Figure 9 :** Schéma représentatif de la structure générale de Scrib1 chez l'humain. Les répétitions LRR (ovales bleus), LAPSD a et b (carrée jaune), les domaines PDZ (les quatre hexagones violets) et enfin la région C-terminal. Les résidus S853, S1445 et S1448 ont été identifiés comme sites de phosphorylation (les petits cercles bleus). Adaptée de K Nagasaka Et al., 2010 (131).

### 1.9.3. L'expression de *Scribble1*

Comme mentionné dans la section 1.9.1, *Scrib1* est un gène suppresseur de tumeur qui a été établi comme un acteur clé dans la polarité A-B. Il est situé à la membrane basolatérale des cellules épithéliales dans toutes les espèces dans lesquelles il est exprimé.

Chez la *drosophile*, l'expression de *Scrib1* est omniprésente depuis le début de la formation du blastoderme jusqu'à l'élongation de la bande de germe. Ensuite, *Scrib1* devient préférentiellement exprimé dans les neuroblastes et plus particulièrement dans le système nerveux central (SNC) en développement. Mais pendant les étapes tardives de l'embryogenèse, *Scrib1* est de moins en moins exprimé où il sera limité à un certain nombre de cellules ou de tissus, y compris le cordon nerveux ventral et d'une façon plus basse dans d'autres structures épithéliales et fibres musculaires (124, 126, 130).

En plus de *Scrib1*, l'expression de *Scrib2* correspond à celle de *Scrib1* pendant les premières étapes de l'embryogenèse, avec une différence remarquable où *Scrib2* est principalement distribué de côté basal au niveau des cellules de blastoderme, au contraire à la protéine *Scrib1* qui est d'abord localisée dans le domaine apical et ensuite elle gagnera le domaine basolatéral. En revanche, pendant les étapes avancées de l'embryogenèse, la distribution des deux protéines est complètement différente et l'exemple le plus évident de cette différence est au niveau du SNC où *Scrib2* est principalement localisé dans les corps de cellules neuronales contrairement au *Scrib1* qui est généralement localisé dans les axones (126). Des mutations nulles dans le gène *Scrib1* provoquent un certain niveau de désorganisation au niveau épithélial menant à une croissance néoplasique chez la *drosophile* (122, 132).

Chez la souris, *Scrib1* est exprimé à partir du jour embryonnaire E7.5, mais au moment de la fermeture du tube neural (jour E8.5), l'expression la plus intense est détectée au niveau des cellules neuroépithéliales, ce qui peut expliquer le phénotype d'ATN (craniorachischisis) observé chez les souris mutantes *Crc* (Section 1.8). À ce stade, une expression moins intense a été détectée dans le mésenchyme crânien et les arcs branchiaux, ainsi que dans le mésoderme somatique. *Scrib1* est également observé au niveau du cœur en développement et dans le foie primordial. Au cours des stades ultérieurs du développement, *Scrib1* est exprimé dans l'épithélium des paupières, en particulier dans la région de la fusion des paupières et dans la rétine. Il est également exprimé dans les glandes sous-maxillaires, les follicules de la moustache et des cheveux, les ganglions sympathiques et dans l'oreille interne en développement. Enfin, *Scrib1* est exprimé dans d'autres tissus incluant le thymus, les testicules, les reins, le revêtement épithélial de l'œsophage et l'estomac, le ganglion trigéminal et rachidien et l'épithélium pulmonaire. L'expression de *Scrib1* a été détectée dans tous les

tissus dans lesquels un phénotype a été détecté dans la souris mutante *Crc* (Section 1.8), bien que tous les sites d'expression de *Scrib1* ne présentent pas un phénotype mutant, suggérant peut-être une redondance avec d'autres gènes ou homologues co-exprimés, qui récompensent le manque de la protéine *Scrib1* dans ces tissus non atteints (120).

#### **1.9.4. *Scribble1* et le système nerveux central (SNC)**

*Scrib1* est exprimé dans la plupart des régions du cerveau et la moelle épinière, y compris le cortex cérébral, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le thalamus, le cervelet, l'amygdale et le mésencéphale. Au niveau cellulaire, *Scrib1* est exprimé dans les cellules pyramidales CA1 et CA3, les cellules granuleuses et certains interneurons comme il est également bien présent dans les cellules astrocytaires. Par contre il ne s'exprime pas d'une façon significative dans les oligodendrocytes. De plus, *Scrib1* est présent dans le soma et les neurites des cellules neuronales et il est associé à des compartiments liés à la membrane et d'autres organites dans le cytoplasme des neurones pyramidaux CA1. À ce niveau, *Scrib1* joue un rôle dans la polarité neuronale en régulant la croissance des neurites et la différenciation des neurones, où il interagit avec d'autres protéines comme Rac1 et  $\beta$ -pix. Au niveau synaptique, bien que *Scrib1* puisse être présent au bouton présynaptique, il est fortement enrichi aux épines et particulièrement au niveau des densités post synaptiques (PSD) (121). Dans ces derniers, *Scrib1* assure l'entretien et la différenciation post synaptique, où il interagissait avec le complexe Cadhérine- $\beta$ -caténine pour coordonner le recrutement des vésicules au niveau post synaptique. Des études ont montré que la suppression de *Scrib1* dans une culture des neurones de l'hippocampe induit la distribution diffusée de vésicules synaptiques le long de l'axone, confirmant le rôle crucial de *Scrib1* au niveau synaptique (133).

#### **1.9.5. Rôle de *Scribble1* pendant le phénomène de l'extension convergente et migration des neurones**

Chez le poisson-zèbre, il existe deux formes de *Scrib1* selon sa période d'expression, la forme zygotique et la forme maternelle. Des allèles zygotiques modifiés de *Scrib1* sont viables chez les poissons-zèbres permettant les études fonctionnelles de cette protéine. Une étude par Hironori Wada et al. en 2005 a démontré que *Scrib1* est impliqué dans le phénomène de

l'extension convergente (EC) et qu'une mutation (I731N) au niveau du domaine PDZ1 de la protéine Scrib1 maternelle conduit à des défauts dans l'EC au début de la gastrulation. D'autres mutations et délétions au niveau de ce gène ont conduit aussi à des perturbations dans ce processus ainsi que dans d'autres phénomènes comme la migration neuronale. Il a été aussi démontré que l'interaction de *Scrib1* avec *Vangl2* (Section 1.8) chez les poissons-zèbres contribue à la régulation de la gastrulation (134).

### **1.9.6. Rôle de *Scribble1* dans la migration cellulaire et le guidage axonale**

La protéine Scrib1 est localisée au niveau des membranes basolatérales, et sa suppression altère les jonctions adhérentes des cellules épithéliales MDCK facilitant le phénomène de la migration cellulaire. En l'absence de la protéine Scrib1, les cellules acquièrent une apparence de cellules mésenchymateuses et migrent plus rapidement et de manière aléatoire (135). Il a été aussi démontré que la protéine Scrib1 interagit avec  $\beta$ -PIX, un facteur d'échange de nucléotides de guanine pour les petites GTPase Rac et Cdc42. Cette dernière contrôle la polarité cellulaire de la levure jusqu'aux mammifères lors de la division cellulaire asymétrique et de la polarisation des cellules épithéliales, ainsi que lors de la migration cellulaire. Plus particulièrement, Cdc42 est nécessaire pour la polarisation et l'orientation des astrocytes.

Une réduction de l'expression de la protéine Scrib1 par des petits ARNs interférents (siRNA) ou l'expression de constructions négatives dominantes empêche la polarisation d'astrocytes. Comme Cdc42, la protéine Scrib1 contrôle la formation de protrusions cellulaires, la polarisation du cytosquelette et la réorientation du centrosome et de l'appareil de Golgi. Scrib1 interagit et colocalise avec  $\beta$ -PIX et les deux sont recrutées dès l'initiation de la migration au front de migration des cellules épithéliales et des astrocytes. La perturbation de la localisation de Scrib1 ou de l'interaction Scrib- $\beta$ -PIX inhibe le recrutement polarisé de  $\beta$ -PIX. Des études ont démontré aussi que le  $\beta$ -PIX est nécessaire pour la polarisation des astrocytes et que le motif de liaison de Scrib1 et l'activité GEF (Guanine exchange factor) du  $\beta$ -PIX sont essentiels à sa fonction, ainsi les protéines Scrib1 et  $\beta$ -PIX contrôlent l'activation et la localisation Cdc42 pendant la polarisation des astrocytes. Enfin, la protéine Scrib1 régule le

recrutement d'APC et de Dlg1 dépendants de Cdc42 au front des cellules lors de la migration cellulaire, pour favoriser l'orientation des cellules (135, 136).

Toutes ces informations nous mènent à la conclusion que la protéine Scrib1 joue un rôle clé dans l'établissement de la polarité cellulaire pendant la migration. En interagissant avec  $\beta$ -PIX, Scrib1 contrôle la localisation et l'activation de la petite GTPase Cdc42 et régule les voies de polarisation dépendantes de Cdc42 (136). En plus, il a été démontré que *Scrib1* et *Vangl2* interviennent dans la migration des neurones au niveau du neurone moteur nVII (137).

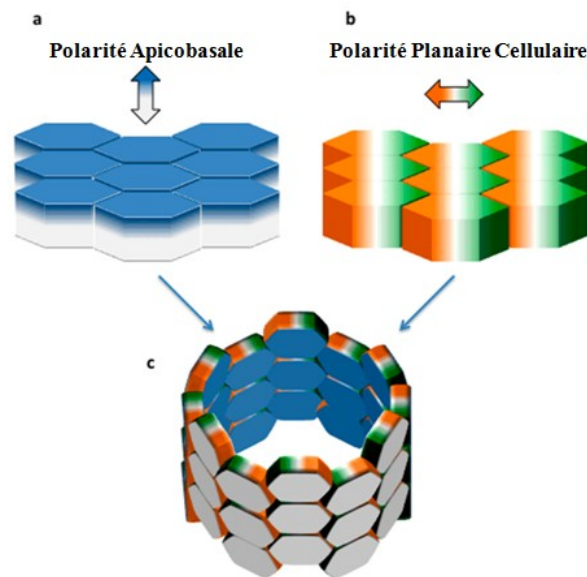
Ainsi, des études ont démontré l'implication de ces deux gènes dans le phénomène du guidage axonal, où les axones commissuraux font une série de changements de trajectoire en route vers le cerveau. Ils se projettent en premier temps le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière, puis se tournent en avant vers le cerveau après la traversée de la ligne médiane. Une étude réalisée sur les souris *Looptail* a mené à la proposition d'une hypothèse, que la mutation du gène *Vangl2* rend les cônes de croissance des axones commissuraux sensibles aux signaux directionnels (Wnt), ce qui va entraîner le tournage aléatoire de ces axones le long de l'axe antéropostérieur après le croisement de la ligne médiane (138). Une autre étude très récente réalisée chez les poissons-zèbres a démontré l'implication des gènes *Vangl2* et *Scrib1* dans le phénomène de guidage des axones commissuraux. Scrib1 forme un complexe avec Vangl2, où il interagit physiquement avec le domaine C-terminal de cette protéine. Récemment, Vangl2 s'est avéré être enrichi aux cônes de croissance des filopodes. Plus précisément, ces cônes de croissance des filopodes qui sont soit allongés ou stables ont des niveaux élevés de Vangl2 à leurs extrémités. Une possibilité est que les interactions Vangl2-Scrib1 régulent la dynamique d'actine dans les cônes de croissance. À la fois, dans les cellules migratrices et les épines dendritiques neuronales, Scrib1 recrute le complexe *G-protein coupled receptor interacting protein 1 (GIT1)/ $\beta$ -p21-activated kinase- (PAK-) interacting exchange factor ( $\beta$ -PIX)/PAK* à la membrane plasmique pour réguler la dynamique de l'actine par son influence sur l'activité Rac (139).

### **1.9.7. *Scribble1* et la polarité.**

La polarité cellulaire est un phénomène crucial dans de nombreux processus biologiques. Elle contribue à l'intégrité et au développement des tissus normaux et est définie



comme une asymétrie dans la morphologie cellulaire et/ou une répartition asymétrique des protéines et des fonctions au niveau cellulaire. Ces asymétries sont contrôlées par deux polarités principales, la polarité apico-basale et la polarité planaire cellulaire (**Figure 10**) qui établissent ces asymétries et qui contrôlent la plupart des processus développementaux tels que l'épithélisation, la division cellulaire asymétrique et la migration cellulaire dirigée. Ces deux polarités impliquent un réarrangement des cytosquelettes, au niveau des microtubules ainsi que dans les fibres d'actine. Les mécanismes fondamentaux et les protéines de ces deux polarités sont fortement conservés parmi les vertébrés et les invertébrés (122, 140, 141) et Scrib1 est l'une de ces protéines hautement conservées au cours de l'évolution dans ces deux processus.



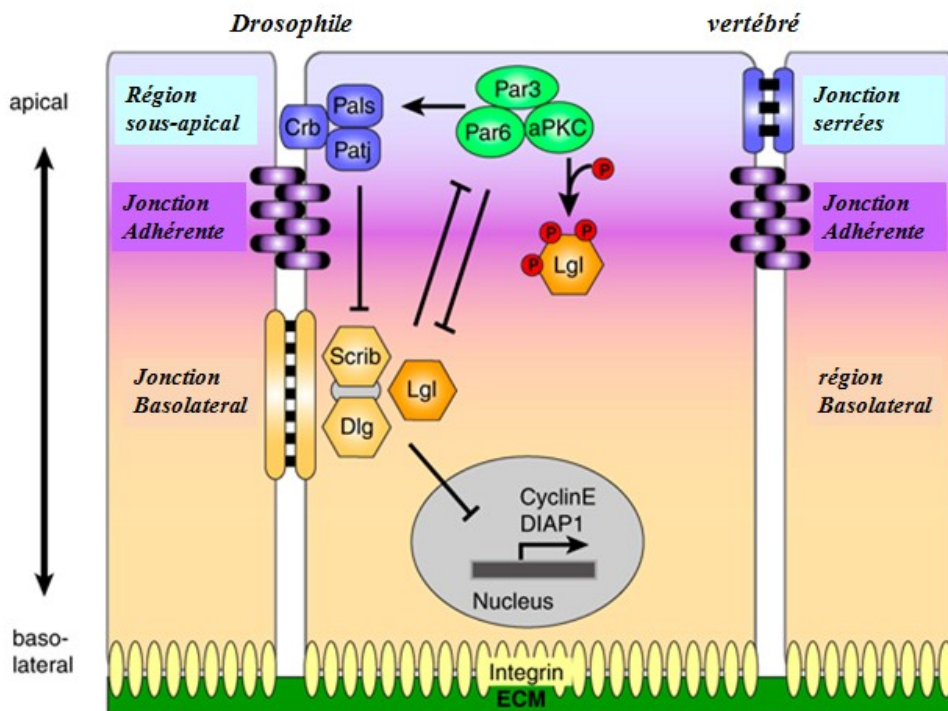
**Figure 10** : Schéma présentatif de la polarité A-B et la PCP dans les cellules épithéliales. A) la polarité A-B au long de l'axe vertical, b) la PCP dans le plan de l'épithélium (orthogonales), c) l'association des deux polarités. Adapté de Elisa Agnese Nigro et al., 2015(142)

### 1.9.7.1. *Scribble1* et la polarité apicobasale

Chaque cellule épithéliale est polarisée au long de l'axe apico-basale et comprend deux régions distinctes, apicale et basolatérale, séparées par les jonctions serrées au niveau membranaire (**Figure 11**). Ces jonctions jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien de cette polarité. La composition lipidique et protéique des deux compartiments se

diffère l'une de l'autre, ce qui leur confère deux fonctions différentes. Cette polarité organise les fonctions vectorielles des épithéliums et régule rigoureusement les échanges entre le milieu interne et l'environnement. L'établissement et le maintien de la polarité apico-basale nécessitent le positionnement stéréotypé d'un ensemble hautement conservé des protéines le long de l'axe Z au niveau cellulaire (124, 143, 144).

Chez la *Drosophile* comme chez la souris, *Scribble1* joue un rôle crucial dans la régulation de la polarité A-B. Il fait partie d'un groupe de gènes qui contrôlent cette polarité et qui s'organisent en trois complexes essentiels : PAR, Crumbs et Scribble. L'emplacement et l'interaction entre les différents composants de ces complexes sont définis par différents domaines structuraux au niveau des cellules épithéliales. Cette polarité est générée et maintenue par des interactions antagonistes entre les deux complexes apicaux aPKC–PAR6–PAR-3 et Crumbs- PALS1- PATJ et le complexe basolateral Scrib, Lgl et Dlg (**Figure 11**). Un défaut dans le maintien de cette polarité peut entraîner de nombreux types de cancer (122, 132, 145).



**Figure 11** : Schéma présentatif montrant le rôle du Scribble1 au sein de la polarité apico-basale. Adapté de Humbert PO et al., 2008 (146).

### 1.9.7.1.1. Le complexe Scribble1

Dlg (Discs large), Scrib1 et Lgl (Lethal giant larvae) sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution d'une voie génétique commune. Ils ont été identifiés comme des gènes suppresseurs de tumeurs chez la *Drosophila* (125, 147-150). Ensemble, ces trois protéines forment le complexe Scribble (**Figure 11**) qui évolue dans la régulation de la polarité apico-basale et assure le contrôle de la division asymétrique des neuroblastes chez les embryons de la *Drosophila* (151, 152). Chez les vertébrés, il existe quatre (Dlg1-4), deux Lgl (Lgl1 et Lgl2) et un seul homologue Scribble (Scrib1), mais certaines études suggèrent que les protéines LANO et Erbin peuvent jouer un rôle similaire que Scrib1 (153, 154).

Des études d'expression ont révélé la colocalisation des trois protéines Scrib1, Dlg et Lgl à la membrane basolatérale des cellules épithéliales chez la *Drosophila* et chez les mammifères (125, 155, 156). Chez la *Drosophila*, des interactions génétiques ont été observées entre *Scrib1* et les gènes *Lgl* et *Dlg* où il a été démontré que la perte de fonction de l'un de ces gènes cause des phénotypes similaires, y compris la perte de la polarité apicobasale, l'altération du cycle cellulaire et une prolifération tissulaire désordonnée entraînant la mort des larves (154). La façon et la nature des liaisons entre les trois protéines pour former le complexe Scribble ne sont pas totalement claires. Chez la *Drosophila*, des études faites dans les synapses neuronales ont démontré que la liaison entre Scrib1, Lgl et Dlg ne sont pas directes, où Scrib1 se lie avec Dlg par l'intermédiaire d'une autre protéine Gukh. Cette interaction est assurée par l'implication de PDZ2 de Scrib1 (157). En plus, une autre étude a démontré par co-immunoprécipitation sur des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) une interaction physique directe entre Lgl2 et Scrib1 à travers le domaine LRR de ce dernier (158).

Au contraire de la *Drosophila*, le rôle individuel de *Scrib1* chez les mammifères dans la polarité apico-basale n'est pas totalement clair. En 2006, une étude a démontré l'implication de Scrib1 dans la polarité A-B au niveau des cellules MDCK et des cellules intestinales, à travers la formation et la régulation des jonctions adhérentes (157). Ainsi, dans une autre étude, Scrib1 a été rapporté pour réguler la polarité A-B dans l'épithélium intestinal par la régulation des jonctions serrées, en interagissant avec ZO-1 qui va assurer son recrutement au

niveau de ces jonctions. La même étude a révélé que la suppression ou la diminution de *Scrib1* peut provoquer des ruptures dans la muqueuse intestinale, lors d'une inflammation de ce dernier (159).

Enfin, Lgl interagit avec la myosine II, les vésicules transportant des composantes SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor), tandis que la plus importante interaction de la protéine Lgl est celle avec le complexe PAR (elle sera discutée dans la section 1.9.6.1.4).

Toutes ces différentes interactions suggèrent un rôle important pour ce complexe SCRIBBLE dans la transduction du signal, le réarrangement du cytosquelette et enfin dans le phénomène du trafic vésiculaire. Un modèle cohésif pour expliquer la façon dont les protéines Scribble, Dlg et Lgl coordonnent ces processus reste à établir. Chez les mammifères, le rôle de ce complexe n'est pas encore certain, vu la complexité de leurs systèmes par rapport à la *Drosophile* (154, 157).

#### **1.9.7.1.2. Le complexe Par**

Les principaux déterminants de la polarité A-B ont été identifiés pour la première fois dans des criblages génétiques sur *C. elegans*, afin d'examiner les défauts de partitionnement des protéines au niveau cellulaire. Ces études ont donné au complexe Par son nom (160). Depuis, les propriétés biochimiques et fonctionnelles de ce complexe ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études. Il est composé de trois protéines qui interagissent ensemble, Par3 (également appelé Bazooka) et Par6, qui sont des protéines d'échafaudage contenant des domaines PDZ et enfin la protéine atypique kinase C (aPKC) (sérine/thréonine kinase activée par protéolyse). Tous les trois forment un complexe stable chez la *Drosophile*, *C. elegans* et les mammifères. Chez les vertébrés, le complexe Par est hautement conservé, où on trouve trois homologues de Par6 (Par6a, Par6b et Par6g), deux homologues d'aPKC (aPKCz et aPKCi, également appelés aPKCl) et un seul Par3 (157, 161, 162). Ce complexe a été étudié largement pendant la polarité A-B. Son recrutement au niveau apical des cellules est considéré comme l'une des premières étapes nécessaires à l'établissement de cette polarité dans l'épithélium de la *Drosophile* (157, 163).

En plus de leurs rôles cruciaux dans l'établissement de la polarité apicobasale, les composantes moléculaires de ce complexe interviennent dans le phénomène de la migration

polarisée des cellules. Des études ont révélé que la réorientation des centrosomes ainsi que l'appareil de Golgi des cellules est assurée par le complexe Par; ce qui facilitera leur processus de la migration orientée, comme c'est le cas des astrocytes au cours de la migration neuronale (164, 165).

Des interactions entre les composantes de ce complexe ont été observées, où des études ont démontré que Par6, qui possède un motif CRIB (Cdc42, Rac-interactive binding), peut se lier directement à la protéine Par3 ainsi qu'au domaine régulateur de la protéine aPKC (166, 167). Par6 interagit avec d'autres protéines, où des études ont démontré que le recrutement du complexe Par dans le cortex cellulaire dépend de la liaison de Par6 à travers son motif CRIB avec la forme active de la protéine Cdc42 (lié à la GTP). D'autre part, cette interaction entre Par6 et Cdc42 régule l'activité spatio-temporelle d'aPKC qui sera nécessaire pour son activité au cours de l'établissement de la polarité A-B, où des études ont démontré que l'activation d'aPKC par Par6 entraînera la phosphorylation du domaine CR3 de Par3, qui va être impliqué à son tour dans la stabilité des autres complexes de cette polarité (168). La mutation où la perte de *Par3* ou *Par6* ou *aPKC* entraîne des défauts dans l'établissement de la polarité apicale des cellules épithéliales (169).

### **1.9.7.1.3. Le complexe Crumbs**

Chez la *drosophile*, le troisième complexe de la polarité A-B nommé Crumbs se localise dans la région la plus apicale de l'épiderme connue sous le nom de la zone marginale. Il est composé de trois protéines Crumbs (Crb), Patj (PALS1 associé aux protéines des jonctions serrées) et Stardust (Sdt) (162). En plus de leurs importances dans l'établissement de la polarité apicale, les interactions entre ces différentes protéines sont également essentielles pour d'autres propriétés, y compris l'organisation laminaire et la survie cellulaire (170).

Chez les vertébrés, ce complexe est hautement conservé, où les protéines qui le composent se localisent comme chez la *Drosophile* à la limite de la membrane apicale des cellules épithéliales, au-dessus des jonctions serrées et du complexe Par. Le complexe Crumbs chez les mammifères assure des fonctions similaires à ceux chez la *Drosophile*, car l'expression des protéines mutantes qui interfèrent avec le complexe Crumbs perturbe la polarisation des cellules épithéliales chez les mammifères (162, 171).

Sdt interagit avec la protéine transmembranaire Crb à travers son domaine PDZ. Les deux protéines co-localisent dans un complexe sous-apical au sommet de la membrane latérale, pour se localiser à côté des jonctions serrées chez les vertébrés. Chez les mammifères, PALS1 ((protéine associée à LIN-7)-1), l'homologue de Sdt, interagit à son tour avec Crb à travers son domaine PDZ. PALS1 utilise un domaine L27 pour interagir avec une protéine de domaine multi-PDZ appelée PATJ. De même, Discs Lost, un orthologue de PATJ chez la *Drosophila*, peut interagir avec Sdt à travers un domaine L27 (171). Toutes ces interactions assurent la stabilité du complexe Crumbs, où il a été démontré que la perte de l'une de ces protéines provoque des défauts dans la polarisation épithéliale au cours du développement précoce des embryons chez la *drosophile* comme chez les mammifères. Des mutations dans l'un de ces gènes provoquent des défauts dans la polarité apicale dans l'épithélium de la *Drosophila* (162, 170, 171).

#### **1.9.7.1.4. Stabilité de la polarité apico-basale**

La stabilité de la polarité A-B est basée sur des interactions antagonistes entre les deux complexes apicaux aPKC–PAR6-PAR-3 et Crumbs- PALS1- PATJ et le complexe basolatéral Scrib-Lgl-Dlg. Plusieurs interactions de rétroaction positive et négative entre les complexes aboutissent finalement à des zones de polarisation dans la surface cellulaire, dont la plus dramatique est l'asymétrie entre les surfaces apicale et basolatérale (160).

Par6 est normalement auto-inhibé. L'activation de Cdc42 par GEF (le facteur d'échange de nucléotides guanine) permettra la liaison entre Par6 et Cdc42 qui va activer Par6, facilitant l'association de Par6 avec aPKC. Toutes ces interactions ont pour but de libérer la partie N-terminale d'aPKC qui a comme rôle principal la phosphorylation de certaines protéines et leur expulsion de la surface apicale dans laquelle réside le module Cdc42-Par6-aPKC. Au début de la polarisation tissulaire, Par3 est la première protéine recrutée à la surface apicale en développement, ce qui facilitera le recrutement de E-cadhérine et par la suite la formation des jonctions serrées et enfin le recrutement de Par6-aPKC pour la stabilisation de ces jonctions. À la maturation de la polarité A-B, Par3 sera phosphorylée par aPKC, ce qui va le dissocier du complexe Par et permettra probablement la stabilité du complexe Crumbs et l'accumulation de Par3 d'une façon stable dans les jonctions serrées (160, 172, 173).

Chez la *Drosophile*, des études ont révélé une interaction directe entre Sdt et PAR-6 assurant d'une part une liaison entre les deux complexes Par et Crumbs et d'autre part la stabilisation du complexe Crumbs. Ainsi, Sdt recrute la protéine adaptatrice, PATJ, dans la région subapicale pour supporter la formation de jonctions adhérentes. Il a été démontré que le grand domaine extracellulaire de Crb facilite des interactions homophiliques, tandis que sa queue intracellulaire est extrêmement conservée et contient deux domaines d'interaction protéique importants : un domaine de liaison avec Sdt qui est à son tour nécessaire pour stabiliser Crb dans la membrane au niveau de la région subapicale. L'autre domaine FERM (Protéine 4.1-Ezrine/Radixine /Moesin) assurera la liaison avec le cytosquelette d'actine sous-corticale. Ainsi, Crb est phosphorylée par aPKC, ce qui participera dans sa stabilité apicale. La formation de ces deux complexes Par et Crumbs dans la surface apicale des cellules épithéliales représente la première étape pour la stabilité et la formation de la polarité apicale (174, 175).

Dans l'autre pôle basolatéral, le complexe Scribble agit de manière antagoniste aux complexes Par et Crumbs (176). En premier temps, Lgl va se lier au complexe aPKC-Par6, pour qu'il soit phosphorylé et inactivé par aPKC et libéré de la membrane vers le cytoplasme. Cette phosphorylation va agir aussi dans le but de restreindre la fonction de Lgl à la membrane basolatérale où il va interagir avec Scrib1 et Dlg pour former le complexe Scribble (124, 177, 178). De même, cette liaison de Lgl à Par6-aPKC agit pour inhiber la fonction d'aPKC, car elle empêchera la liaison entre Par3 et le complexe Par6-aPKC et une fois que Lgl est retiré du complexe aPKC-Par6, aPKC sera capable d'interagir et de phosphoryler Par3, permettant la formation du complexe Par qui sera actif dans les jonctions (124, 146).

En plus de son interaction avec Lgl et Dlg pour former le complexe Scribble, il a été démontré que Scrib1 interagit physiquement avec plusieurs autres protéines qui partagent les mêmes effets sur la polarité A-B, y compris le complexe  $\beta$ PIX-GIT1 régulateur de Rho GTPase, certains composants de la voie de signalisation Wnt et les récepteurs couplés à la protéine G, ce qui permettra ainsi le réarrangement du cytosquelette (157). D'autres études n'ont révélé aucun rôle pour Scrib1 dans la polarité apico-basale de l'épithélium canin ou humain. Par conséquent, le rôle de ce gène dans la polarité apico-basale des cellules épithéliales des mammifères reste incertain et l'utilisation de souris conditionnelles knock-out pour *Scrib1* aidera certainement à mieux élucider ce rôle (135, 141, 179). Des études ont été

réalisées récemment sur des souris *Crc* et ont démontré que les défauts du développement au niveau pulmonaire et cardiaque causés par la perte de fonction de *Scribble1* sont indépendants de la polarité A-B, parce que cette dernière n'a pas été affectée dans ces souris (180, 181)

### **1.9.7.2. *Scribble1* et la voie PCP.**

#### **1.9.7.2.1. Stabilité de la voie PCP**

L'établissement et la stabilité de la polarité planaire cellulaire dans l'épithélium sont des caractéristiques importantes pour le développement et l'homéostasie de la plupart des organes. Des études portant sur différents organismes modèles comme chez la souris et la *Drosophila* ont fourni une foule d'informations sur les mécanismes qui régissent la réglementation de la voie PCP.

##### **1.9.7.2.1.1. Chez la *Drosophila***

En 1940, Wigglesworth a utilisé le terme de la polarité planaire pour la première fois pour étudier un phénomène de polarité chez les punaises *Rhodnius*. Lawrence a utilisé le même terme pour essayer d'expliquer le mécanisme qui contrôle l'orientation des poiles des petits insectes milkweed bug en 1966 (182). Encore appelée la polarité tissulaire, ces deux termes ont été inventés pour décrire l'orientation coordonnée des cellules et des structures cellulaires le long d'un axe dans le plan épithélial (**Figure 12 A et B**) (183).

Depuis plusieurs années, la PCP a été identifiée et étudiée en détails pour la première fois dans la *Drosophila melanogaster* dans le phénomène de l'orientation des poils des ailes adultes ainsi que dans les soies abdominales, les ommatidies et dans tous les épithéliums dérivants des différents disques imaginaux de ces mouches (184-187). Le processus de la PCP est contrôlé par une voie de signalisation appelée la voie non canonique de *Fz/Dvl*, composée d'un groupe des gènes centraux incluant : *van gogh/strabismus* (*vangl/stbm*), *frizzled* (*fz*), *dishevelled* (*dsh* chez la *drosophile*, *Dvl* chez les vertébrés), *starry night/flamingo* (*stan/fmi*), *prickle* (*pk*) et *Diego* (*dg*), qui sont très importants pour la stabilité de la polarité. Une mutation au niveau de l'un de ces gènes conduit à une désorganisation dans la distribution des autres gènes centraux et des défauts de polarité (**Figure 12 C**) (186).

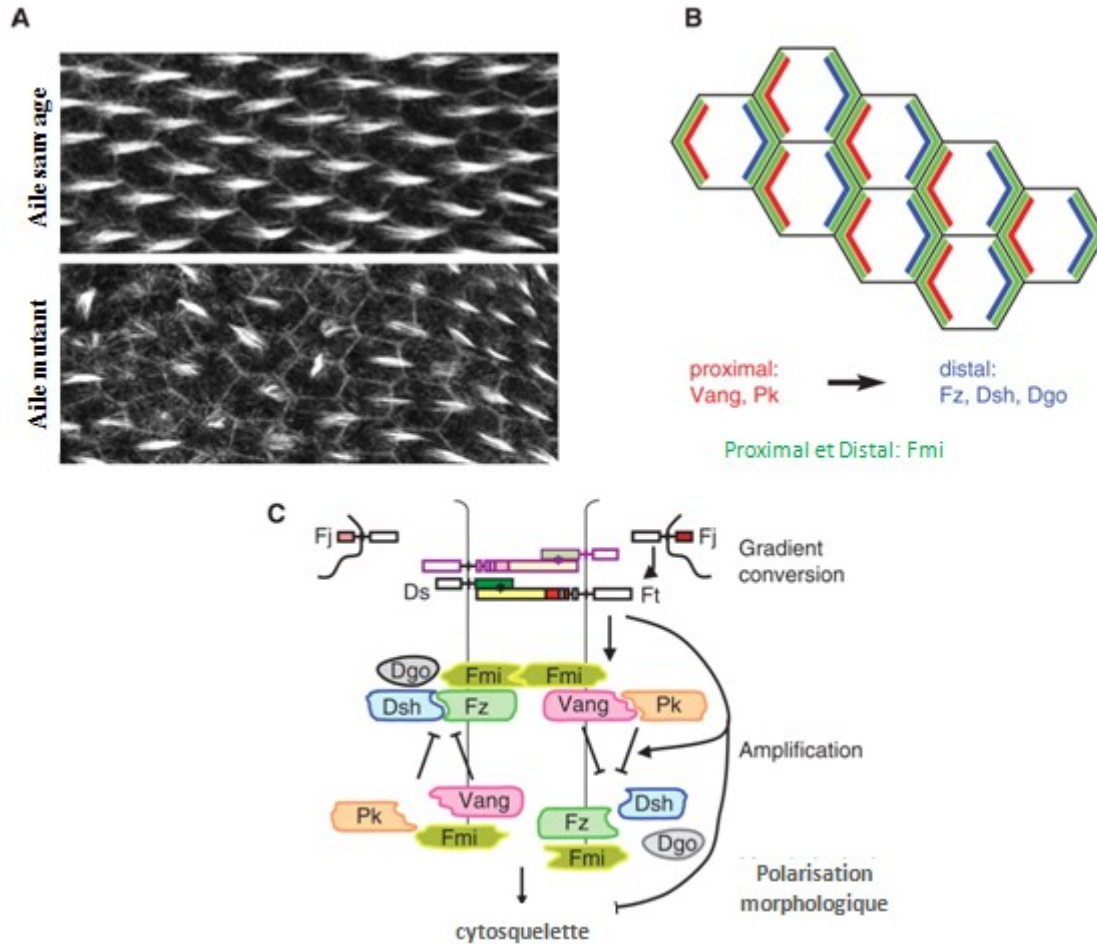


Avant la polarisation morphologique, les différentes protéines qui composent la PCP adoptent une distribution subcellulaire polarisée. Le mécanisme par lequel ces protéines établissent le PCP chez les mouches est mal compris, mais des études ont montré que cette signalisation est activée grâce à un ligand spécifique Wnt à la voie non canonique de *Fz/Dvl*, qui se lie au récepteur transmembranaire **Fz** distribué d'une façon asymétrique, en se focalisant dans le pôle apical des interfaces proximo-distales. L'asymétrie de la protéine Fz est dépendante de l'activité des autres membres de la voie PCP comme Dsh, Stan/Fmi, Pk et Vang/Stbm. La liaison du ligand Wnt avec le récepteur Fz conduit au recrutement et à l'activation de **Dsh** (une phosphoprotéine cytoplasmique) à la membrane cellulaire au pôle distal (188-190). Une autre protéine transmembranaire **Stbm** interagira avec **Pk** assurant son recrutement à la membrane proximale. Ces interactions vont aboutir à l'apparition de deux complexes initiaux polarisés liés à la membrane : Fz / Dsh au côté distal et Vang / Pk au côté proximal (191-193). Chez la *Drosophile*, Vang/Stbm peut lier Dsh, Pk et la protéine cytoplasmique **Dgo**, la liaison entre Stbm et Pk va empêcher Dsh de s'accumuler sur le côté proximal ce qui va repousser le complexe Fz/Dsh vers le coté distal. Tandis qu'en absence de Pk, ce complexe va se retrouver distribué d'une façon symétrique (192, 194, 195). Cette asymétrie dans la distribution des protéines centrales de la voie PCP établit une certaine forme d'information positionnelle intercellulaire. Une autre protéine transmembranaire **Fmi** faisant partie de la superfamille des cadhérines devient enrichie à la fois du côté proximal et distal, en interagissant avec les deux complexes Dsh / Fz et Vang / Pk. La protéine Fmi dépend dans sa distribution des protéines Fz et Dsh où plusieurs études ont montré qu'un défaut dans l'une de ces deux protéines conduit à un désordre dans la distribution cellulaire de la protéine Fmi qui maintiendra les deux complexes initiaux de la PCP et facilitera leurs communications ultérieurement (196-200). Ces communications sont bien établies soit : a) à travers l'interaction entre le récepteur transmembranaire Fz situé dans le pôle distal de la première cellule avec la protéine Vangl située dans le pôle proximal de la deuxième cellule (199) ou bien, b) par l'intermédiaire de Fmi positionné sur les deux cellules voisines (sur les deux pôles proximaux et distaux) et qui contrôle l'asymétrie des deux complexes proximo-distaux à travers ses liaisons homophiliques (**Figure 12 C**) (200).

Plusieurs études génétiques sur la *Drosophile* ont également permis d'identifier d'autres gènes qui sont impliqués dans le processus de la PCP. Ces gènes constituent un

groupe appelé « le module global de la PCP » générant une polarité globale qui assure le développement harmonique des tissus dans l'axe du corps. Ce module est composé de deux cadherines atypiques *Fat (Ft)*, *Dachsous (Ds)* et d'un gène *Four-jointed (Fj)* codant une protéine transmembranaire de type II et qui est située dans l'appareil de Golgi (201, 202). Les composantes du module global de la PCP sont exprimées selon un gradient, excepté *Fat* qui est exprimé d'une façon uniforme. Les protéines Ft, Ds et Fj sont localisés d'une façon symétrique contrairement aux protéines centrales (203). Plusieurs théories ont été proposées sur la façon de communication entre les deux modules centrale et globale de la PCP. Certaines études menées sur les yeux de la *Drosophile* ont suggéré que les gènes centraux de la voie PCP agissent de manière directionnelle sur les gènes du module global (189). Tandis que des études plus récentes basées sur la génétique mosaïque chez la *Drosophile* suggèrent que les deux modules agissent en parallèle pour fournir des informations critiques aux protéines effectrices (**Figure 12 C**) (196, 204, 205).

D'autres gènes ont été également identifiés comme des gènes effecteurs de la PCP, tels que *fuzzy (Fy)*, *fritz (Frtz)* et *inturned (In)* (201, 206, 207). Ces effecteurs ont pour effet de moduler l'actine et les microtubules menant à un réarrangement du cytosquelette. L'activation de la voie du cytosquelette inclut une petite *GTPase* de la sous-famille ***Rho*** (*Rho*, *Rac* et *cdc42*), le gène ***Daam1***, la *kinase c-Jun (JNK)* ainsi que le gène *kinase C (PKC)* (13, 117, 208).



**Figure 12 :** La polarité planaire cellulaire chez la *Drosophile*. (A) Image de l'épithélium d'un ail adulte d'une *Drosophile* sauvage et d'une mutante de PCP, marqué avec la phalloïdine pour colorer l'actine. (B) représentation schématique montrant le positionnement asymétrique des membres de la voie PCP. (C) Schéma présentatif de la voie PCP avec les différentes interactions entre les gènes, ainsi que les effecteurs. Adapté de Vladar EK et al., 2009. (183).

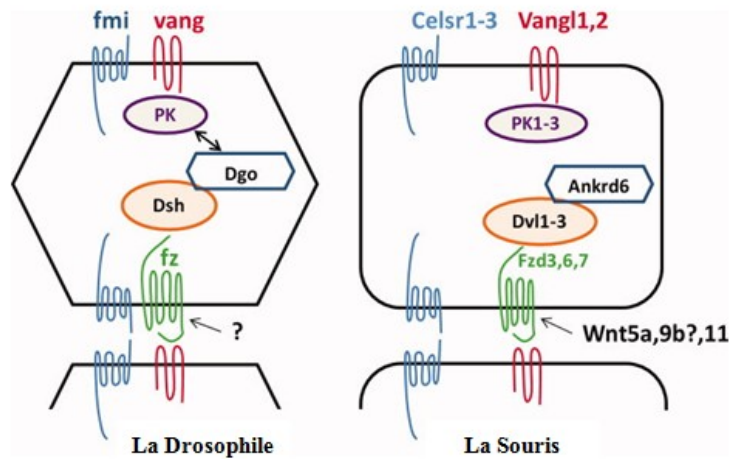
Des études menées sur des mutants mosaïques de la *drosophile* ont montré que les gènes de la voie PCP sont divisés en deux familles selon leurs effets : **(a) les gènes agissant de manière autonome**, lors d'une surexpression ou d'une mutation d'un de ces gènes, la voie PCP de la cellule où le gène est localisé sera affectée, tandis que les cellules avoisinantes où les gènes ne sont pas mutés ne seront pas affectées. Ces gènes sont *dishevelled*, *prickle*,

*flamingo* et *Diego*. **(b) les gènes agissant de manière autonome et non autonome**, lors d'une surexpression ou d'une mutation d'un de ces gènes, la voie PCP des cellules mutées et celle des cellules avoisinantes non mutées seront affectées. Ces gènes sont *frizzled* et *strabismus/vang* (209).

#### 1.9.7.2.1.2 Chez les vertébrés

Comme chez la *drosophile*, les gènes de la voie PCP restent toujours fidèles à leurs rôles dans le remodelage de la polarisation de cytosquelette. La PCP contrôle plusieurs phénomènes dont la complexité est plus évoluée que ceux chez la *drosophile*, incluant le phénomène d'extension convergente (section 1.2.2), la fermeture des paupières, l'orientation des touffes de cils des cellules ciliées dans l'oreille interne, l'orientation des follicules pileux, la ciliogénèse et le guidage axonal (118, 138, 210).

La voie PCP est conservée chez les vertébrés et plus spécifiquement chez les mammifères où elle a fait l'objet d'intenses recherches au cours des dernières années (chez les souris). Ces études ont montré que les gènes de la voie PCP sont impliqués dans le développement et la maintenance d'une large gamme de tissus et d'organes. Chez les souris, il existe 2 gènes *Vangl* (*Vangl1* et *2*), 10 *Frizzled* (*Fz*), 4 *Prickle* (*Pk*), 3 *Dishvelled* (*Dvl*), 3 *Flamingo* (*Celsr*), 1 *Diego* (*Inversin*) (211, 212) et 4 *Fat* (213). *Inturned* et *fuzzy* ont également été décrits et étudiés chez les vertébrés (214-216). De plus, un certain nombre de gènes PCP, dont les mutations causent des défauts de polarité planaire uniquement chez les vertébrés, ont été identifiés, y compris *Ptk7* (104, 217), *Scribble1* (218) et *Sec24b* (219, 220). Comme chez la *Drosophile*, cette voie est activée par des ligands WNT, plus précisément *Wnt5*, *Wnt7* et *Wnt11*. L'implication de ces ligands a été confirmée par des études sur les gènes *WNT* dans le poisson-zèbre, le *xenopus* et la souris (**Figure 13**) (221-223).



**Figure13** : Schéma présentatif des différentes interactions des protéines de la voie PCP chez la *Drosophile* et chez la souris. Adapté de Wansleeben C et al., 20 011 (98).

La présence de plusieurs gènes paralogues de la voie PCP qui sont exprimés à un degré variable de spécificité soit au niveau tissulaire ou cellulaire complique la caractérisation fonctionnelle individuelle de ces différents gènes au niveau de cette voie, parce que ça conçoit souvent avec une redondance fonctionnelle. De plus, la létalité embryonnaire due à l'inactivation de certains gènes PCP, comme *Vangl2*, *Celsr1* et *Scribble1* nous empêchent de comprendre leur rôle dans la structure, la fonction et la maintenance des tissus adultes et leurs possibles associations avec les pathologies dans les individus adultes.

#### 1.9.7.2.2. *Scribble1* au sein de la voie PCP.

Plusieurs études ont démontré que le gène *Scrib1* est requis pour une large gamme de processus régulés par la voie PCP, y compris l'extension convergence, l'orientation des cellules capillaires mécano-sensorielles de l'oreille interne, la migration neuronale et la fermeture du tube neural (139). *Scrib1* a été identifié la première fois comme un membre de la voie PCP chez la souris *Crc* qui porte une mutation spontanée dans le même gène (Section 1.8). La protéine *Scrib1* générée manque les 2 derniers domaines PDZ et toute la partie cytoplasmique chez les mutants *Crc* qui présentent un phénotype très sévère d'ATN, la craniorachischisis, et qui est semblable au phénotype observé chez les souris *Lp* (Section1.8). *Crc* et *Lp* agissent soit dans la même voie de développement, soit dans des voies convergentes qui sont essentielles pour l'initiation de la fermeture du tube neural (111, 120).

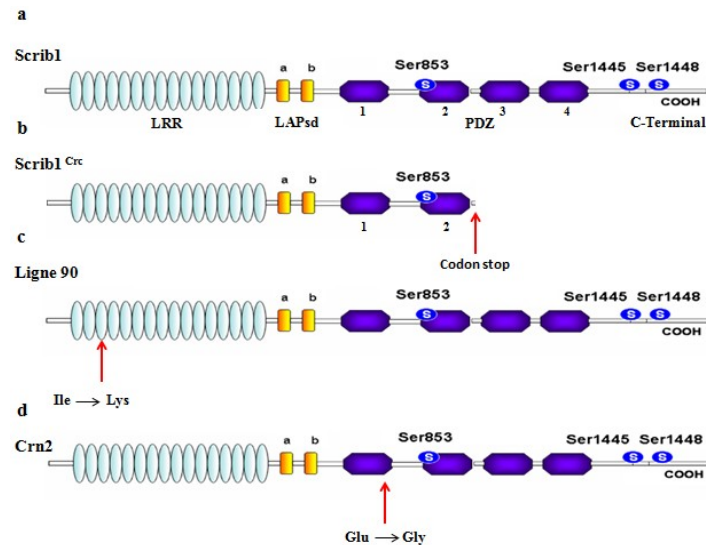
Pour déterminer si *Scrib1* a un rôle dans la voie PCP, l'orientation des touffes de stéréocils d'actine dans la cochlée a été étudié chez les souris homozygotes *Crc/Crc* et *Lp/Lp*. Ces cellules ciliées, dont le rôle est mécano-sensoriel dans l'organe de Corti, possèdent les propriétés des cellules épithéliales et neuronales. Dans l'état sauvage, les cellules sont orientées d'une façon à présenter une polarité pointant vers la périphérie de la cochlée (211). La polarisation et l'orientation de ces cils sont régulées par la voie de signalisation PCP. Les différentes études réalisées sur les souris *looptail* et *circletail* ont permis de mettre en évidence les différents cas de désorientation de cette polarité. Des défauts de la polarisation stéréociliaire sont présents dans les oreilles des souris mutantes, mais ils étaient moins sévères que chez les souris *Lp/Lp*, parce que les défauts ont été observés juste dans les cellules ciliées externes (CCE) des deuxièmes et troisièmes rangs. Tandis que les cellules ciliées internes (CCI) qui sont significativement mal orientées dans les cochlées des souris *Lp/Lp* sont normales chez les cochlées des souris *Crc/Crc* (218). La similarité des phénotypes chez les mutants *Lp/Lp* et *Crc/Crc* soulève la possibilité que les souris *Crc* et *Lp* puissent s'interagir génétiquement, des études sur des souris doubles hétérozygotes *Lp/+ ; Crc/+* ont démontré que ces souris présentent des défauts graves du tube neural, la craniorachischisis, semblables au phénotype des souris homozygotes *Crc/Crc* ou *Lp/Lp* (111, 120). Pour déterminer si *Vangl2* et *Scrib1* interagissent génétiquement dans la régulation de la voie PCP, la polarisation stéréociliaire a été analysée chez les souris doubles hétérozygotes *Lp/+ ; Crc/+*, où des défauts d'orientation des cils étaient très comparables aux souris *Lp/Lp* y compris les cellules CCI. Les souris *Lp/+* ou *Crc/+* ne présentent aucun de ces phénotypes (218).

Des autres études menées chez la *Drosophile* sur un mutant *scrib*<sup>5</sup> possédant des mutations de *Scrib1* qui mènent à un codon d'arrêt prématuré et générant des protéines qui ne possèdent pas les deux derniers domaines PDZ et la partie C-terminale (comme chez la souris *Crc*) (**Figure 14 b**), révèlent que ce gène muté ne parvient pas à établir la PCP dans l'œil et l'aile de cette mouche (224, 225).

De plus, les souris homozygotes de la ligne-90 ont la craniorachischisis. Ces souris ont une mutation qui cause une substitution d'une Isoleucine (Ile) par une Lysine (Lys), dans le troisième domaine LRR de *Scrib1* (**Figure 14c**). Des souris doubles hétérozygotes *ligne-90/+ ; Lp/+* et *ligne-90/+ ; Crc/+* présentent aussi la craniorachischisis comme pour les souris homozygotes, ce qui explique une forte interaction génétique entre l'allèle *ligne-90* et les

allèles *Crc* et *Lp* (226). Ainsi, d'autres souris homozygotes *Crn2* (craniorachischisis2) ont une mutation qui cause une substitution d'un acide glutamique (Glu) par une Glycine (Gly), dans le premier domaine PDZ (PDZ1) de Scrib1 (**Figure 14d**). Ces souris homozygotes *Crn2* présentent aussi une craniorachischisis et une queue pliée avec quelques embryons qui ont une exencéphalie dans les souris hétérozygotes (*Crn2* /+) et homozygotes (*Crn2* / *Crn2*). Ainsi, des souris doubles hétérozygotes *Crn2*/+; *Lp*/+ présentent aussi la craniorachischisis comme les souris homozygotes avec les stéréocils dans la cochlée qui étaient moins uniformément orientés, ce qui explique ainsi une forte interaction génétique entre l'allèle *Crn2* et l'allèle *Lp* (227).

Toutes ces études confirment clairement l'implication de *Scrib1* dans la PCP et mettent en évidence l'importance des domaines LRR et PDZ de Scrib1 dans l'établissement de la PCP.



**Figure 14 :** Schéma présentatif des mutations dans les différentes lignes de souris : a) Scrib1 sauvage composé de 1665 aa qui présente les différents domaines qui composent la protéine Scrib1 normale. b) Scrib1<sup>Crc</sup> dans lequel on trouve une mutation spontanée qui résulte d'une insertion d'une base unique qui crée un déplacement dans le cadre de lecture et une protéine Scrib1 prématurée de 971 aa qui manque les deux domaines PDZ et la partie cytoplasmique. c) Scrib1 au niveau de la souris mutante Ligne-90 qui résulte d'une mutation faux-sens -Ile-Lys- dans le troisième domaine LRR. d) Scrib1 au niveau de la souris mutante *Crn2* qui résulte d'une mutation faux-sens -Glu-Gly- dans le premier domaine PDZ (PDZ1).

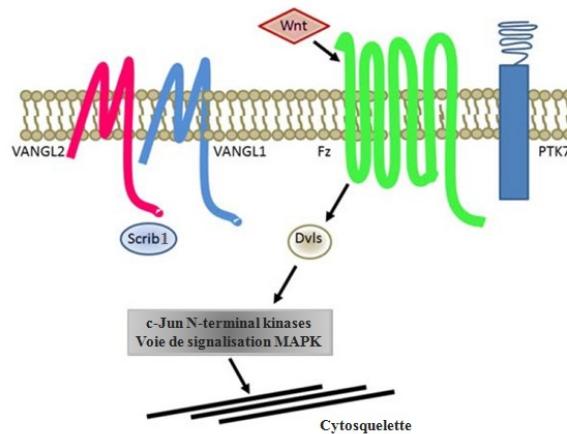
### 1.9.7.2.3. Interactions de Scribble1 avec Vangl2.

En plus de leurs interactions génétiques, des études ont été réalisées sur la *Drosophila* pour tester si la protéine Stbm présentait une interaction protéine-protéine avec Scrib1. Une étude qui a utilisé le système double hybride pour tester l'interaction entre la partie C-terminal de la protéine transmembranaire Vangl2 et la partie PDZ de la protéine cytoplasmique Scrib1 a révélé une interaction importante entre les deux parties des deux protéines en utilisant une autre interaction de Vangl2 avec le Dlg (qui est déjà connu) comme un contrôle positive. D'autres tests réalisés sur le reste des membres de la polarité A-B Baz, Par6, Sdt et dPatj ne montrent aucune interaction. Afin de confirmer l'interaction des deux protéines Scrib1 et Stbm et de mieux définir quel(s) domaine(s) PDZ de Scrib1 interagit (sont) avec Stbm, plusieurs constructions de PDZ de la protéine Scrib1 ont été réalisées (PDZ individuel, 1-2 et 3-4). En utilisant la technique GST-pull down, il a été démontré que la PDZ 3 est le domaine de Scrib1 qui se lie spécifiquement à la protéine Stbm chez la *Drosophila* (224).

Chez les mammifères, des études ont été réalisées avec le système double hybride et le Co-immuno précipitation (CO-IP) pour confirmer l'implication des domaines PDZ dans l'interaction entre les protéines Scrib1 et Vangl2. Ces études ont révélé une grande interaction entre les deux protéines, cette interaction a été fortement réduite lors de l'introduction de la mutation de la souris *Lp* et complètement supprimée en absence du motif de liaison PDZ de Vangl2, ce qui montre l'importance de cette partie de Vangl2 dans l'interaction entre ces deux protéines. Comme chez la *drosophile*, pour définir le ou les domaines responsables de cette interaction, les domaines PDZ (1, 2, 3 et 4) individuels ainsi que les combinaisons PDZ1-PDZ2 et PDZ3-PDZ4 ont été testées pour leur capacité à se lier de manière indépendante à la protéine Vangl2. Ces études ont révélé une grande implication des deux domaines PDZ 2 et 3 dans l'interaction avec Vangl2. Important, les constructions incluant seulement la partie N-terminale de Scrib1, seulement le LRR, n'étaient pas capables de se lier à Vangl2 (228).

Il a été aussi démontré que cette interaction n'affecte pas la localisation de Vangl2, mais elle affecte sa distribution asymétrique. Les études menées sur les souris *Crc* révèlent une perte d'asymétrie de Vangl2, en particulier dans la deuxième et la troisième rangée des CCE, ce qui corrèle fortement avec les défauts de la voie PCP déjà observés dans la région de la cochlée de cette mutante (218, 228). Ensemble, ces résultats suggèrent une interaction spécifique entre Vangl2 et Scrib1 dans le contexte de la voie PCP.





**Figure15 :** Illustration schématique qui montre l'interaction entre Scrib1 et Vangl2. La signalisation PCP implique en aval des cascades de signalisation c-Jun qui entraînent des réarrangements du cytosquelette. Adapté de Puvirajesinghe TM et al., 2015 (229).

### 1.9.8. Le rôle de *SCRIB1* dans les ATN humaines

Plusieurs études ont montré une forte association entre les gènes de la voie PCP et les ATN chez les souris et les humains. *SCRIB1* fait partie des gènes associés à cette voie. Les souris qui ont une mutation homozygote dans le gène *Scrib1* ligne-90 (p.I285K) et Circletail (*Crc*) présentent une forme très sévère des ATN qui est la craniorachischisis. Une étude récente a rapporté que des mutations (p.P454S et p.R1535Q) dans le gène *SCRIB1* étaient associées à une craniorachischisis chez l'homme. Ces mutations ont révélé un effet nettement néfaste sur la localisation membranaire de Scrib1 dans les cellules MDCK II polarisées (230). Une autre étude récente réalisée sur 192 patients atteints de spina bifida a révélé l'identification de trois mutations p.P1043L, p.P1332L et p.L1520R qui affectent la localisation membranaire de la protéine Scrib1. Il est important de noter que la mutation de la souris mutante ligne-90 affecte aussi la localisation sous-cellulaire de la protéine Scrib1 d'une manière néfaste (231). Ainsi, dans notre laboratoire et durant ma maîtrise j'ai réussi à détecter 5 mutations **p.Gly263Ser**, **p.Pro649His**, **p.Gln808His**, **p.Arg1150Gln** et **p.Thr1422M** associées aux ATN dans *SCRIB1* dans 9 patients atteints des ATN (notre cohorte formée de 473). Toutes ces mutations étaient prédites pathogènes par les outils bio-informatiques SIFT et Polyphen.

### 1.9.9. *Scribble1* et la formation des jonctions adhérentes

Une forte adhérence cellulaire-cellulaire via les jonctions adhérentes (JA), un élément des complexes de jonction, est nécessaire pour l'établissement et le maintien de l'architecture épithéliale (232). La principale molécule d'adhésion chez les JAs est la cadhérine, dont les interactions homophiles par son domaine extracellulaire relie mécaniquement les cellules. Le domaine cytoplasmique de la cadhérine se lie directement à la  $\beta$ -caténine, qui se lie à l' $\alpha$ -caténine. L' $\alpha$ -Catenin s'associe directement ou indirectement avec les filaments d'actine et qui à leurs tours également recrute plusieurs protéines liées à l'actine (233-236). Ce lien de la cadhérine aux filaments d'actine via les caténines est considéré comme un élément indispensable pour une forte adhésion cellulaire (233). Plusieurs groupes ont rapporté l'implication de la protéine Scrib1 dans l'adhésion cellulaire par les cadhérines dans les cellules épithéliales. La localisation de Scrib1 dans la membrane plasmique basolatérale dépend des contacts cellulaires assurés à travers l'E-cadhérine, où il se colocalise avec l'E-cadhérine ou bien  $\beta$ -caténine (237). Ainsi, dans les cellules épithéliales embryonnaires de *C. elegans*, l'homologue de Scrib1, Let-413, se localise également dans la région basolatérale et est impliqué dans la localisation des composants des JA à une position sous-apicale discrète (238). Chez les mammifères, Scrib1 a été localisée dans les jonctions cellulaires des cellules MCF10-2A, Caco-2 et MDCK, ainsi Scrib1 colocalise et interagit avec la protéine  $\beta$ -caténine qui est un élément clé dans la construction des JAs (239). Ainsi, dans une autre étude sur les souris mutantes *Crc*, il a été démontré que Scrib1 est localisée sur la membrane cellulaire et au niveau des JAs et interagit physiquement avec la  $\beta$ -caténine. Finalement, la suppression de *SCRIB1* dans les cultures organotypiques aboutit à des amas constitués de cellules désordonnées ainsi d'une localisation sus-cellulaire perturbée de la  $\beta$ -caténine, Zo-1 et Zo-2 (181). Toutes ces informations nous mènent à la conclusion que la protéine Scrib1 régule les contacts des cellules épithéliales et la distribution sous-cellulaire des protéines impliquées dans la formation et la régulation des JAs et ceux-ci est probablement grâce à l'association de la protéine Scrib1 avec la  $\beta$ -caténine au niveau de ces jonctions dans les contacts cellulaires.

## 1.10. La relation entre la PCP et la polarité apicale basale

Depuis la découverte de la PCP, de nombreuses études essayent de résoudre le mystère de cette polarité qui intervient dans le réaménagement du cytosquelette en agissant sur les fibres d'actine et les microtubules. Ce phénomène de réarrangement a un effet très important sur plusieurs mécanismes cellulaires tels que la migration, la division cellulaire, le guidage axonal et la ciliogénèse et sur plusieurs processus au cours du développement, comme la gastrulation et la neurulation au cours de la fermeture du tube neural, ainsi que dans la morphogène de plusieurs organes. Tous ces rôles de la voie PCP révèlent son rôle très important dans les différents phénomènes biologiques qui organisent les êtres vivants et peut expliquer sa relation étroite avec les ATN.

Plusieurs études ont mis en évidence une relation étroite entre les deux types de polarité, la polarité apico-basale et la polarité cellulaire planaire (224, 240). La première fois que cette relation a été discutée chez les mammifères était en 2003 par Montcouquiol, où elle a révélé que le gène de la polarité A-B *Scrib1* fait partie de la PCP. Cette étude a démontré ainsi une interaction génétique et physique entre *Scrib1* et un autre membre de la voie PCP qui est *Vangl2* (218). Une autre étude a montré une autre interaction entre Dlg et Vangl chez la *Drosophile* qui assure la formation des membranes plasmiques (241). aPKC aussi à son tour assure la phosphorylation et la régulation de l'activité de Frizzled et qui sera inhibé par la liaison de Par3 avec aPKC. De même, il a été démontré aussi que Dishevelled est impliqué dans la régulation de la polarité A-B par la régulation de Lgl (240, 242). Ainsi, l'interaction entre les gènes *Stbm* et *Scrib1* a été établie dans une étude chez la *Drosophile* en se basant sur la mauvaise orientation et l'asymétrie des ommatidies au niveau de l'œil (224). Toutes ces interactions soient génétiques ou physiques entre les différents membres des deux polarités apico-basales et planaire cellulaire révèlent une relation étroite entre les deux polarités au cours du développement.

## 2. Problématique, Hypothèse et Objectifs

### 2.1 Problématique

Les ATN sont des maladies qui touchent 1-2 bébés par 1000 naissances. Elles sont considérées comme la principale cause de mortalité périnatale après les maladies congénitales cardiaques. Dans leur première année de vie, les enfants atteints de ces maladies ont un risque de mortalité plus élevé, comparé aux enfants normaux (13). Aux États-Unis pour l'année 2003 par exemple, les frais hospitaliers totaux pour les nouveau-nés atteints d'ATN se lèvent à 74 millions de dollars pour la spina bifida, 1 million de dollars pour l'anencéphalie et 11 millions de dollars pour l'encéphalocèle (63). Plusieurs études sont réalisées par différents groupes de recherche issus d'une grande variété de disciplines pour essayer de comprendre la complexité de ces maladies et finalement assurer une bonne prévention pour diminuer la souffrance des bébés. Malgré toutes ces études, les données qu'on a sur les gènes impliqués dans le développement des ATN restent largement insuffisantes et même si on arrive un jour à connaître le vrai nombre de ces gènes et leurs identités, il reste à savoir toujours comment ces gènes interviennent dans l'établissement de ces maladies.

Des études chez la souris modèle ont fortement impliqué le gène *Scribble 1* dans les ATN. Des mutations homozygotes dans ce gène causent une forme mortelle d'ATN appelée craniorachischisis dans laquelle le tube neural reste ouvert tout au long de la moelle épinière (120). *Scrib1* interagit génétiquement et physiquement avec *Vangl2*, un gène clé de la voie PCP qui contrôle le processus de l'extension convergent pendant la formation du tube neural chez les vertébrés (120, 243). Cependant, *Scrib* est un régulateur clé de la polarité A-B des cellules épithéliales, de l'architecture présynaptique et à court terme de la plasticité synaptique dans la *Drosophile*. Chez les mammifères, *Scrib1* a été aussi impliqué dans la polarité A-B et pendant longtemps a été étudié dans le cancer comme un suppresseur de tumeurs (124). Dans les souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*, des études antérieures ont démontré que la polarité A-B n'est pas affectée dans le développement du poumon et du cœur, ce qui suggère que les défauts de développement causés par la perte de fonction de *Scrib1* dans ces tissus sont indépendants de son rôle dans la polarité A-B (180, 181). Le rôle de *SCRIB1* dans les ATN humaines ainsi que

les mécanismes pathogéniques par lesquels des mutations dans ce gène causent des ATN restent mal connus.

## 2.2. Hypothèse et objectifs

Notre étude a pour but de comprendre le rôle du gène *Scribble1* dans l'étiologie des anomalies de tube neural, en identifiant la base moléculaire par laquelle ce gène agit pendant le processus de la fermeture du tube neural.

Nos hypothèses sont :

- 1) *SCRIB1* joue un rôle important dans le développement des ATN humaines.
- 2) Les défauts du développement du tube neural causés par la perte de fonction de *Scrib1* sont indépendants de son rôle dans la polarité A-B

Nos objectifs spécifiques sont les suivants

(1) Étudier les profils d'expression des marqueurs des deux types de polarité (A-B et PCP) ainsi que ceux des jonctions adhérentes et serrées au cours du développement de tube neural des souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>*

(2) Valider l'effet pathogénique potentiel des mutations *Scrib1* humain (identifiées dans notre cohorte) et des souris ligne-90 et Crn2.

## 3. Matériels et méthodes

### 3.1. Maintenance des souris

La mutation dans la souris *Circletail* est une mutation spontanée qui est apparue dans un mélange de lignes transgéniques NMRI, BALB/c, C57BL/6 qui a été rétrocroisée deux fois avec la souche C57BL/6. Le phénotype de la queue en forme de cercle (*Circletail*) a été isolé de la ligne transgénique et maintenu en croisant les mâles *Circletail* avec leurs confrères femelles de la même génération. L'investigateur donneur a maintenu la souche *Circletail* en croisant des souris hétérozygotes *Crc/+* à la souche consanguine, CBA / CaJ. Le laboratoire de Jackson a importé cette souche en 2007 (<https://www.jax.org>).

Dans notre laboratoire, les souris *Circletail* ont été obtenues auprès du laboratoire de Jackson après la récupération cryogénique (numéro de stock 006130, CBACa.CgScrib<sup>Crc</sup>/RachJ). Au total, 7 femelles (2 Scrib1<sup>Crc/+</sup> et 5 sauvages) et 2 mâles (1 Scrib1<sup>Crc / +</sup> et 1 sauvage) ont été obtenus et utilisés pour établir notre colonie de souris. Ensuite, la colonie a été maintenue par des croisements frères sœurs. Ainsi, toutes les trois générations des croisements avec la souche consanguine CBA / CaJ ont été réalisées. Les souris ont été examinées de façon macroscopique pour la présence d'une queue gravement "pliée" ou "en boucle". Enfin, les embryons ont été récupérés et examinés pour la présence des ATN aux stades E9.5-10 et E11.5.

### 3.2. Génotypage des souris

L'ADN génomique a été extrait de la queue des souris ou du sac vitellin en utilisant le kit EZ-10 Spin Column Animal DNA Mini-Preps (BS628, Bio Basic Inc. Canada, ON) selon le protocole du fabricant. Chez les souris *Crc*, l'insertion de la base unique Cytosine -C- dans le gène *Scrib1* au niveau de l'exon 21 crée un décalage du cadre de lecture de *Scrib1*, ce qui va produire un codon d'arrêt. Le génotypage a été réalisé avec amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR) sur l'ADN génomique de l'exon 21 du gène *Scrib1* (183 pb). Les amorces utilisées pour le génotypage sont mScrib-F (5'- CTG ACT GCT GCT TCC CCT AC -3') et mScrib-R (5'- TCC ACA GGG TAT GGT CCT TC -3'). L'exon 21 a été amplifié par PCR avec OneTaq® DNA Polymerase de New England Biolabs (numéro de Catalogue

M0480L) à l'aide de l'appareil de Applied Biosystems GeneAmp© System 9700, selon les conditions suivantes : 30 secondes à 94°C pour la dénaturation initiale, suivi par 35 cycles chacun de 15 secondes à 94°C pour la dénaturation, 15 secondes à 58°C pour l'hybridation, 30 secondes à 68°C pour l'élongation, suivi par un dernier cycle d'élongation d'ADN de 5 minutes à 68°C. Le séquençage des produits de PCR a été réalisé en utilisant les Systèmes ABI Prism Big Dye. Les échantillons ont été analysés sur le séquenceur ABI 3700 automatisé au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Les séquences obtenues ont été analysées ensuite par le logiciel SeqMan de DNASTAR. Les géotypes ont été confirmés pour toutes les souris incluses dans l'étude.

### **3.3. Plasmides utilisés**

Pour les expériences avec le système double hybride (Y2H), l'ADN complémentaire (ADNc) de *hVANGL2* (numéro d'accès Q9ULK5) qui correspond au domaine cytoplasmique (entre les positions 720-1560 nucléotides (nt)) a été cloné dans le plasmide de levure pGBKT7 (*hVANGL2*-Cterm-pGBKT7). Tandis que l'ADNc qui correspond aux domaines PDZ (entre les positions 2181- 3585 nt) de *SCRIB1* (numéro d'accès GenBank NM\_015356) a été cloné dans le plasmide de levure pGADT7 (*hSCRIB1*-PDZ-pGADT7) en utilisant la méthode de clonage appelé SLIC (244).

Pour le reste des constructions utilisées dans les études de localisation de sauvetage, le hScrib-GFP de type sauvage a été gracieusement fourni par le Dr WJ Van de Ven (Université de Louvain), les constructions ScrbKD, Par-3-KD et hPar-3 ont été toutes gracieusement fournis par le Dr Ian G. Macara (University of Virginia School of Medicine) et enfin la construction HA-Vangl2 a été généreusement fournie par Dr David D. Ginty (Université Johns Hopkins).

### **3.4. Mutagenèse dirigée**

Les 5 mutations (p. Gly263Ser, p. Pro649His, Gln808His, p. Arg.1150Gln et p. Thr1422Met) identifiées dans notre cohorte de patients d'ATN, ainsi que les mutations p. Ile285Lys et p. Glu814Gly identifiées dans les souris ligne 90 (226) et Crn2 (227) respectivement étaient introduites dans la construction hScrib-GFP par mutagenèse dirigée en suivant le protocole de Agilent (QuikChange II XL Site- Directed Mutagenesis Kit - 200521). Pour le système double hybride, les deux mutations humaines p.Gln808His et p.Arg1150Gln,

ainsi que la mutation souris p. Glu814Gly ont été introduites dans la construction hSCRIB1-PDZ-pGADT7 en utilisant la même technique de mutagenèse dirigée. Les amorces utilisées pour l'amplification des clones sont présentées dans le **tableau1**. Les différents clones ont été amplifiés avec la Taq PfuUltra de la compagnie Agilent (Numéro d'accès 600353) selon les conditions suivantes: 60 secondes à 95°C, suivi de 35 cycles à 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 59°C (8 min 30 sec pour hSCRIB1-PDZ-pGADT7 et 10 min pour hScrib-GFP) à 68°C, suivi d'une période d'élongation de 5 minutes à 68°C.

**Tableau 1.** Amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée pour introduire les mutations humaines et souris dans hScrib-GFP et hSCRIB1-PDZ-pGADT7.

Nom de l'amorce/mutation	Séquence de l'amorce (5'-3')
hSCRIB-G263S-	F: GCCCGACGGCATCAGTCAGCTGAAGCA R: CGGGCTGCCGTAGTCAGTCGACTTCGT
hSCRIB-P649H-	F: GGCACAATGGCCACCACGCACCCTG R: CCGTGTTACCGGTGGTGCGTGGGAC
hSCRIB-Q808H-	F: GCACTGCCGTGCATATGCGAGTGTGGC R: CGTGACGGCACGTATACGCTCACACCG
hSCRIB-R1150Q-	F: GCGCGACGGTCAGCTGCGTGTGG R: CGCGCTGCCAGTCGACGCACACC
hSCRIB-T1422M-	F: CCCTGGACGGGGAGATGCTGGGCG R: GGGACCTGCCCCTCTACGACCCGC
hSCRIB-I285K-	F: GAGGTGACCGAGGCCAAAGGGGACTGTGAG R: CTCACAGTCCCCTTTGGCCTCGGTCACCTC
hSCRIB-E814G-	F: GAGTGTGGCGGGGGCGCATGGTGGA R: TCCACCATGCGCCCCCGCCACACTC



## 3.5. Culture cellulaire

Au cours de cette étude, deux lignes de cellules épithéliales du rein de canin Madin-Darby (MDCK) ont été utilisées : (1) les cellules MDCK II normales utilisées pour les études de localisation de hScrib-GFP et (2) les cellules MDCK II transfectées d'une façon stable avec *VANGLI* marquée par c-Myc / HA et qui a été cloné dans des vecteurs pGFP-C1 qui seront utilisés pour des études de suppression et de sauvetage. Ces dernières ont été fournies gracieusement par Dr Philippe Gros (Université McGill, Montréal, Canada). Les deux lignes cellulaires de MDCK II ont été cultivées dans des plaques de culture contenant du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complété par 10% de sérum bovin fœtal, 100 unités/ml de pénicilline et 100 ug/mL de streptomycine. Les pétries cellulaires ont été incubées dans un incubateur de culture cellulaire à une température de 37 °C et qui est maintenu à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.5.1. Transfection

Un très grand nombre de techniques de transfection de cellules en culture ont été décrits par plusieurs études. Les exigences générales pour un bon agent de transfection sont qu'il soit appliqué en utilisant des protocoles simples et robustes pour effectuer une transfection efficace dans une large gamme de types cellulaires sans cytotoxicité excessive (245). Dans notre étude, on a essayé plusieurs agents de transfection pour obtenir un bon taux de transfection dans les cellules MDCK II comme le Calcium, Polyéthylèneimine (PEI) et le Lipofectamine. La lipofectamine est une formulation cationique contenant des sous-unités lipidiques qui peuvent former des liposomes qui fonctionnent en complexant avec des plasmides d'ADN, ce qui leur permet de surmonter la répulsion électrostatique de la membrane cellulaire et d'être absorbées par la cellule (245). Avec l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (Invitrogen), on a réussi à obtenir un taux de transfection entre 60-70% des cellules MDCK transfectées. Ce taux de transfection nous a poussés à continuer de travailler avec ce réactif tout au long des études de localisation de hScrib-GFP.

Pour les études de localisation, la transfection avec 5 microgrammes (µg) de hScrib-GFP de type sauvage ou mutant a été effectuée en utilisant le lipofectamine 2000. Ensuite, les cellules MDCK II ont été cultivées dans un milieu DMEM sans sérum et après 3h le milieu a

été remplacé par un milieu DMEM complété par un sérum bovin foetal avec deux antibiotiques pénicilline/streptomycine et incubé dans un incubateur de culture cellulaire a une température de 37 °C et qui est maintenu à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été examinées pour la localisation de hScrib-GFP à 48 heures après la transfection.

Pour toutes les études de localisation, la transfection a été effectuée 3 fois pour chaque construction et l'identité de la construction (type sauvage ou mutant) n'était pas connue par l'expérimentateur.

### 3.5.2 Électroporation

L'électroporation est une technique d'introduction d'ADN dans des cellules qui se caractérise par l'application d'un choc électrique à haute tension sur la membrane cellulaire (246). Les cellules MDCK II transfectées d'une façon stable avec *VANGLI* ont été les cellules transfectées avec cette technique. Un total de 10<sup>6</sup> cellules a été transfecté de manière transitoire en suspension par électroporation (Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems, Voltage : 300 Volt, Capacitance : 500 micro Farad, Resistance : ∞ Ohm) dans des cuvettes de 4 millimètres, en utilisant 5 µg de ScrbKD ou 5 µg de Par-3 KD pour la suppression de *Scrib1* et de *Par3* respectivement. Pour les expériences de sauvetage, plusieurs combinaisons de constructions ont été réalisées : 5 µg de ScrbKD a été co-transfectées avec 5 µg de hScrib-GFP du type sauvage ou mutant, 5 µg ScrbKD a été cotransfecté avec 5 µg de HA-Vangl2 et enfin 5 µg ScrbKD a été cotransfecté avec 7 µg hPar-3. Une autre co-transfection a été faite de 5 µg de Par-3 KD avec 7 µg de hPar-3. Juste après l'électroporation ,500 µl de DMEM sans sérum a été ajouté directement dans les cuvettes et le tout a été transféré dans des plaques de culture cellulaire avec 10 ml du milieu DMEM complété par un sérum bovin foetal avec les deux antibiotiques pénicilline/streptomycine et incubé dans un incubateur de culture cellulaire à une température de 37 °C et qui est maintenu à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été récupérées 36 heures après l'électroporation pour les expériences suivantes telles que l'immunofluorescence et le western blot.

Pour les études de localisation apicale et basolatérales, l'électroporation a été effectuée 3 fois pour chaque construction et l'identité de la construction (type sauvage ou mutant) n'était pas connue par l'expérimentateur pendant les expériences de sauvetage.

## 3.6. Immunofluorescence

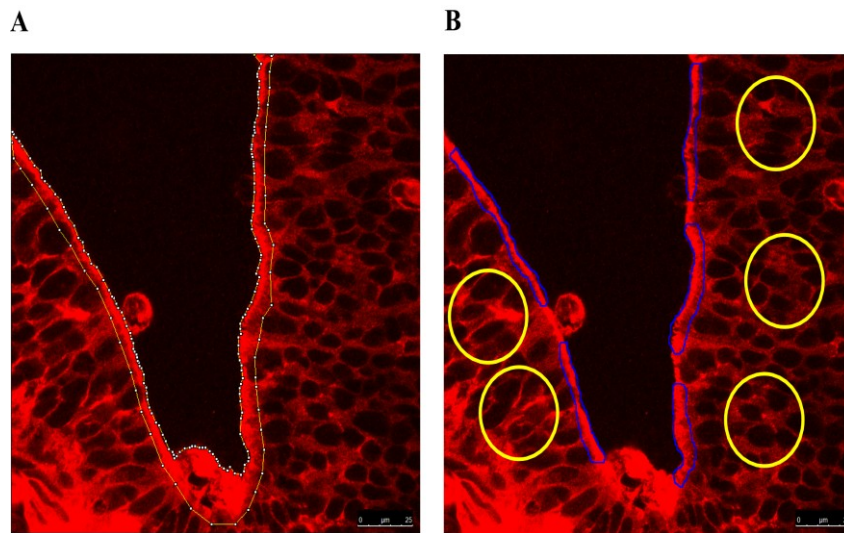
Dans notre projet de recherche, deux catégories d'immunofluorescence ont été utilisées selon le modèle utilisé, soit des souris *Circletail* ou des cellules MDCK II.

### 3.6.1. Immunofluorescence des tissus neuro-épithéliaux de souris

Des embryons de souris de E9-9.5 et E11.5 (E, jour embryonnaire) ont été utilisés pour cette expérience. Les embryons ont été post-fixés dans 4% de PFA (paraformaldehyde) / PBS (phosphate-buffered), puis cryoprotégés dans 30% de saccharose / PBS et enfin incorporés dans un composé OCT. Les embryons fixés ont été congelés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les embryons congelés dans l'OCT ont été finalement coupés en plusieurs sections de  $14\ \mu\text{m}$  d'épaisseur chacune en utilisant le cryostat (Laica CM3050S) et montés sur des lames de culture. Les sections ont été incubées dans une solution de blocage avec un anticorps primaire pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  avec les anticorps suivants: anti-Scrib1 polyclonale de lapin (SANTA CRUZ sc-28737, 1: 400), anti-Lgl2 monoclonale de souris (SANTA CRUZ Sc-376857, 1: 400), Anti- $\beta$ -Catenin monoclonale de lapin (Abcam ab32572, 1: 250), Anti-ZO-1 monoclonal de souris (Invitrogen 339100, 1: 100), anticorps polyclonale de chèvre anti-Vangl2 (SANTA CRUZ sc -46561, 1:50), la phalloïdine conjuguée Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific A12379, 1:40) et anti-Par-3 polyclonale de lapin (Millipore 07-330, 1: 400). Après trois rinçages de 10 min chacun dans le PBS, les sections ont été incubées avec les anticorps secondaires suivants: Alexa fluor 555 de chèvre anti-lapin (Thermo Fisher Scientific A-21428, 1: 400) pour Par-3 et Scrib1, Alexa fluor 555 anti-chèvres d'âne (Thermo Fisher Scientific A-21432, 1: 400) pour Vangl2 et enfin Alexa fluor 555 de chèvre anti-souris (Thermo Fisher Scientific A-21422, 1: 400) pour Lgl2 et ZO-1 pendant 1h 30 min. Une incubation finale a été effectuée avec DAPI (avec une concentration de 300 nM) / PBS pendant 5 min et les lamelles ont été montées sur les lames sur lesquelles se trouvent les sections avec une solution de montage VECTASHIELD® (Victor, H1000). Les images ont été obtenues avec un microscope confocal (Zeiss LSM 710 710 Axiovert 100M inverted confocal microscope and Leica, SPE, upright microscopes), en utilisant un objectif de glycérine 63X.

Pour quantifier l'expression des protéines dans les tissus nerveux, l'analyse des différentes images obtenues par microscope a été effectuée avec le logiciel Image J. La densité

de fluorescence moyenne a été calculée à la fois pour la région apicale (face à la lumière de tube neural) et la région subapicale (prise à une distance de 10 à 70  $\mu\text{m}$  de la région apicale) du tube neural. Après avoir soustrait l'arrière-plan, la densité de la fluorescence moyenne a été quantifiée dans 5 sections histologiques apicales ou subapicales par embryon. Au total, 3 embryons provenant de chaque génotype (type sauvage ou mutant) ont été analysés et la fluorescence moyenne a été exprimée dans des unités arbitraires. Un exemple de ce type d'analyse est présenté dans la **Figure 16**.



**Figure 16** : Immunohistochimie d'une cryosection transversale de la partie ventrale de tube neural qui montre les deux parties (A) apicale entourée d'une ligne jaune en face a la lumière de tube neural et la partie subapicale située à une distance de de 10 à 70  $\mu\text{m}$  de la partie apicale. (B) les deux régions apicale et subapical où les mesures sont faites par Image J. Les cercles bleus montrent les mesures d'intensité de signal faites dans la partie apicale et les cercles jaunes montrent les mesures d'intensité de signal faite dans la partie subapicale.

### 3.6.2. Immunofluorescence pour des cultures cellulaires

Après la transfection ou l'électroporation des cellules, ces dernières ont été cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques de culture de 10 mm. Quarante-huit et trente-six heures après la transfection et l'électroporation, les lamelles ont été fixées dans une solution 4% PFA/PBS pendant 20 min, perméabilisées par 0,1% de Triton X-100 / PBS pendant 10

min et bloquées dans 2% de sérum de chèvre / PBS pendant 60 min (pour Par-3). Pour les protéines Scrib1, Lgl2,  $\beta$ -Catenin, ZO-1 et VANGL1-HA, les lamelles ont été fixées dans 4% de PFA/PBS (1 minute) sur glace, perméabilisées avec 100% de méthanol glacé pendant 10 min, réhydratées avec une solution PBS pendant 5 min et enfin bloquées dans une solution 1% de BSA (Albumine de sérum bovin) /PBS pendant 30 min à la température pièce. Les lamelles ont été incubées avec différents anticorps primaires dans une solution de blocage pendant une nuit à la température pièce pour Par-3 et VANGL1-HA, tandis que l'incubation pour les autres anticorps a été faite pendant 1 heure (la concentration des anticorps primaires était tels que décrits dans la section 3.6.1). Pour VANGL1-HA, on a utilisé un anticorps anti-HA monoclonal de souris (abcam ab1424, 1: 200). Après trois rinçages prolongés dans le PBS et une incubation avec un anticorps secondaire approprié (tel que déjà décrit dans la section 3.6.1) pendant 1h 30min, les lamelles ont été montées sur des lames de culture avec la solution de montage VECTASHIELD® (H1000).

Les images et les sections dans l'axe des Z ont été acquises avec un microscope confocal en utilisant un objectif de glycérine 63X. Les faces apicales et basolatérales des cellules MDCK II ont été analysées à l'aide des sections dans l'axe des Z acquises à des intervalles de 0,5  $\mu$ m. Pour les études de localisation de hScrib1-GFP, un total de 100 cellules ont été examinées par transfection. Tandis que, pour les études de localisation apicale et basolaterales, un total de 45 cellules ont été examinées par transfection (3 zones différentes ont été sélectionnées et 15 cellules ont été examinées par zone).

### **3.7. Le système double hybride chez les levures (Y2H)**

Le système double hybride chez les levures (Y2H) est une méthode qui a été largement utilisée pour cartographier et identifier des réseaux d'interaction protéine-protéine dans de nombreux organismes. Cette technique peut être utilisée à petite échelle ou dans des approches de dépistage à haut débit. La méthode à double hybride est basée sur le principe de la restauration de l'activité protéique lors de la reconstitution non covalente des fragments des protéines fractionnées. Un fragment d'une protéine modulaire est fusionné à une protéine X, tandis que l'autre fragment est fusionné à une protéine Y. Les protéines de fusion résultantes peuvent être appelées appâts et proies. Si les protéines X et Y interagissent lors de la co-

expression, la protéine modulaire est reconstituée et retrouve son activité. L'activité de la protéine modulaire sera détectée par l'activation d'un gène rapporteur, ce qui va permettre la croissance de levure (247).

Dans ce projet, on a utilisé le système MatchMaker 3 de Clontech (numéro de catalogue : K1612- 1) de levure pour étudier l'interaction entre hVANGL2-Cterm et le hSCRIB1-PDZ de type sauvage ou mutant. Le hVANGL2-Cterm-pGBKT7 et chacune des constructions de type sauvage ou mutant hSCRIB1-PDZ-pGADT7 ont été introduites dans les souches AH109 (MAT $\alpha$ ) et la Y187 (MAT $\alpha$ ) de levure *Saccharomyces cerevisiae* (hSCRIB1-PDZpGADT7 Dans AH109 et hVANGL2-Cterm-pGBKT7 dans Y187). Dans ce système, la souche AH109 exprimera la protéine hSCRIB1-PDZ avec le domaine d'activation de la protéine Gal 4 (galactose-responsive transcription factor), tandis que et la souche Y187 exprimera le hVANGL2-Cterm avec le domaine de liaison de la protéine Gal4. Les clones *S. cerevisiae* AH109 et Y187 ont été accouplés et l'activité GAL4 reconstituée (interaction entre les deux protéines hSCRIB1-PDZ et hVANGL2-Cterm fusionnées aux domaines de liaison et d'activation d'ADN de GAL4) a été testée en plaçant les cellules diploïdes de levures sur différents milieux de sélection: double abandon (DDO) -Leu / -Trp (milieu dépourvu de leucine et de tryptophane) et triple abandon (TDO) -His / -Leu / -Trp (milieu dépourvu d'histidine, Leucine et tryptophane). Les interactions protéine-protéine ont été évaluées en évaluant la croissance des cellules diploïdes dans un milieu solide après 96 h à 30 °C. Pour confirmer nos résultats, les cellules diploïdes ont été cultivées dans un milieu liquide DDO pour tester la sécrétion de l' $\alpha$ -galactosidase.

### **3.8. Western blot**

Les cellules MDCK II récoltées 48 heures après la transfection ont été lavées dans PBS et lysées dans du tampon RIPA (50 mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% SDS (dodécylsulfate de sodium), 0.5% Na-deoxycholate, 1% Triton (X100), 1 mM EDTA × Mixte complet d'inhibiteurs de protéase, dans PBS) pendant 30 min. Les lysats ont été centrifugés pendant 1 min à 17000 tours / min et le surnageant a été recueilli et maintenu à -80<sup>0</sup>C jusqu'à utilisation. Un total de 40  $\mu$ g d'extraits de protéines a été bouilli dans un tampon de chargement à 100<sup>0</sup>C pendant 10 min, séparé par SDS sur un gel de polyacrylamide et puis transféré sur une

membrane PVDF pendant 45 minutes. La membrane a été bloquée dans 5% de lait / TBS (Tris salés tamponnés) pendant 30 minutes et incubée pendant 1h30min à température ambiante avec les anticorps primaires anti-Scrib1 (1: 400), anti-HA (1: 5000) pour HA-Vangl1, anti-Par-3 (1: 1000), anti-B-actine (1/6000) et anti-GFP (Life Technologies A6455, 1: 200) dans 5% de lait / TBST (TBS / 0,1% de tween20). Ensuite, la membrane a été lavée dans TBST, suivie de 1h d'incubation à température ambiante avec l'anticorps conjugué avec HRP approprié (Abcam, Cambridge, MA), suivi de 3 x 5 minutes de lavage avec TBST. Enfin, le signal a été détecté par une chimioluminescence sur un film en utilisant le réactif de détection de bavardage primitif Amersham ECL (GE Healthcare).

### **3.9 Tests statistiques**

Pour la confirmation des résultats, chaque expérience a été répétée 3 fois. La signification statistique entre les expériences et entre les groupes a été calculée avec le test *Z* pour 2 populations (sauvage et mutante). Pour les mesures de densité de fluorescence et l'essai de quantification de Y2H, la signification statistique a été calculée en utilisant le T-test. Le seuil de signification a été fixé à 0,05.

## 4. Résultats

### 4.1. Effet de l'absence de la protéine Scrib1 sur l'expression des marqueurs de la polarité apicobasale et du membre de la voie PCP Vangl2

Afin d'étudier les effets d'une suppression ou d'une absence totale de la protéine Scrib1 sur les différents marqueurs de la polarité apicobasale, ainsi que sur le membre de la voie PCP Vangl2, on a utilisé deux modèles :

(1) un modèle animal : la souris mutante *Crc* caractérisée par une absence totale de la protéine chez les souris homozygotes *Crc/Crc* (causée par une insertion d'une base unique de Cytosine - C - entre les positions 3182-3183 qui crée un décalage du cadre de lecture et une terminaison prématurée de la protéine) (120).

(2) des cultures cellulaires (MDCK II) transfectées avec un shRNA qui cible Scrib1 et qui réduit son expression par ~60% (135).

#### 4.1.1. Expression des marqueurs de la polarité apicobasale et de Vangl2 dans le tube neural des souris *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*.

Pour déterminer si *Scrib1* agit dans la polarité A-B et/ou dans la voie PCP au cours du développement du tube neural, nous avons analysé les profils d'expression des marqueurs des deux types de polarité A-B et polarité planaire cellulaire, ainsi que les marqueurs qui interviennent dans la formation des jonctions serrées et adhérentes, dans des sections embryonnaires au niveau du tube neural des souris mutantes *Crc* (*Scrib1<sup>Crc / Crc</sup>* E9.0-9.5) (**Figure 17**). La répartition cellulaire du marqueur basolatéral Lgl2 n'a pas été affectée ainsi que celles des marqueurs ZO-1 et  $\beta$ -caténine qui sont des protéines qui interviennent dans la formation des jonctions serrées et adhérentes respectivement (248, 249). Ces deux protéines étaient à leurs tours normalement réparties et détectées au niveau des contacts cellulaires pour assurer les différentes liaisons cellule-cellule (**Fig.17A-I**). L'immunohistochimie avec ZO-1 du côté **apical** des cellules neuroépithéliales du tube neural a été significativement diminuée dans les sections des souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>* ( $P < 0,05$ ) (**Fig.17H, I**). En revanche, on a

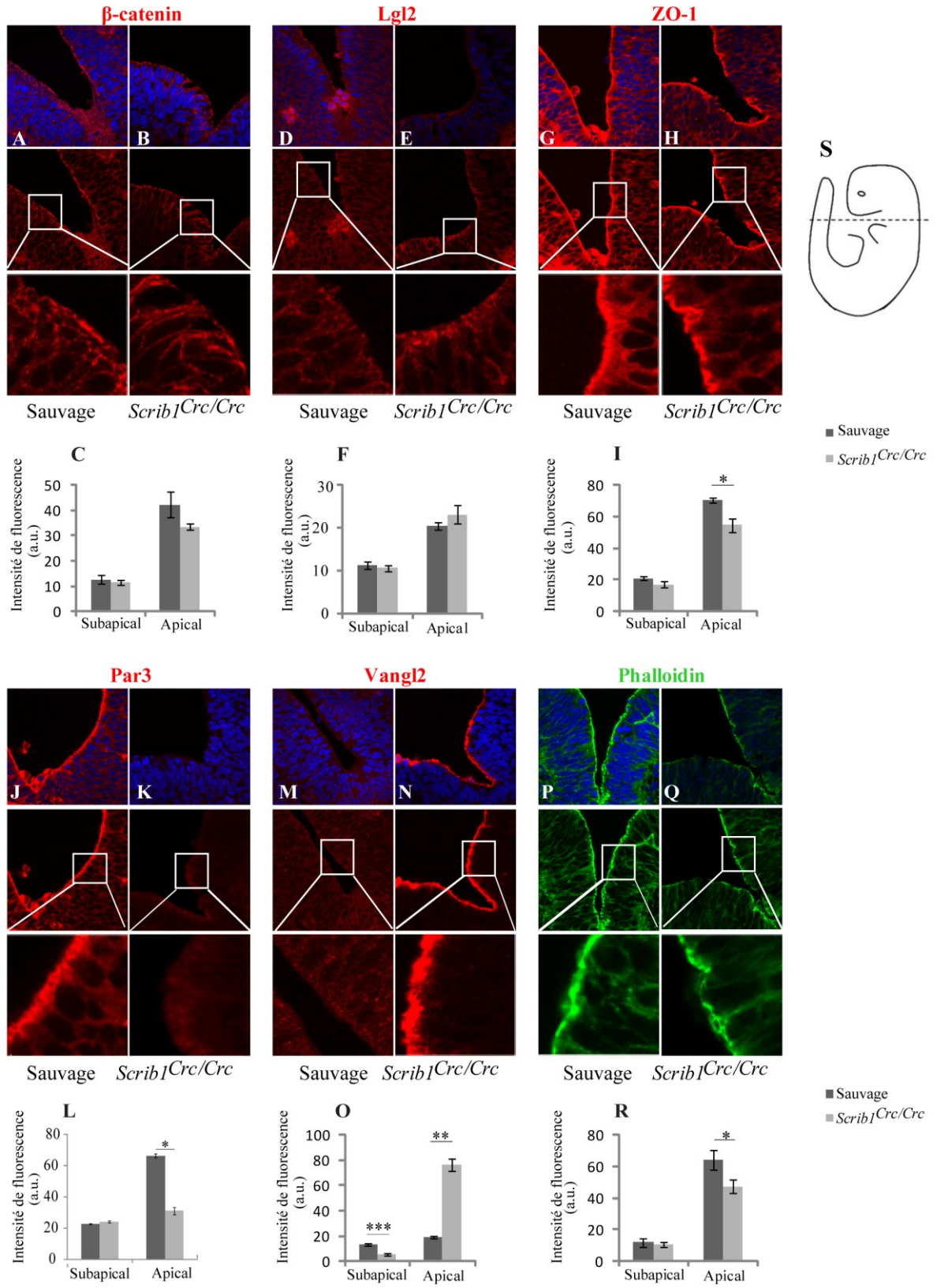


observé une perturbation importante de la localisation du marqueur apical Par-3 où il a perdu de façon significative sa localisation sur la partie **apicale** ( $P < 0,05$ ) et il a changé sa localisation membranaire vers une localisation cytosolique dans les tissus des souris mutantes (**figure 17J, L**).

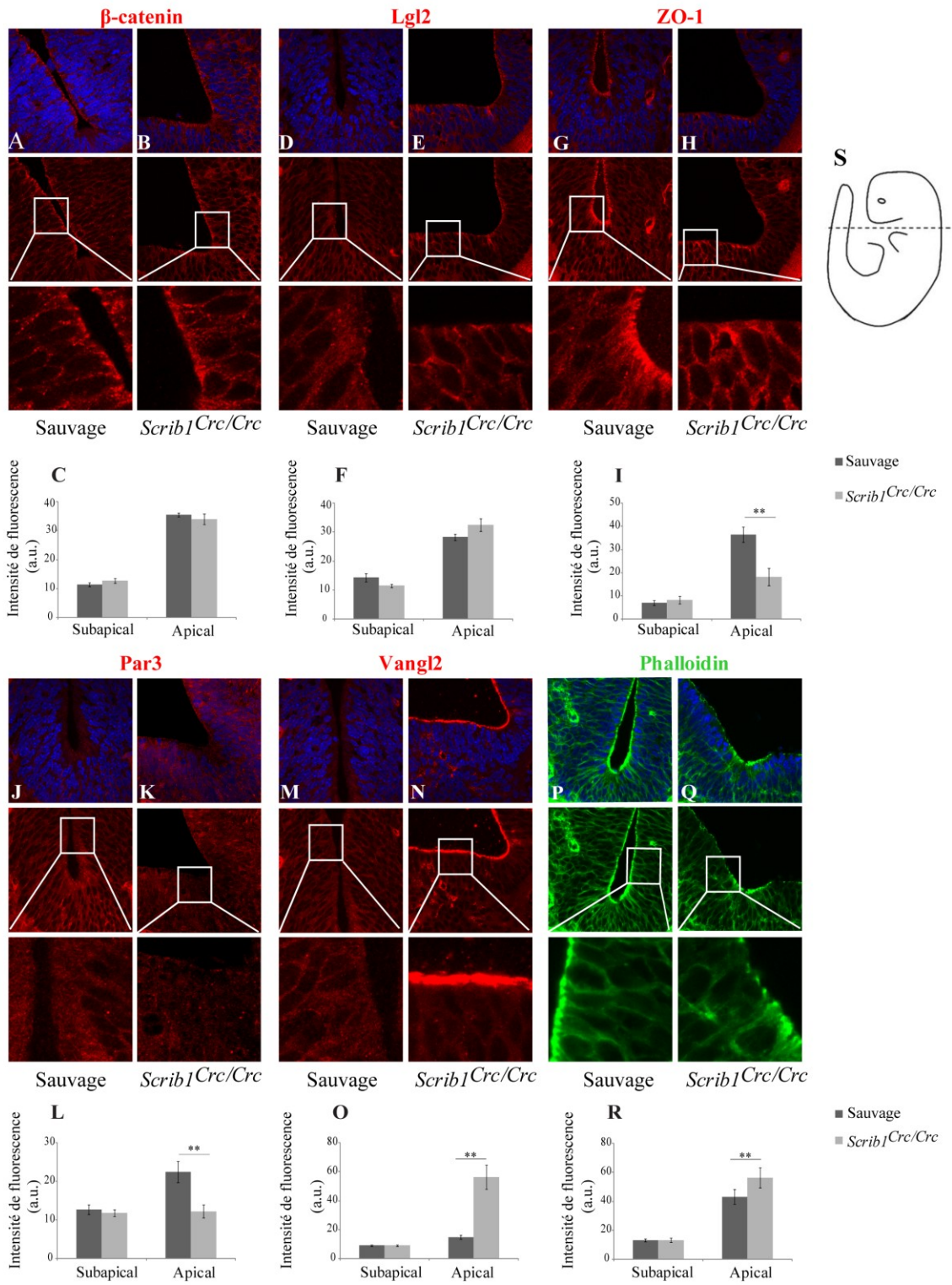
Ensuite, nous avons étudié la localisation de la protéine Vangl2 de la voie PCP au cours du développement du tube neural dans les souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*. On a observé que dans les sections des souris de type sauvages, Vangl2 a été associé à la membrane plasmique avec une coloration ponctuée dans le cytoplasme des cellules neuroépithéliales et était répartie de manière homogène dans les deux parties **apicales** et **sous-apicales** du tube neural (**figure 17M**). Tandis que, dans les tissus des souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*, la localisation cellulaire de Vangl2 n'a pas été affectée ; cependant, il y a eu un changement important dans sa localisation spatiale, démontrée par son enrichissement significatif du côté **apical** ( $P < 0,01$ ) et sa réduction significative dans la partie **sous-apicale** du tube neural ( $P < 0,001$ ) (**Fig.17N, O**).

L'immunohistochimie avec la phalloïdine qui marque le réseau de cytosquelette par sa liaison avec les filaments d'actine pour empêcher leurs dépolymérisations a montré une organisation cytosquelettique normale dans les sections des souris mutantes et sauvages (**figure 17P, R**). Cependant, son localisation du côté **apical** du tube neural a été significativement diminuée dans les sections des souris mutantes ( $P < 0,05$ ) (**figure 17Q, R**).

Le schéma d'expression de tous ces marqueurs  $\beta$ -caténine, Lgl2, ZO-1, Par-3, phalloïdine et Vangl2, a été également étudié à un stade ultérieur du développement du tube neural, avec des embryons de souris à E11.5 après la fermeture de tube neural. Tous les résultats étaient similaires à ceux obtenus précédemment avec des embryons des souris à E9.0-9.5 (**Figure 18**).

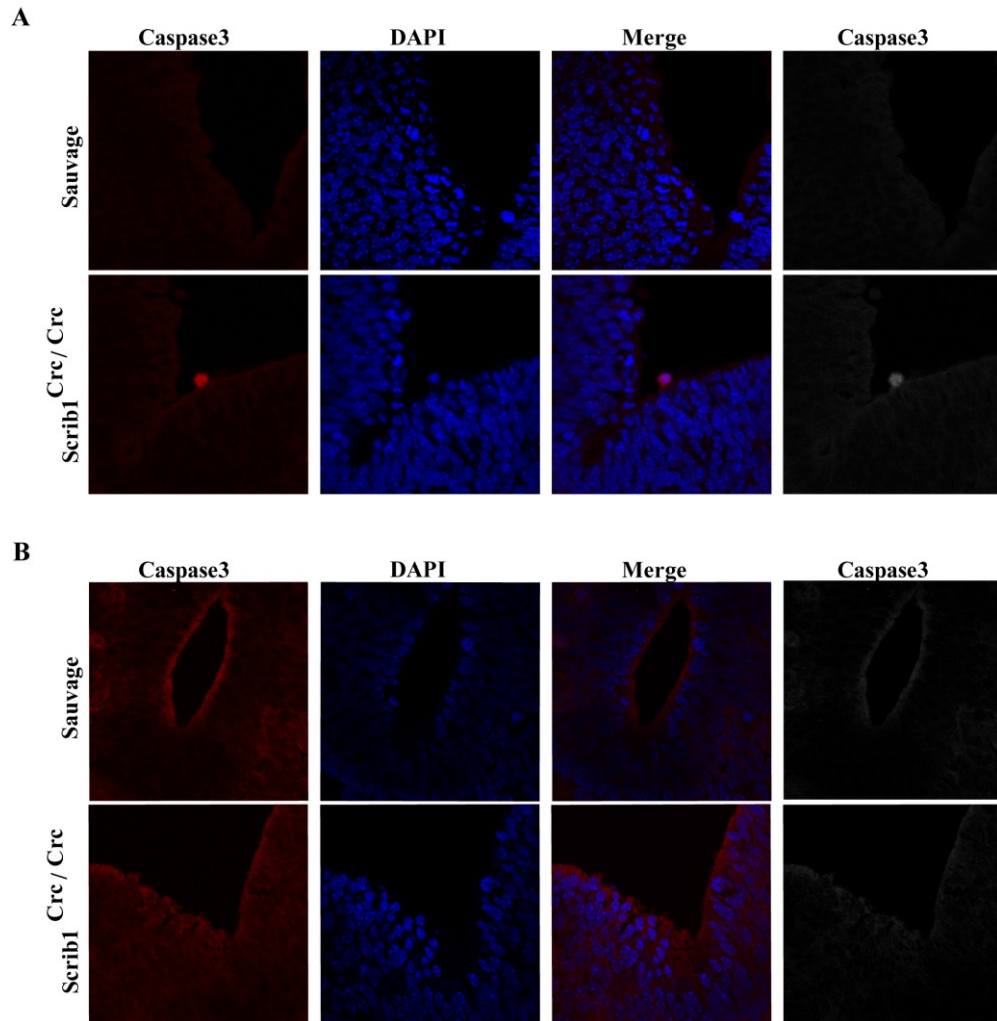


**Figure 17. La polarité apicobasale, la structure cytosquelettique et la distribution de Vangl2 dans le tube neural des souris *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>*.** L'immunohistochimie des cryosections transversales de la partie ventrale du tube neural des embryons E9.0-9.5 révèle une distribution normale de  $\beta$ -caténine (B), Lgl2 (E) et ZO-1 (H) dans les tissus mutants comparativement avec des tissus de type sauvage (A, D, G, respectivement). L'expression de ZO-1 est considérablement réduite dans les tissus mutants dans la région apicale (H, I). La distribution cellulaire de Par-3 dans les tissus mutants est gravement perturbée lorsqu'elle passe d'une localisation membranaire à une localisation cytosolique (J par rapport à K, L). Vangl2 est significativement plus enrichi sur le côté apical dans les tissus des souris mutantes par rapport aux souris de type sauvages (N par rapport à M, O). L'immunofluorescence de la phalloïdine a montré une structure cytosquelette normale dans les tissus des souris mutantes (Q) par rapport aux tissus des souris de type sauvages (P). Par contre, l'expression de la phalloïdine est significativement réduite dans les tissus mutants sur le site apical (Q, R). Les images ont été prises par microscopie confocal avec un grossissement de 63X. Les diagrammes C, F, I, L, O et R montrent la quantification de l'intensité de la fluorescence dans les régions apicales et sous-apicales dans les sections des souris de type sauvages et mutantes. (a.u) unités arbitraires. \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001. Le bleu est DAPI. S, une représentation schématique d'un embryon de souris montrant le niveau des différents sectionnements réalisés pour l'immunohistochimie.



**Figure 18. Études d'expression des marqueurs de la polarité apicobasale, la structure cytosquelettique et la distribution de Vangl2 dans le tube neural des embryons E11.5 *Scrib1*<sup>Cre/Cre</sup>.** La distribution de  $\beta$ -caténine (B), Lgl2 (E) et ZO-1 (H) dans les tissus des mutants est normale par rapport aux tissus des souris de type sauvages (A, D, G respectivement). L'expression de ZO-1 est considérablement réduite dans les tissus mutants sur la région apicale (H, I). La distribution cellulaire de Par-3 dans les tissus mutants est gravement perturbée lorsqu'elle passe d'une localisation membranaire à une localisation cytosolique (J par rapport à K, L). L'expression de Vangl2 est significativement plus enrichie du côté apical dans les tissus mutants par rapport au tissu de type sauvage (N par rapport à M, O). L'immunofluorescence de la phalloïdine a montré une structure cytosquelette normale dans les tissus mutants (Q) par rapport aux tissus de type sauvage (P). Par contre, l'expression de la phalloïdine est significativement réduite dans les tissus mutants sur la région apicale (Q, R). Les images ont été prises par microscopie confocale avec un grossissement de 63 X. Les diagrammes C, F, I, L, O et R montrent la quantification de l'intensité de fluorescence dans les régions apicales et sous-apicales dans les sections de type sauvage et mutant. (a.u) unités arbitraires. \* P <0,05; \*\* P <0,01. Le bleu est DAPI. S, une représentation schématique d'un embryon de souris montrant le niveau des différents sectionnements réalisés pour l'immunohistochimie.

Afin de déterminer si les changements de localisation des différents marqueurs de polarité chez les souris *Scrib1*<sup>Cre/Cre</sup> sont dus à la mort cellulaire, nous avons examiné l'expression du marqueur de l'apoptose caspase 3 dans les tissus mutants. Il s'est avéré que les changements dans la localisation des protéines Par-3 et Vangl2 au niveau des tissus des souris mutantes au cours des deux périodes de développement, E9.0-9.5 et E11.5, ne sont pas dus à une mort cellulaire excessive puisque les tissus nerveux de type sauvage et mutant ont montré des niveaux d'expression similaires de Caspase 3 (**Figure 19**).



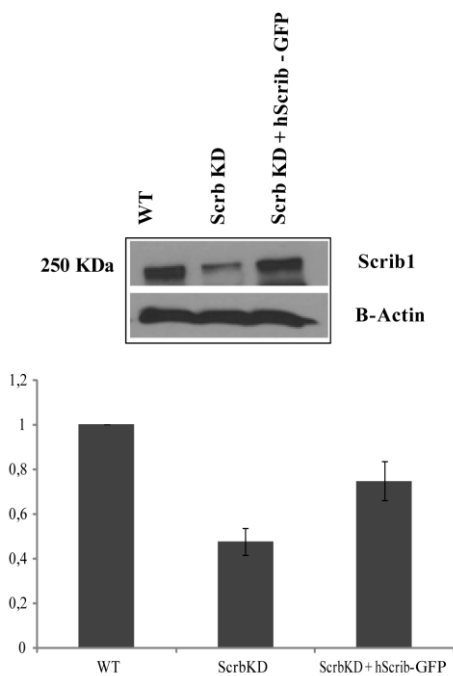
**Figure 19. Mort cellulaire dans les embryons des souris de type sauvage et mutant.**

L'immunofluorescence des cryosections transversales de la partie ventrale du tube neural dans des embryons E9.0-E9.5 (A) et E11.5 (B) présente des niveaux d'expression similaires de Caspase 3 dans les tissus de type sauvage et mutant.

En conclusion de cette première partie de notre étude, le tube neural ouvert des souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>* montre un défaut dans la localisation de Par-3 et de Vangl2 mais pas de défauts évidents dans la polarité apicobasale.

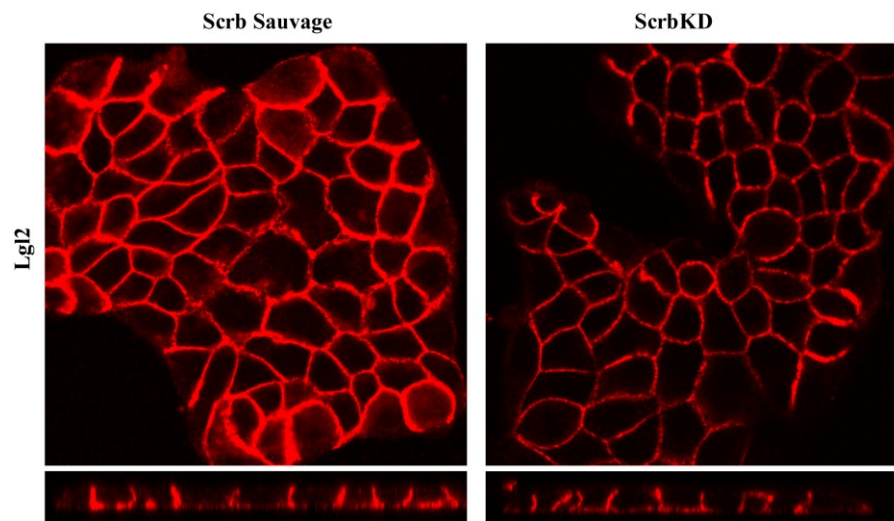
#### 4.1.2 Expression des marqueurs de la polarité apicobasale et de Vangl2 suite à la suppression de *Scrib1* dans les cellules MDCK II

Parallèlement à notre étude d'immunohistochimie dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>, nous avons étudié l'effet de la suppression de *Scrib1* sur la localisation cellulaire des marqueurs de la polarité A-B et de Vangl2 dans les cellules épithéliales du rein canin MDCK II qui sont largement utilisées pour étudier la polarité et l'adhésion cellulaire. Nous avons utilisé un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) appelé ScrbKD qui a été précédemment démontré de supprimer efficacement l'expression de *Scrib1* de ~60% (135). On a réussi à réduire l'expression de Scrib1 de 60% avec ScrbKD comparable à celui indiqué précédemment, par une transfection transitoire dans des cellules MDCK II cultivées à des densités élevées (**Figure 20**). La co-injection de *SCRIB1* humain étiqueté avec une GFP (hScrib-GFP) avec ScrbKD a partiellement restauré l'expression de Scrib1 (**Figure 20**).



**Figure 20. Expression de Scrib1 lors de sa suppression avec ScrbKD.** Les cellules MDCK II ont été transfectées avec ScrbKD seul ou avec hScrib-GFP et une analyse de Western Blot ont été effectuées contre le Scrib1 endogène. ScrbKD réduit le niveau d'expression de Scrib1 de ~ 60% qui peut être partiellement restauré par co-transfection de hScrib-GFP.

L'immunocytochimie avec la phalloïdine, le ZO-1 et la  $\beta$ -caténine respectivement (données non présentées), révèle que la suppression de *Scrib1* n'a eu aucun effet évident sur l'organisation du cytosquelette et la formation des jonctions serrées et adhérentes. La suppression de *Scrib1* n'a pas eu d'effet sur l'expression du marqueur basolateral Lgl2 (**Figure 21**). En revanche, La suppression de *Scrib1* a eu des effets dramatiques sur les modèles d'expression de Par-3 et Vangl1 (**Figure 22**).

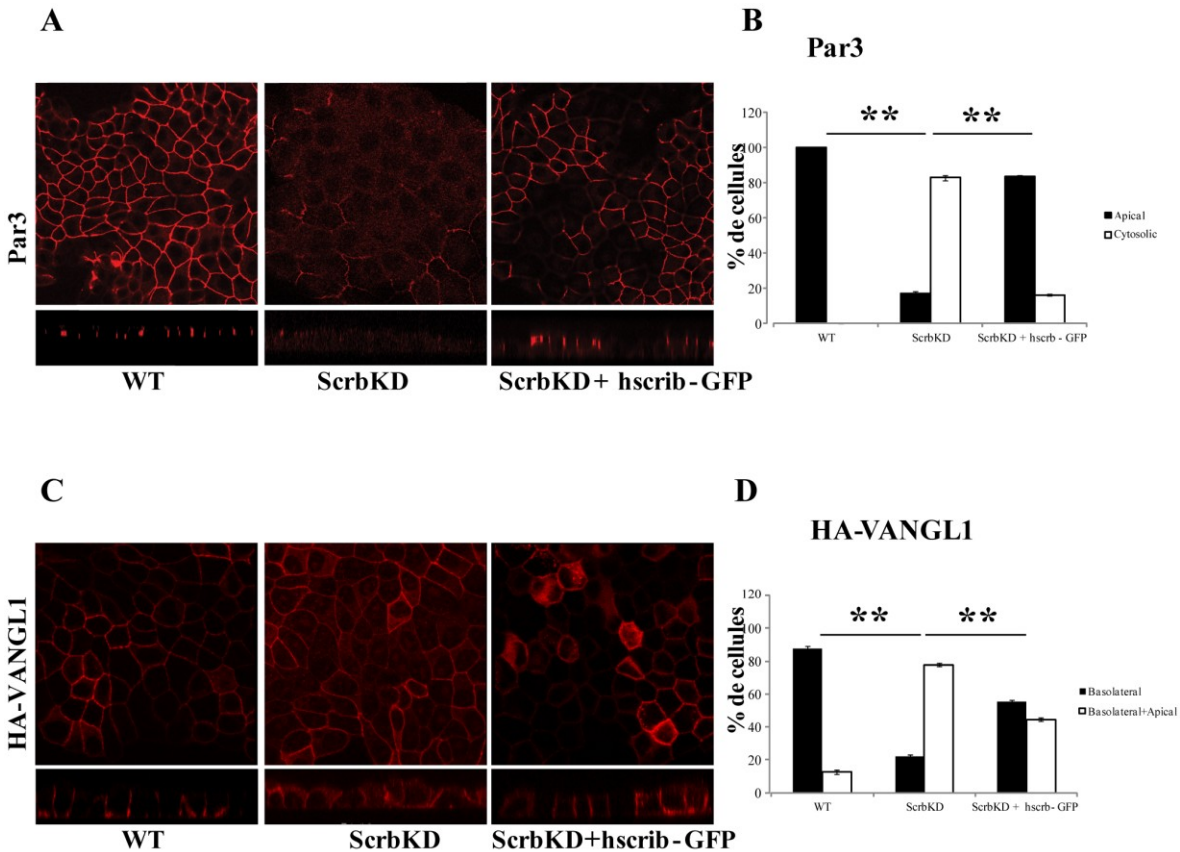


**Figure 21. La suppression de *Scrib1* n'affecte pas la localisation de Lgl2.** Les cellules MDCK II transfectées d'une façon transitoire avec *ScribKD* ne montrent pas une perturbation dans la localisation du marqueur de la polarité A-B Lgl2 comparativement aux cellules non transfectées.



Dans les cellules polarisées MDCK II, Par-3 a été exprimé exclusivement sur la surface apicale (**Figure 22A, B**). La suppression de *Scrib1* a provoqué une altération dramatique de ce profil d'expression où Par-3 est devenu cytosolique dans ~ 80% des cellules (**Figure 22A, B**). La co-injection de *SCRIB1* humain étiqueté avec une GFP (hScrib-GFP) avec ScrbKD a restauré la répartition apicale de Par-3 (~ 80%) démontrant que le phénotype observé est spécifique à la suppression de *Scrib1* (**Figure 22A, B**).

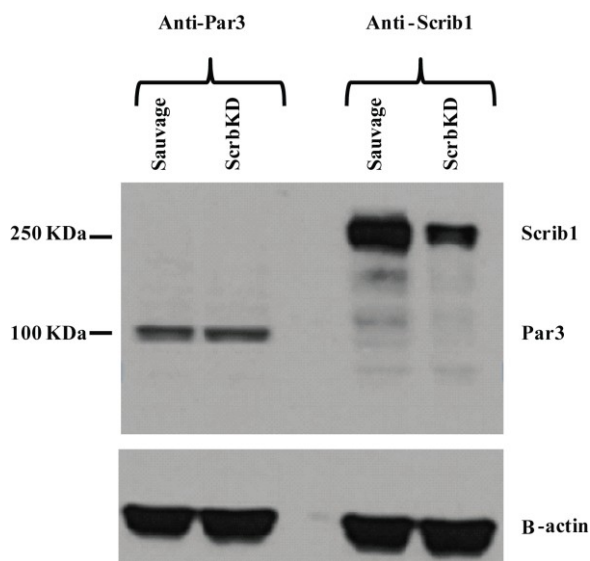
Ensuite, l'effet de la suppression de *Scrib1* sur la localisation de Vangl1 a été évalué dans des cellules MDCK II transfectées de manière stable avec Vangl1 marqué par HA (HA-Vangl1). Ces lignées cellulaires ont été déjà utilisées pour étudier l'effet des mutations chez Vangl1 et Vangl2 sur la localisation et la stabilité de la protéine. L'immunocytochimie de ces lignées cellulaires a montré une expression prédominante de la protéine Vangl1 dans la membrane basolatérale (~ 90%) et d'une façon moins forte sur les deux côtés basolatéral et apical en même temps (~ 10%). La suppression de *Scrib1* a provoqué un renversement dramatique de cette distribution où la protéine Vangl1 devient considérablement enrichie sur les côtés apicaux des cellules (~ 80%). La co-injection de *SCRIB1* humain (hScrib-GFP) avec ScrbKD a partiellement restauré la distribution de Vangl1 sur le pôle basolatéral des cellules MDCK II, démontrant la spécificité du phénotype observé (**Figure 22C, D**).



**Figure 22. Effet de la suppression du *Scrib1* sur la localisation Par-3 et Vangl1.**

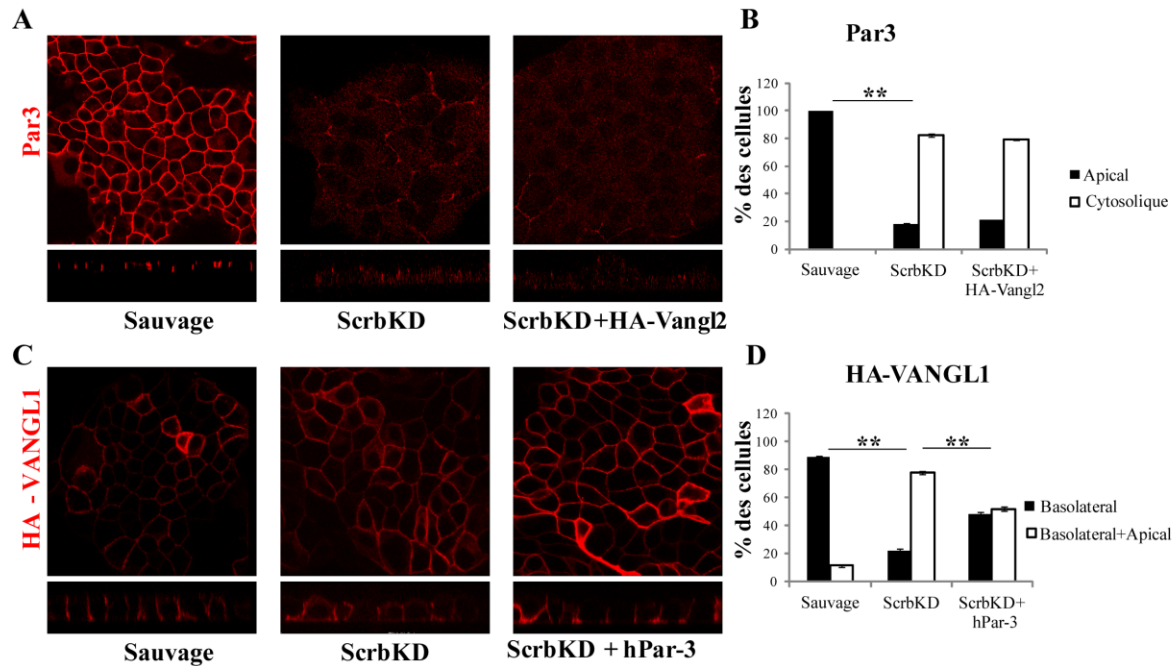
(A) La suppression de *Scrib1* transfère la localisation cellulaire de Par-3 d'une localisation membranaire à une localisation cytosolique à travers les cellules. Les cellules MDCK II ont été transfectées avec ScrKD seul ou avec hScrib-GFP. L'immunocytochimie a été réalisée contre la protéine Par-3 endogène. (B) Quantification des cellules avec une localisation de Par-3 apical ou cytosolique lors de la suppression de *Scrib1* et suite à son sauvetage avec hScrib-GFP. (C) La suppression de *Scrib1* provoque un enrichissement apical de Vangl1 qui a été sauvé par la cotransfection avec hScrib-GFP. Les cellules MDCK II transfectées de manière stable avec HA-VANGL1 ont été transfectées avec ScrKD seul ou avec hScrib-GFP. L'immunocytochimie est réalisée contre l'étiquette HA de VANGL1. (D) Quantification de la localisation basolatérale seulement de HA-VANGL1 par rapport à ça localisation basolatérale et apicale lors de la suppression de *Scrib1* et suite à son sauvetage. Les images et les piles Z montrées dans cette figure ont été prises par microscopie confocale avec un grossissement de 63 X. Au total, 45 cellules ont été examinées par catégorie. \*\* P < 0,01.

L'analyse par Western Blot a démontré des niveaux semblables de Par-3 dans les cellules où on fait une suppression de *Scrib1* avec ScrbKD, par rapport aux cellules non transfectées avec ScrbKD, suggérant plutôt un effet sur la localisation que sur la stabilité de la protéine Par-3 (**Figure 23**).



**Figure 23. Expression des protéines Scrib1 et Par-3 lors de la suppression de *Scrib1* avec ScrbKD.** Les cellules MDCK II ont été transfectées soit avec ScrbKD ou laissées sans transfection (Sauvage) et une analyse de Western Blot a été effectuée contre le Scrib1 endogène, qui montre une réduction dans le niveau d'expression de Scrib1 de ~ 60%. Un western Blot contre le Par-3 endogène révèle des niveaux égaux de la protéine Par3 entre les deux lignes cellulaires (transfectées avec ScrbKD ou non transfectées).

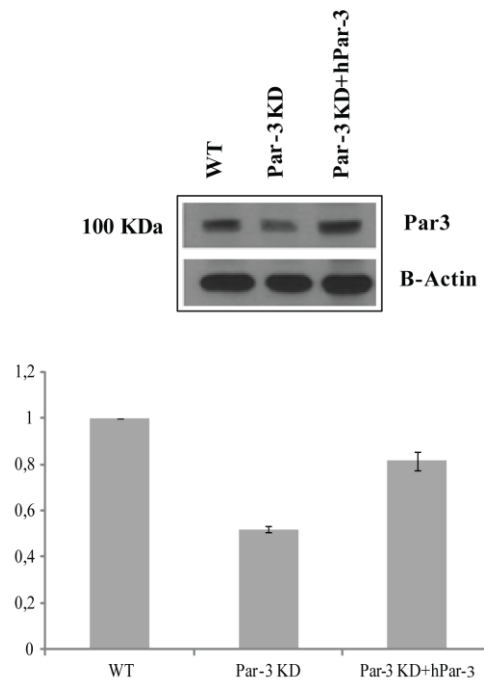
Pour déterminer si les perturbations dans l'expression des protéines Par-3 et Vangl2 causés par la suppression de *Scrib1* sont interconnectées ou pas, nous avons mené des expériences de sauvetage avec *Vangl2* ou *Par-3* dans des cellules qui expriment des niveaux réduits de *Scrib1*. La surexpression de *Vangl2* n'a pas permis de sauver le défaut de localisation de la protéine Par-3 causé par la suppression de *Scrib1* (**figure 24 A, B**). Remarquablement, même avec de très faibles quantités de *Scrib1*, la surexpression de *Par-3* sauve partiellement la localisation anormale de Vangl1 du côté basolatéral et apical vers une localisation basolatérale dans les cellules MDCK II (**Figure 24 C, D**).



**Figure 24. La capacité de *Vangl2* et *Par3* de sauver les phénotypes perturbés de *Par3* et *Vangl2* respectivement suite à la suppression de *SCRIB1*.** (A) Les cellules MDCK II ont été transfectées avec ScrubKD seul ou avec VANGL2 humaine pour l'expérience de sauvetage. L'immunocytochimie a été réalisée contre la protéine Par-3 endogène. VANGL2 ne parvient pas à sauver la localisation anormale de Par-3 causée par la suppression de *Scrib1*. (B) Quantification de la localisation apicale ou cytosolique de Par-3 lors de la suppression de *Scrib1* et suite à l'expérience de sauvetage par VANGL2 humaine. (C) Les cellules MDCK II ont été transfectées avec ScrubKD soit seul, soit avec une construction qui code pour Par-3 humain pour les expériences de sauvetage. L'immunocytochimie a été réalisée contre l'étiquette HA qui marque la protéine VANGL1. *hPar-3* peut sauver partiellement l'enrichissement apical de VANGL1 causé par la suppression de *Scrib1*. (D) Quantification de la localisation basolatérale seulement de HA-VANGL1 par rapport à ça localisation basolatérale et apicale lors de la suppression de *Scrib1* et suite à son sauvetage avec hPar-3. Les images et les piles Z montrées dans cette figure ont été prises par microscopie confocal avec un grossissement de 63 X. Au total, 135 cellules ont été examinées par catégorie. \*\* P <0,01.

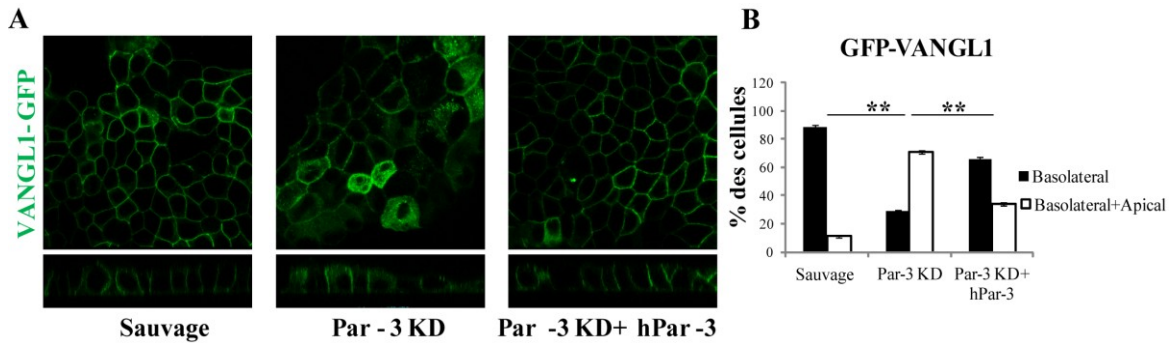
## 4.2. Effet de la suppression de Par-3 sur la localisation de Vangl1

Pour étudier davantage le rôle de la protéine Par-3 dans la localisation de Vangl1, nous avons utilisé un shRNA Par-3-KD pour éliminer l'expression de *Par-3* dans les cellules MDCK II. Ces derniers étaient cultivés à des densités élevées et transfectés d'une façon transitoire par Par-3-KD. Tel que montré précédemment, Par-3-KD peut réduire le niveau d'expression de Par-3 de ~ 60% (**Figure 25**).



**Figure 25. Expression de Par3 lors de sa suppression avec Par-3KD.** Les cellules MDCK II ont été transfectées avec Par-3KD seul ou avec hPar-3 et une analyse de Western Blot a été effectuée contre le Par3 endogène

La suppression de *Par-3* a entraîné une perturbation significative dans le profil de localisation de Vangl1, qui est similaire à l'effet observé lors de la suppression de *Scrib1*, où Vangl1 s'est enrichi dans les côtés apicaux des cellules MDCK II (~ 75%) (**Fig.26 B, C**). La co-injection de *Par-3* avec Par3-KD a permis de sauver partiellement cet effet, ce qui démontre la spécificité du phénotype observé (**Fig.26 B, C**).



**Figure 26. Effet de Par-3 sur la localisation cellulaire de VANGL1.** (A) Les cellules MDCK II transfectées de manière stable avec VANGL1 c-Myc / HA ont été transfectées avec Par-3 KD soit seul soit avec hPar-3 pour les expériences de sauvetage. Les cellules ont été fixées et examinées pour VANGL1-GFP. La suppression de *Par-3* provoque un enrichissement apical de Vangl1 qui a été sauvé par une co-transfection avec hPar-3. (B) Quantification de la localisation basolatérale de VANGL1-GFP par rapport à sa localisation basolatérale et apicale lors de la suppression de *Par-3* et suite à son sauvetage par hPar-3. Les images et les piles Z montrées dans cette figure ont été prises par microscopie confocale avec un grossissement de 63 X. Au total, 135 cellules ont été examinées par catégorie. \*\* P <0,01.

Ces données suggèrent que Scrib1 joue un rôle d'intermédiaire dans la localisation basolatérale de Vangl1 par l'effet répressif qu'il exerce sur la localisation de la protéine Par-3 dans le pôle apical. Après la suppression de *Scrib1*, la protéine Par-3 perd sa localisation apicale et devienne cytosolique, qui à son tour et à travers des mécanismes inconnus entraîne l'enrichissement de la protéine Vangl1 dans le pôle apical des cellules. Cet effet semble être indépendant de l'effet bien caractérisé de Scrib1 sur la localisation apicale de Par-3 dans le processus d'établissement de la polarité A-B des cellules épithéliales, puisque la morphologie générale, l'organisation cytosquelettique, la structure des jonctions serrées et des jonctions adhérentes ainsi que la distribution du marqueur basolatérale Lgl2 semblent ne pas être affectées par la suppression de *Scrib1*.

### 4.3. La validation fonctionnelle des mutations du gène *Scrib1* humain et souris

Durant ma maîtrise, j'ai ré-séquencé le cadre de lecture et les jonctions exon-intron de *SCRIB1* d'une cohorte de 473 patients atteints de plusieurs formes d'ATN. J'ai réussi à détecter neuf mutations faux sens et rares (fréquence allélique mineure ou MAF <1%) dans le gène *SCRIB1* dans 9 patients atteints des ATN (**Tableau 2**). Les mutations sont: p.Asp93Ala (c. 278A>C), p.Gly145Arg (c. 435G>A), p.Gly263Ser (c. 786C>A), p.Gly469Ser (c. 1405G>A), p.Pro649His (c. 1946C>A), p.Gln808His (c. 2424G>T), p.Val1066Met (c. 3196G>A), p.Arg1150Gln (c. 3480G>A) et p.Thr1422Met (c. 4266C>T). Sur ces 9 mutations, deux variantes rares, p.Asp93Ala (**rs142052465**) et p.Gly145Arg (**rs148571165**) étaient présentes chacune dans un contrôle et aussi déjà répertoriées dans dbSNP avec une fréquence de 0.0002 et 0.0004 respectivement.

Toutes les 5 mutations (p.Gly263Ser, p.Pro649His, p.Gln808His, p.Arg1150Gln et p.Thr1422Met) associées aux ATN qui étaient absentes dans les contrôles (467 contrôles) et été prédites d'être pathogéniques (**Tableau 2**) ont été priorisées pour des études fonctionnelles. Nous avons également inclus dans nos tests de validation fonctionnelle, deux mutations induites par l'ENU chez la souris. Ces deux mutations (p. Ile285Lys et p. Glu814Gly) provoquent une craniorachischisis et une queue pliée dans les souris ligne 90 (226) et Crn2 (227) respectivement.

Deux de ces mutations (p.Gly263Ser et p. Ile285Lys) sont localisées sur la partie LRR de la protéine Scrib1, une mutation (p.Pro649His) est localisée sur la partie LAPsd et trois autres mutations (p.Gln808His, p. Glu814Gly et p.Arg1150Gln) sont localisées sur les domaines PDZ 1 et 4 et une dernière mutation (p.Thr1422Met) se situe sur la partie C-terminale de Scrib1 (**Figure 27A**).

**Tableau 2.** Mutations rares (<1%) identifiées dans *SCRIB1* chez les patients atteints des ATN

Mutation <sup>a</sup>	Changement d'acide aminé <sup>a</sup>	Fréq. dans les patients (n=473)	Fréq. dans les contrôles (n=467)	Fréq. dans dbSNP	Fréq. dans ExAC	Polyphen <sup>b</sup>	SIFT <sup>b</sup>
c.279A>C	p.Asp93Ala	1 MMC	1	0.0002	1.3x10 <sup>-3</sup>	+	+
c.435G>A	p.Gly145Arg	1 MMC	1	0.0004	1.3x10 <sup>-3</sup>	-	+
<b>c.787G&gt;A</b>	<b>p.Gly263Ser</b>	<b>1 MMC</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	+	-
c.1407G>A	p. Gly469Ser	1 MMC	2	0	9x10 <sup>-5</sup>	+	-
<b>c.1945C&gt;A</b>	<b>p.Pro649His</b>	<b>1 CA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4x10<sup>-4</sup></b>	+	+
<b>c.2423G&gt;T</b>	<b>p.Gln808His</b>	<b>1 MMC</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3x10<sup>-4</sup></b>	+	+
c.3198G>A	p.Val1066Met	1 MMC	2	0	2x10 <sup>-5</sup>	+	+
<b>c.3450G&gt;A</b>	<b>p.Arg1150Gln</b>	<b>1 VS</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2x10<sup>-4</sup></b>	-	+
<b>c.4267C&gt;T</b>	<b>p.Thr1422Met</b>	<b>1 MMC</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7x10<sup>-5</sup></b>	-	+

<sup>a</sup> Le système de numérotation des mutations au niveau des nucléotides, ainsi que les changements d'acides aminés, sont basés sur l'ADNc de *SCRIB1* et la séquence protéique avec les numéros d'accès NM\_015356.4 et AAH44627.1 respectivement.

Les cinq mutations faux sens de *SCRIB1* détectées chez des patients atteints d'ATN et absentes dans les contrôles priorisées pour la validation fonctionnelle sont indiquées en gras.

<sup>b</sup> Polyphen: +, probablement ou peut-être dommageable; - bénigne; SIFT: +, non toléré; -, toléré.

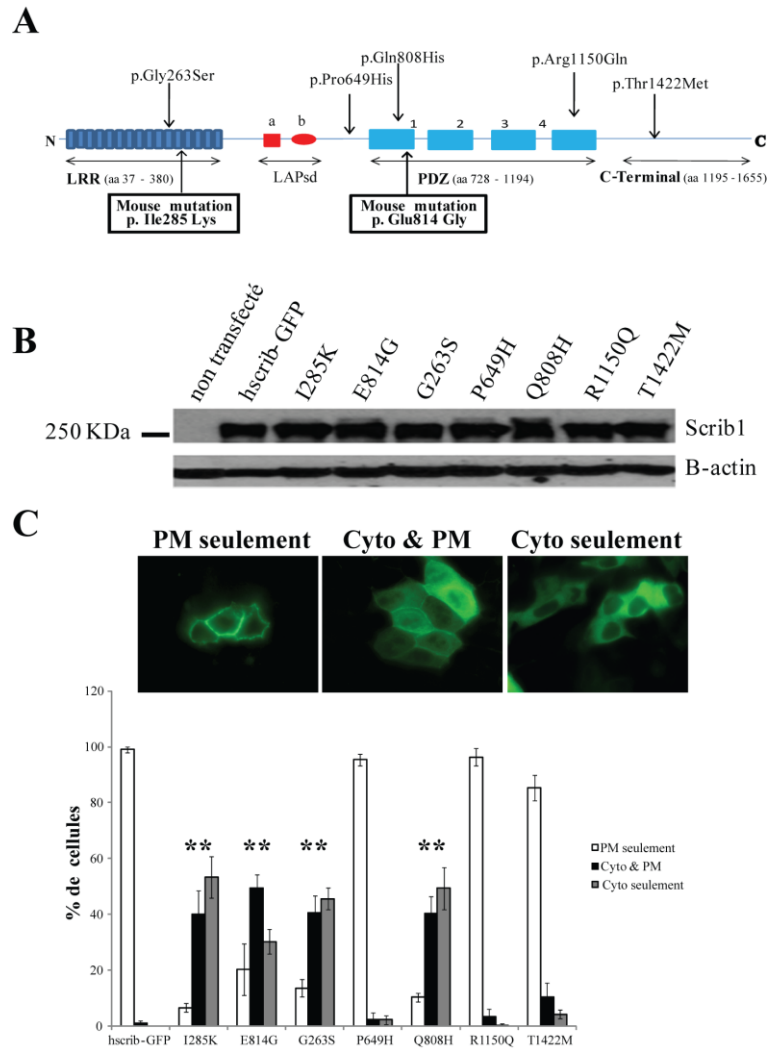
*Abréviations* : CA, agénésie caudale; Fréq., Fréquence; MMC, myéломéningocèle; VS, scission vertébrale.



### 4.3.1 Des mutations rares dans *SCRIB1* associées à des ATN affectent sa localisation membranaire

Des études antérieures ont montré que Scrib1 doit se localiser sur la membrane cellulaire pour assurer une fonction normale. Cette liaison est assurée grâce à plusieurs protéines membranaires incluant la protéine de la voie PCP Vangl2 (158, 230). Nous avons validé l'effet de toutes les 5 mutations détectées dans *SCRIB1* chez les patients atteints des ATN sur sa localisation membranaire. Pour une analyse plus complète de la fonction de Scrib1 dans le développement des ATN, nous avons également inclus dans nos tests de localisation membranaire, les deux mutations de souris, p.Glu814Gly qui se situe dans le premier domaine PDZ (227) et p.Ile285Lys qui se situe dans la région LRR (226) (**Figure 27A**) impliquée dans le ciblage membranaire de Scrib1. Cette dernière a été précédemment démontrée pour perturber sa localisation dans la membrane des cellules MDCK (231).

Avec une analyse de western Blot, nous avons démontré que les 5 mutations humaines et les deux mutations de souris n'affectent pas les niveaux d'expression de la protéine Scrib1 dans les cellules MDCK II transfectées (**Figure 27B**). Le hScrib-GFP de type sauvage présentait une forte localisation membranaire et tel que déjà décrit précédemment, la mutation de la souris ligne 90 p.Ile285Lys a perturbé la localisation membranaire de la protéine Scrib1, et l'a délocalisée vers le cytoplasme. Cette mutation a entraîné une augmentation significative du nombre de cellules exprimant hScrib-GFP dans le cytoplasme ( $P < 0,01$ ) (**Figure 27C**). L'autre mutation de souris Crn2 p.Glu814Gly et deux de nos mutations humaines, p.Gly263Ser et p.Gln808His, se sont comportées comme la mutation p.Ile285Lys et ont affecté de manière significative la localisation cellulaire de Scrib1 ( $P < 0,01$ ) (**Figure 27C**). Les trois autres mutations humaines testées, p.Pro649His, p.Thr1422Met et p.Arg1150Gln, présentaient le même profil de localisation que le type sauvage (**Figure 27C**) indiquant que ces trois mutations n'affectaient pas la localisation de la protéine Scrib1.



**Figure 27. Des mutations rares dans *SCRIB1* associées aux ATN et leur effet sur la localisation membranaire de Scrib1.** (A) Diagramme schématique de la protéine Scrib1 montrant la localisation approximative des 5 mutations faux sens et les deux mutations de souris. (B) Le western Blot montre des niveaux d'expression égaux des différentes mutations en comparaison avec la protéine de type sauvage dans des cellules MDCK transfectées. (C) En haut, des cellules MDCK II transfectées avec hScrib-GFP représentent ses différentes localisations (PM) uniquement à la membrane, PM et cytoplasmique et enfin (Cyt) cytoplasmique seulement. En bas, la quantification des 3 types de localisation de hScrib-GFP sauvage ou mutante dans les cellules MDCK II. Deux mutations de souris, p.Ile285Lys et p.Glu814Gly, et deux mutations humaines, p.Gly263Ser et p.Gln808His, ont affecté de manière significative la localisation sous-cellulaire de Scrib1. Au total, 300 cellules ont été

examinées par construction. \*\* P <0,01 par rapport à la localisation de hScrib-GFP de type sauvage.

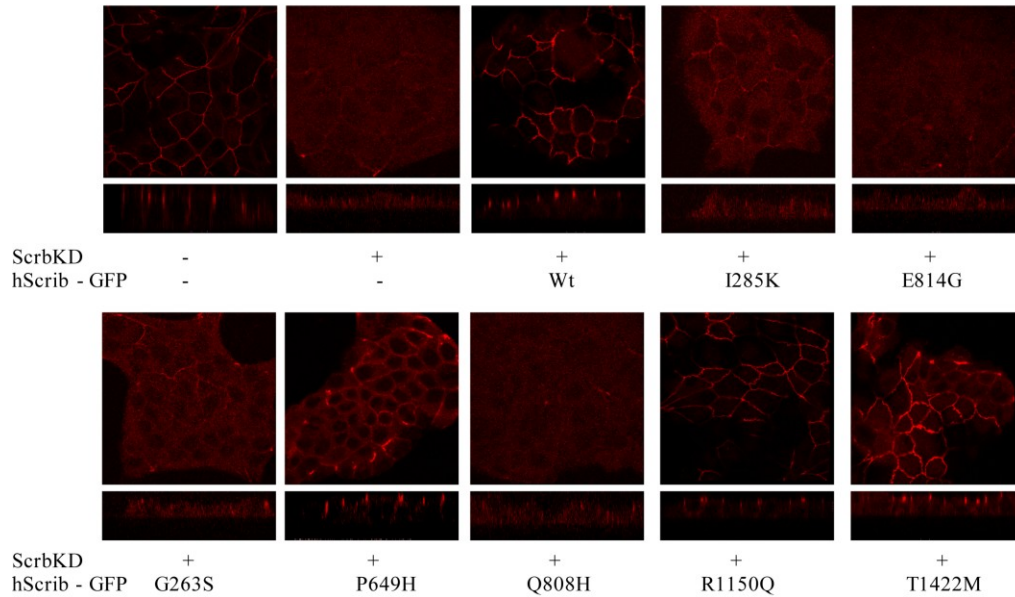
### **4.3.2 Des mutations dans *SCRIB1* associées aux ATN ne sauvent pas l'effet de la suppression de *SCRIB1* sur la localisation de Par-3**

Précédemment, dans la partie où on a étudié l'expression des marqueurs de la polarité apicobasale et de la voie PCP (section 4.1.1), on a réussi à démontrer un profil anormal de localisation cellulaire de Par-3 dans des sections de tube neural des souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>, ainsi que lors de la suppression de *Scrib1* dans les lignes cellulaires MDCK II (section 4.1.2). Pour déterminer si les mutations dans *SCRIB1* associées à des ATN humaines ou de souris pourraient affecter cet effet de localisation, nous avons effectué un test de validation de suppression suivi par un sauvetage dans les cellules MDCK II.

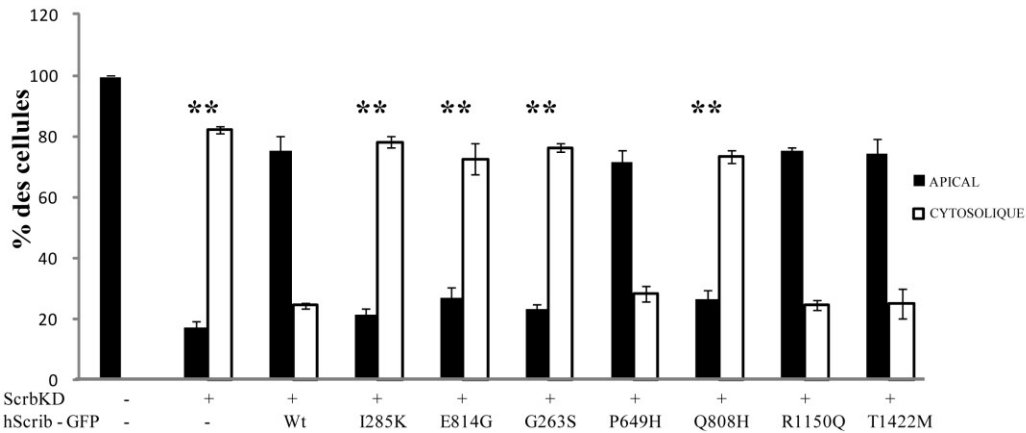
La co-transfection de chacune des deux mutations souris, p.Ile285Lys et p.Glu814Gly et des deux mutations humaines, p.Gly263Ser et p.Gln808His, avec *ScrbKD* n'a pas réussi à sauver le défaut de localisation de Par-3 causé par la suppression de *Scrib1* (P <0,01) (**Figure 28**) démontrant que ces quatre mutations affectent la localisation de Par-3. Par contre, la co-transfection des 3 autres mutations associées aux ATN humaines, p.Pro649His, p.Thr1422Met et p.Arg1150Gln, avec *ScrbKD* a pu sauver le défaut de localisation de Par-3 d'une façon similaire que celle obtenue avec le hScrib-GFP de type sauvage (**Figure 28**) indiquant que ces mutations ont le même effet que le type sauvage.

A

Par3



B



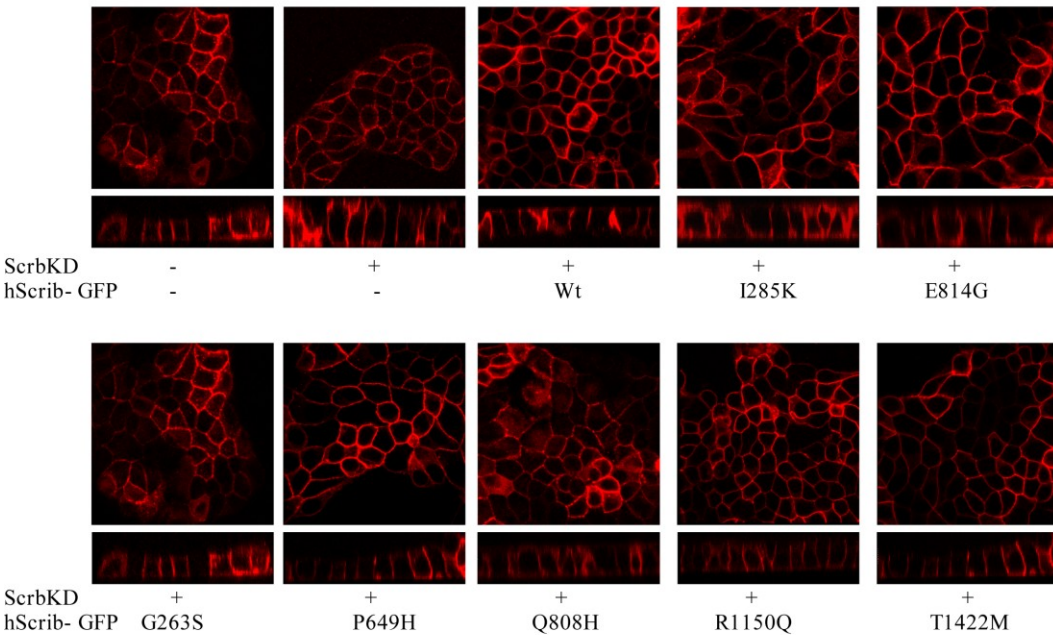
**Figure 28. Effet des mutations rares de *SCRIB1* associées aux ATN sur sa capacité de moduler la localisation de Par-3** (A) Localisation de la protéine Par-3 dans les cellules MDCK II lors de la suppression de *Scrib1* et son sauvetage avec hScrib-GFP de type sauvage ou mutant. (B) Quantification de la localisation apicale ou cytosolique de Par-3 suite à la suppression de *Scrib1* suivi d'une co-transfection avec le hScrib-GFP sauvage ou mutant. Au total, 135 cellules ont été examinées par construction. Les cellules co-transfectées avec ScrKD et le hScrib-GFP de type sauvage ont été comparées aux cellules non transfectées. \*\* P < 0,01.

### 4.3.3 Des mutations dans *SCRIB1* associées aux ATN ne sauvent pas l'effet de la suppression *SCRIB1* sur la localisation de Vangl1

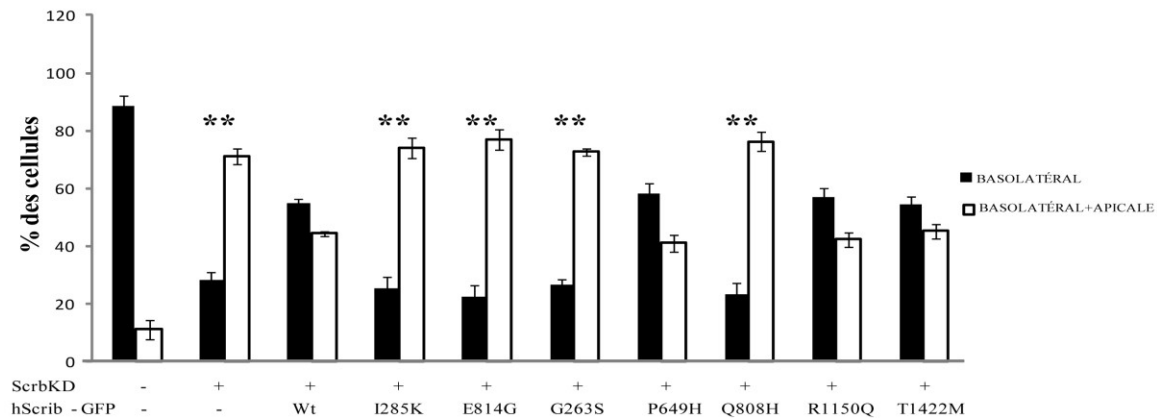
Nous avons testé si les mutations dans *SCRIB1* associées à des ATN humaines ou de souris pourraient affecter l'effet d'enrichissement de Vangl1/2 dans la partie apicale suite à la suppression de *Scrib1*. Lors de la co-transfection de chacune des deux mutations souris, p.Ile285Lys et p.Glu814Gly et des deux mutations humaines, p.Gly263Ser et p.Gln808His, avec ScrbKD, le phénotype d'enrichissement de la protéine Vangl1/2 dans la partie apicale des cellules MDCK II causée par la suppression de *Scrib1* n'a pas été sauvé ( $P < 0,01$ ) (**Figure 29**) démontrant que ces quatre mutations affectent la localisation de Vangl1/2 et orientent sa localisation vers un enrichissement du côté apical. Par contre, la co-transfection des 3 autres mutations associées aux ATN humaines, p.Pro649His, p.Thr1422Met et p.Arg1150Gln, avec ScrbKD, a sauvé le phénotype d'enrichissement de Vangl1/2 de la partie apicale des cellules MDCK II comme le hScrib-GFP de type sauvage (**Figure 29**).

**A**

HA-Vangl1



**B**

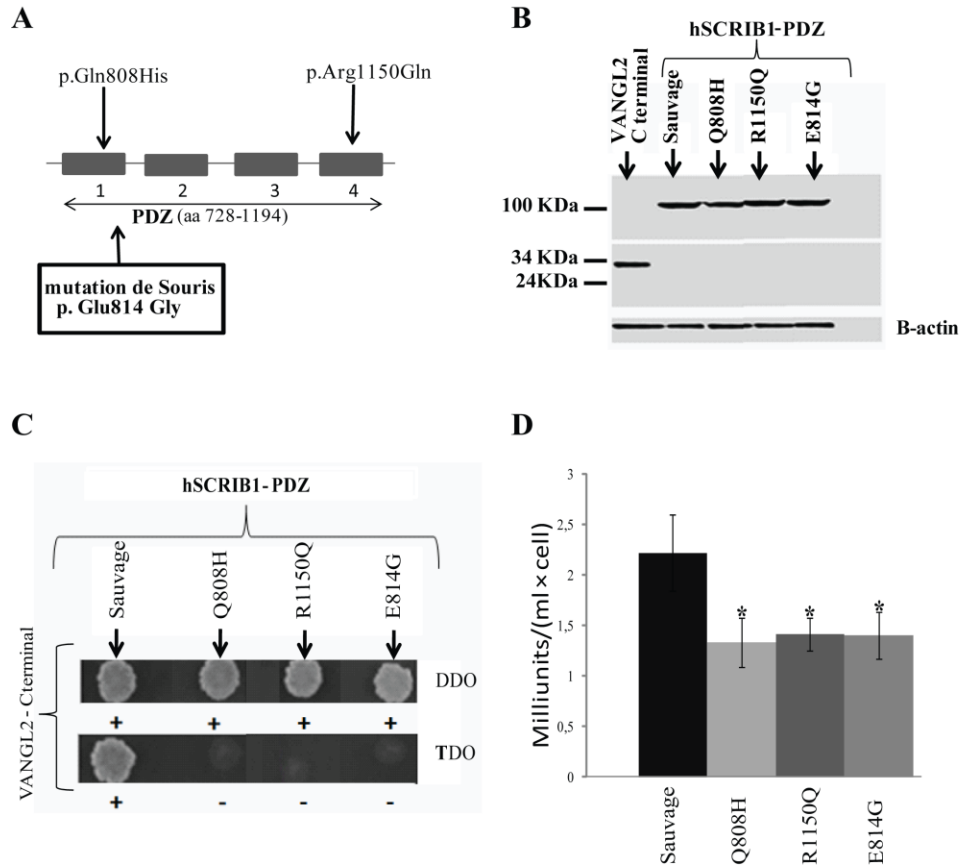


**Figure 29. Effet des mutations rares de *SCRIB1* associées aux ATN sur sa capacité de moduler la localisation de Vangl1/2** (A) Localisation de la protéine HA-Vangl1 dans les cellules MDCK II lors de la suppression de *Scrib1* et son sauvetage avec hScrib-GFP de type sauvage ou mutant. (B) Quantification de la localisation basolatérale par rapport à la localisation basolatérale et apicale de HA-VANGL1 lors de la suppression de *Scrib1* suivi d'une co-transfection avec hScrib-GFP sauvage ou mutant. Au total, 135 cellules ont été examinées par construction. Les cellules co-transfectées avec ScrbdKD et les hScrib-GFP de type sauvage ont été comparées aux cellules non transfectées. \*\* P < 0,01.

#### 4.3.4 Des mutations dans *SCRIB1* associées aux ATN interrompent son interaction avec VANGL2

Scrib1 interagit génétiquement et physiquement avec Vangl2 et joue un rôle direct dans son ciblage asymétrique lors de la signalisation PCP dans la cochlée. Cette interaction implique les domaines PDZ de Scrib1 et les domaines de liaison PDZ de la partie C-terminal de Vangl2 (pour plus de détails, regarder la section 1.9.6.2.3). Deux des mutations associées aux ATN humaines identifiées dans cette étude, p.Gln808His et p.Arg1150Gln, se localisent respectivement dans le premier et le quatrième domaine PDZ de la protéine Scrib1 (**Figure 30A**). Une mutation de souris, p.Glu814Gly, se localise dans le premier domaine PDZ de cette protéine. Par conséquent, nous avons testé la capacité de ces trois mutations à affecter l'interaction de Scrib1 avec Vangl2 en utilisant le système double hybride chez la levure. L'analyse par western Blot a montré que les mutants de *SCRIB1* utilisés pendant cette expérience ont été exprimés dans des cellules de levure à des niveaux comparables à ceux observés pour la protéine de type sauvage, ce qui suggère que ces mutations n'affectent pas la stabilité de la protéine Scrib1 dans les cellules de levure (**Figure 30B**).

Dans le milieu de culture TDO qui manque les trois acides aminés His, Trp et Leu, on remarque une absence de colonies de croissance de levure qui contiennent le gène *SCRIB1* avec chacune des trois mutations, contrairement aux levures qui contiennent le gène *SCRIB1* de type sauvage où on observe une des colonies de croissance de levure dans ce milieu de culture (**Figure 30C**). Ces résultats suggèrent que les trois mutations ont aboli l'interaction de Scrib1 avec Vangl2 contrairement au type sauvage où une interaction entre les protéines Scrib1 et Vangl2 active le gène rapporteur et la production des trois acides aminés dans le milieu TDO. Ces résultats ont été confirmés par une expérience qui mesure l'activité de l' $\alpha$ -galactosidase (**Figure 30D**). Ces résultats ont fourni des preuves supplémentaires de l'effet pathogénique de ces trois mutations p.Gln808His et p.Arg1150Gln et p.Glu814Gly sur la fonction de la protéine Scrib1.



**Figure 30. Effet des mutations rares du gène *SCRIB1* associées aux ATN sur son interaction avec VANGL2 à l'aide d'un Système double hybride chez la levure (Yeast two hybrid, Y2H).** (A) Diagramme schématique des domaines PDZ de la protéine SCRIB1 montrant l'emplacement des mutations faux sens humaines et de souris testées dans le Y2H. (B) L'analyse par Western Blot de SCRIB1-PDZ de type sauvage et mutant (aa 728-1194) avec anti-HA montre des niveaux d'expression comparables dans les cellules de levure. (C) Les cellules diploïdes produites par l'accouplement hSCRIB1-PDZ-pGADT7 et hVANGL2-Cterm-pGBKT7 exprimant les cellules de levure. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture de sélection pour détecter l'interaction (croissance). Le milieu étiqueté DDO (double drop out) manque de leucine et de tryptophane et soutient la croissance de cellules diploïdes sans nécessité d'interaction protéique. Le milieu marqué par TDO (triple drop out) manque d'histidine, de leucine et de tryptophane et ne supporte la croissance des cellules diploïdes que si les protéines interagissent. Les 2 mutations humaines p.Gln808His et p.Arg1150Gln et la mutation de la souris p.Glu814Gly interrompent l'interaction de SCRIB1-



PDZ avec le VANGL2-Cterminal. (D) L'interaction entre hSCRIB1-PDZ-pGADT7 et hVANGL2-Cterm-pGBKT7 a été confirmée en mesurant l'activité de l' $\alpha$ -galactosidase. \* P <0,05.

## 5. Discussion

Ce travail de doctorat s'inscrit dans le programme de recherche du laboratoire qui consiste à étudier la génétique moléculaire des anomalies congénitales des systèmes nerveux central et squelettique. Particulièrement, on a démontré un rôle important des gènes de la polarité cellulaire planaire (PCP) incluant *VANGL1* et *VANGL2* dans l'étiologie des ATN chez l'humain. Dans ce projet de recherche, on visait à analyser le rôle du gène *Scribble1* de la voie PCP dans la pathogenèse de ces anomalies chez la souris et l'humain. Ce gène fait partie d'un autre type de polarité qui est la polarité apico-basale (A-B) et cette étude nous a permis d'investiguer la relation entre ces 2 types de polarité au cours du développement des ATN.

### 5.1 *Scrib1* exerce un effet spécifique sur les tissus des souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Crc</sup>*

Dans ce projet, nous avons commencé par étudier la polarité A-B et les différentes liaisons cellulaires (les jonctions) dans les cellules neuroépithéliales au niveau de tube neural des souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Crc</sup>*. On a trouvé que cette polarité ainsi que les contacts cellulaires n'ont pas été affectés généralement bien que nous ne puissions pas éliminer complètement les altérations subtiles.

Ces souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Crc</sup>* développent des malformations cardiaques et une cardiomyopathie attribuable à des anomalies dans l'organisation des cardiomyocytes pendant le développement précoce du tube cardiaque (180). Ainsi, les poumons de ces souris sont anormalement formés avec moins de voies respiratoires, et ces voies respiratoires manquent souvent une visible lumière ouverte (181). Les données de notre étude sont partiellement concordantes avec des études antérieures réalisées sur ces souris mutantes, où la polarité A-B semble être normale dans le développement du poumon et du cœur, fournissant ainsi une forte preuve que les défauts de développement causés par la perte de fonction de *Scrib1* dans tous les tissus analysés incluant ceux de poumon et du cœur sont indépendants de son rôle dans la polarité A-B (180, 181). Ces résultats sont contradictoires avec des études réalisées sur des mutants du gène *Scrib* dans la *Drosophila* où la perte de fonction de *scrib* se traduit par une mauvaise répartition des protéines apicales et des jonctions adhérentes à la surface cellulaire

basolatérale, ce qui révèle une perturbation sévère de la polarité A-B chez ces mutantes de la *Drosophile* (125, 147).

Les tissus des souris mutantes *Scrib1*<sup>Cre/Cre</sup> au niveau du tube neural ont montré une distribution sous-cellulaire normale de la protéine des jonctions adhérentes  $\beta$ -caténine suggérant que les contacts cellulaires sont correctement entretenus dans les tissus neuronaux du tube neural par rapport aux tissus cardiaques et pulmonaires (180, 181). Cette distribution a été gravement perturbée dans les tissus épithéliaux des poumons et des cœurs des souris mutantes *Scrib1*<sup>Cre/Cre</sup> et aussi suite à la suppression de *Scrib1* dans des cultures organotypiques, démontrant ainsi un rôle essentiel pour Scrib1 dans la régulation du phénomène de l'adhésion cellulaire lors de la formation des lumières des voies respiratoires pendant le développement du poumon, ainsi que pendant l'organisation des cardiomyocytes au cours du développement prématuré de tube cardiaque. Il est important de mentionner que les jonctions adhérentes n'ont pas été totalement perdues dans ces tissus mutants, où il a été démontré dans les poumons que la mauvaise localisation de la protéine de jonction  $\beta$ -caténine a entraîné des interactions cellulaires plus faibles menant à une réduction dans la cohésion cellulaire (181). Cette fonction semble être distincte de la PCP, car des défauts dans les jonctions cellulaires pendant la morphogenèse pulmonaire n'ont pas été observés chez deux souris mutantes de la PCP, *Celsr1*<sup>Crsh</sup> (souris mutantes dans le gène *Celsr1*) et *Vangl2*<sup>Lp</sup>. Chez ces mutantes, l'immunohistochimie avec un anticorps anti- $\beta$ -caténine n'a montré aucun changement dans les poumons des souris *Celsr1*<sup>Crsh</sup> ou *Vangl2*<sup>Lp</sup> indiquant que les jonctions adhérentes n'étaient pas grossièrement affectées (250). Alors que la distribution de la protéine  $\beta$ -caténine dans le neuroépithélium des souris mutantes *Scrib1*<sup>Cre/Cre</sup> semble être normale, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une faible interaction entre les cellules pour assurer des liaisons cellulaires dans ce tissu (tube neural), ainsi nous ne pouvons pas retirer des conclusions majeures sur la nécessité de Scrib1 en tant que régulateur majeur de l'adhésion cellulaire, en plus de son rôle crucial dans la PCP, pendant la formation du tube neural.

Dans cette étude, nous avons démontré un rôle important pour Scrib1 dans la distribution appropriée de Par-3 et Vangl2 au cours du développement de tube neural. Alors que la localisation de Par-3 n'a pas été étudiée précédemment dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Cre/Cre</sup>, des défauts dans la localisation de Vangl2 ont été également détectés dans

l'épithélium pulmonaire et les cardiomyocytes des souris *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*, mais ces défauts n'étaient pas similaires à ceux observés dans notre étude au niveau de tube neural. Dans les poumons en développement des souris de type sauvages, la protéine Vangl2 a été enrichie vers le côté apical des voies aériennes et cela n'a pas été observé dans les tissus pulmonaires des souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*, indiquant des changements légers dans la répartition spatiale de Vangl2 (181). Dans le myocarde (tissus musculaires du cœur) en développement, Vangl2 se co-localise avec Scrib1 dans les compartiments membranaires des cardiomyocytes des souris de type sauvages et cette localisation a été significativement modifiée dans les cellules des souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>* où il a été principalement localisé dans le cytoplasme (180). Dans notre étude, la localisation sous-cellulaire de Vangl2 n'a pas été affectée dans les cellules neuroépithéliales de tube neural chez les souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>* où elle a toujours été détectée à la membrane; cependant, sa distribution tissulaire a été affectée où elle est devenue significativement enrichie du côté apical de tube neural (en face de la lumière de tube neural), ce qui suggère une nécessité fonctionnelle spécifique aux tissus de Scrib1 dans la distribution spatiale de Vangl2 au cours du développement du tube neural.

## **5.2 Scrib1 contrôle la localisation de Vangl 1/2 à travers son effet sur la localisation Par-3**

Les tissus neuro-épithéliaux au niveau du tube neural des souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>* présentent une altération significative dans la localisation de la protéine Par-3 qui a été considérablement réduite au niveau apical du tube neural. La localisation de la protéine Par-3 a subi un changement dramatique où elle s'est déplacée de la périphérie (la membrane) des cellules dans les souris de type sauvage à une localisation cytosolique dans les souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*. Ces mêmes cellules mutantes ont également montré un enrichissement apical de Vangl2 face à la lumière de tube neural. La suppression de *Scrib1* dans les cellules MDCK II a causé des défauts similaires dans la localisation des protéines Par-3 et Vangl1 qui peuvent être sauvées par une cotransfection de *Scrib1* de type sauvage. Suite à une suppression de *Scrib1* avec *Scrib1* shRNA, Par-3 a pu sauver partiellement la localisation anormale résultante de Vangl1 alors que Vangl2 n'a pas réussi à sauver le défaut dans la localisation de la protéine

Par-3, ce qui suggère que Par-3 et Vangl 1/2 ne maintiennent pas réciproquement les limites apicales et basales. La suppression de *Par-3* a provoqué aussi un défaut dans la localisation de Vangl1 qui était similaire à celui observé lors de la suppression de *Scrib1* et qui peut être partiellement sauvé par Par-3. Ces données suggèrent que Scrib1 contrôle la localisation apicale de Par-3 qui à son tour et par des mécanismes inconnus restreint la localisation basolatérale de Vangl1/2. Lors de la suppression de *Scrib1*, Par-3 perd sa démarcation apicale et contribue à la perte de la restriction basolatérale de Vangl1/2, un phénotype qui est également généré par la suppression de *Par-3* et qui est indépendant du rôle de Scrib1 ou Par-3 dans la polarité A-B. Ce modèle n'exclut pas la présence d'autres mécanismes parallèles par lesquels Scrib1 sert comme un intermédiaire direct dans la localisation basolatérale de Vangl1/2, spécialement que Par-3 ne sauve pas complètement le phénotype d'enrichissement apical anormal de Vangl1 provoqué par la suppression de *Scrib1*.

Le rôle de Scrib dans le confinement de la protéine Par-3 sur les côtés apicaux des cellules épithéliales a été établi depuis longtemps dans la mouche (125). Deux modèles ont été émis, mais toujours pas prouvés avec des mécanismes sous-jacents. Le premier modèle représente Scrib en tant que partie d'une barrière de diffusion, similaire aux jonctions serrées chez les vertébrées, qui sépare physiquement les compartiments apicaux et basolatéraux. Le deuxième modèle suggère que Scrib a un rôle dans le ciblage polarisé des vésicules de transport portant des protéines apicales (125). Mais la question qui se pose actuellement est comment Par-3 peut-il limiter la localisation de Vangl1/2 à la membrane basolatérale? On pourrait spéculer sur les mêmes deux modèles proposés pour Scrib1. Par-3 co-localise avec ZO1 au niveau des jonctions serrées et peut donc former une barrière physique à ce niveau avec d'autres protéines pour empêcher Vangl1/2 de se localiser dans la partie apicale. Alternativement, Par-3 pourrait interagir à travers ses domaines PDZ avec le complexe exocyste, un appareil de ciblage par sécrétion qui est localisé au niveau des jonctions serrées et impliquées dans la ségrégation polarisée des protéines transmembranaires et qui sert aussi à diriger les vésicules après leurs sorties du complexe de Golgi vers des endroits spécifiques sur la membrane plasmique (251). Il est intéressant de noter que la surexpression de *Bazooka* (orthologue de *Par-3* dans la mouche) dans les cellules épithéliales de l'aile des mouches empêche l'accumulation polarisée de la protéine Flamingo (Fmi) qui fait partie des membres

de la voie PCP (252). Ceci a été expliqué par le fait que Par-3 pourrait affecter l'orientation des microtubules et par conséquent réorienter le transport polarisé des vésicules contenant du Fmi (252). On pourrait suggérer un rôle similaire pour Par-3 dans le transport polarisé des vésicules transportant Vangl1/2 pendant la signalisation PCP. La surexpression de *Par-3* ou son expression ectopique provoquée par une suppression de *Scrib1* perturberait cette accumulation polarisée.

### 5.3 Scrib1, Vangl2, Par-3 et l'extension convergente (EC)

*Scrib1* est une protéine multifonctionnelle qui a des rôles essentiels dans de nombreux processus importants pour la formation du tube neural, y compris la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire, les divisions cellulaires orientées et le phénomène de l'extension convergente (EC) (120, 135, 253). Alors qu'aucune analyse directe de l'EC dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup> n'a pas été signalée, ces souris mutantes présentent plusieurs caractéristiques morphologiques similaires à celles des souris mutantes de la voie PCP queue en boucle (Looptail *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup>), y compris des plis neuraux largement espacés, un axe de corps raccourci et une ligne médiane élargie (120). Tel que déjà décrit dans les sections précédentes (**sections 1.9.6.2.2 et 1.9.6.2.3**), *Scrib1* interagit génétiquement avec *Vangl2* (15), ainsi dans cette étude nous avons démontré que les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup> présentent une distribution tissulaire altérée de *Vangl2* dans le tube neural en développement où il est enrichi dans la partie apicale du tissu neural. Toutes ces données nous fournissent la preuve que les ATN dans ces souris mutantes sont causées par un défaut dans le phénomène de l'EC plutôt que par d'autres processus cellulaires et développementaux contrôlés par le gène *Scrib1*.

À ce jour, il a été démontré que *Scrib1* interagit génétiquement et physiquement avec un seul membre des membres centraux de la voie PCP qui est *Vangl2* (120, 158). Ainsi, il a été démontré que *Scrib1* jouait un rôle important dans le ciblage asymétrique de *Vangl2* à des points de contact spécifiques entre les cellules, le long de l'axe de polarisation dans la cochlée en développement des mammifères. Cette asymétrie a été perdue dans les souris mutantes *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup> et *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>. Malgré la mutation dans le gène *Scrib1* dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>, *Vangl2* était encore présent au niveau des membranes des cellules de la cochlée

(218). Ces observations sont concordantes avec nos résultats où la protéine Vangl2 a été détectée dans les membranes des cellules neuroépithéliales des souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>* mais un fort enrichissement sur le site apical de tube neural. Ainsi, dans les cellules MDCK II exprimant des niveaux faibles de Scrib1 (après une suppression de *Scrib1*), Vangl1 a également été exprimé à la membrane plasmique, mais il ne se limitait pas à ses côtés basolatéraux, et devenait enrichi dans la partie apicale de ces cellules. Ces données suggèrent que la mutation identifiée dans les souris mutantes *Scrib1<sup>Cre</sup>* provoque un défaut dans le phénomène de l'EC par son effet sur la localisation de Vangl1/2 qui est très essentielle pour son rôle dans l'EC et la signalisation de la voie PCP.

Une découverte inattendue et intéressante dans notre étude qui révèle l'exigence d'une bonne localisation appropriée de la protéine apicale Par-3 pour que l'effet médiateur de Scrib1 sur la localisation Vangl1/2 soit fonctionnel. Plusieurs études ont démontré un rôle important de la protéine Par-3 dans la signalisation de la voie PCP indépendamment de son rôle bien établi dans la polarité A-B et la formation des jonctions serrées. En effet, alors qu'un knock-out conditionnel de Par-3 dans les reins n'a révélé aucun défaut majeur dans la polarité A-B et la formation de jonctions serrées, il a entraîné par contre une orientation médiolaterale défectueuse des cellules épithéliales conduisant à une extension convergente et morphogenèse tubulaire défectueuse (254). Une implication plus directe de Par-3 dans la signalisation de la voie PCP a été démontrée dans les cellules capillaires des ailes des mouches de la *Drosophila*, où la surexpression de *Bazooka / Par-3* perturbe la voie PCP en perdant sa capacité de restreindre la protéine Flamingo (Fmi) au niveau des membranes plasmiques proximales et distales dans les tissus épithéliaux des ailes de ces mouches (252). En se basant sur nos résultats qui révèlent un effet direct de Par-3 sur la localisation de Vangl1 dans les lignées cellulaires MDCK II, il serait très pertinent d'étudier si les mutantes *Bazooka / Par-3* présentent des défauts dans la distribution sous-cellulaire et tissulaire de la protéine Strabismus/Vangl2.

La localisation asymétrique des protéines de la voie PCP à travers les cellules qui sont soumises à une polarisation planaire est une exigence cruciale pour assurer des interactions spécifiques entre elles et une signalisation appropriée de la voie PCP (255). Sur la base de ces études antérieures et de nos résultats actuels, nous émettons l'hypothèse que la mutation

identifiée dans la souris mutante *Scrib1*<sup>Crc</sup> affecte la localisation apicale de la protéine Par-3 qui à son tour affecte la localisation de la protéine Vangl 1/2, conduisant ainsi à des défauts dans la signalisation de la voie PCP et aussi dans le phénomène de l'EC, ce qui entraîne finalement une défaillance dans la formation de tube neural. Ce nouveau rôle de Par-3 est probablement indépendant de son rôle bien établi dans la polarité A-B. Dans notre étude, les modifications majeures dans la localisation de Par-3 n'ont pas affecté la distribution de la polarité A-B ou de la protéine Lgl2. Ceci est concordant avec l'absence de défauts majeurs dans la polarité A-B pendant le knock-out conditionnel de Par-3 dans les reins, probablement en raison de la redondance fonctionnelle par d'autres protéines liées au PAR-3 (par exemple PAR-3L / PAR-3).

#### **5.4 Des mutations dans *SCRIB1* associées aux ATN chez l'humain et la souris affectent son association membranaire, sa capacité à moduler la localisation subcellulaire de Par-3 et Vangl1 et son interaction physique avec Vangl2**

Des mutations rares dans le gène *Scrib1* ont été déjà associées à des ATN dans des souris modèles ainsi que chez les humains (120, 226, 227, 230, 255). Dans des études précédentes, des études de séquençage de *SCRIB1* dans 36 fœtus affectés par la forme la plus sévère des ATN, la craniorachischisis, ainsi que 192 nourrissons atteints de la myéломéningocèle (MMC) ont identifié un total de 7 mutations faux sens et rares associées à des ATN, dont quatre ont affecté la localisation cellulaire de SCRIB1 (230, 231). Dans cette étude, nous avons étendu le dépistage génétique de *SCRIB1* à une plus grande cohorte composée de 473 patients atteints de diverses formes d'ATN ouvertes et fermées, dont 214 cas de MMC et 247 cas d'ATN fermés, dont 61 étaient affectés d'une forme très sévère et très rare qui est l'agénésie caudale. Nous avons identifié 5 nouvelles mutations faux sens et rares dans 5 patients atteints des ATN. Ces mutations étaient absentes dans 467 contrôles ethniquement appariés et qui étaient prédites pathogènes par les outils bio-informatiques SIFT et Polyphen. Une mutation, **pGly263Ser**, était nouvelle, car elle était également absente dans les bases de



données publiques. La fréquence des mutations associées aux ATN dans *SCRIB1* dans notre étude a été **1% (5/473)** et est inférieure à ce qui était précédemment rapporté pour ce gène (**7/228 ou 3%**) dans les autres études, reflétant éventuellement la distribution des différents types d'ATN dans les cohortes analysées ou tout simplement un biais d'échantillonnage. Les mutations potentiellement pathogènes ont été détectées dans 3 cas de MMC, un cas d'agénésie caudale et un cas de sinus cutané qui représente la forme la plus modérée des ATN. Ce dernier était un cas familial où la mère avait 3 grossesses terminées des fœtus affectés par une MMC lombosacrée. Très probablement et comme prévu pour ce genre de maladie complexe et génétiquement hétérogène, ces mutations agissent comme des facteurs prédisposants qui doivent interagir avec d'autres facteurs génétiques et environnementaux pour moduler l'incidence et la gravité du phénotype des ATN.

Nous avons ensuite procédé à la validation fonctionnelle de ces mutations en étudiant leur effet sur la localisation membranaire de la protéine Scrib1, son interaction physique avec Vangl2 et sa capacité à moduler la localisation subcellulaire de Vangl 1/2 à travers Par-3. Comme c'est déjà indiqué, nous avons inclus dans notre analyse fonctionnelle deux mutations de souris, p.Ile285Lys et p.Glu814Gly, qui agissent de manière semi-dominante et très pénétrante. Cette analyse exhaustive de l'effet potentiel de 7 mutations *SCRIB1* dans 3 analyses fonctionnelles nous a permis de mieux comprendre le rôle de ce gène dans les mécanismes moléculaires pathogéniques qui contrôlent les ATN. Deux mutations humaines, p.Gly263Ser et p.Gln808His, et deux mutations de souris, p.Ile285Lys et p.Glu814Gly, ont affecté significativement l'association membranaire de SCRIB1 et ont échoué à sauver la capacité de SCRIB1 à contrôler la localisation subcellulaire de Par-3 et Vangl1, fournissant ainsi une forte preuve que ces 4 mutations sont pathogènes. Les mutations p.Ile285Lys et p.Gly263Ser se localisent dans le domaine LRR de la protéine SCRIB1 qui est crucial pour sa localisation et sa fonction sous-cellulaire. Les mutations p.Gln808His et p.Glu814Gly qui se localisent dans le domaine PDZ1 et la mutation p.Arg1150Gln qui se localise dans le domaine PDZ4 de la protéine SCRIB1 affectent sévèrement l'interaction avec la protéine Vangl2 en utilisant le teste de système double hybride (Y2H).

Dans des études réalisées sur les mouches de la *Drosophila* et des lignées de cellules mammaires, il a été déjà montré que l'altération de la localisation de Scrib à la membrane

imite souvent le phénotype de la perte de fonction de ce gène (225, 256, 257). Dans notre étude, les mutations qui ont affecté la fonction de la protéine SCRIB1 ont été localisées dans les domaines LRR ou PDZ. En utilisant une série allélique de mutations avec des transgènes pour des expériences de sauvetage dans le modèle de la mouche, un mécanisme en deux parties a été suggéré pour la localisation de Scrib sur la membrane cellulaire: la première étape implique des interactions contrôlées par le domaine LRR qui vont relier la protéine à la membrane plasmique et dans la deuxième étape, les interactions de la protéine Scrib à travers ses domaines PDZ vont enrichir ces liaisons membranaires dans les futurs sites des jonctions septate (équivalent des jonctions adhérentes chez les vertébrés) (225). Les études biochimiques et morphologiques dans les cellules polarisées MDCK II ont démontré que Vangl2 agit comme un crochet membranaire pour le complexe Scrib (158). Il a été suggéré que le domaine LRR puisse agir de manière dominante dans la liaison de Scrib1 à la membrane et que la liaison de Vangl2 aux domaines PDZ de la protéine Scrib1 pourrait stabiliser sa liaison membranaire pour permettre à d'autres protéines de se lier à d'autres régions de cette protéine. Ce rôle stabilisateur de Vangl2 semble être important, mais pas essentiel pour la localisation et la fonction de Scrib1, en fait, la suppression des domaines PDZ a provoqué des légers défauts de polarité dans la mouche, mais n'a pas affecté la liaison membranaire de la protéine Scrib1 dans les cellules MDCK II (158, 225). Dans notre étude, une mutation humaine, p.Arg1150Gln, a affecté l'interaction de Scrib1 avec Vangl2, mais n'a pas perturbé sa localisation membranaire et d'autre part elle a pu sauver l'effet de la suppression de *Scrib1* sur la localisation des protéines Par-3 et Vangl2. D'autre part, deux mutations qui se localisent dans le motif LRR, une mutation humaine, p.Gly263Ser et une mutation de souris, p.Ile285Lys, ont affecté la localisation subcellulaire de la protéine Scrib1 et ils ont complètement aboli sa capacité à sauver l'effet de sa suppression sur la localisation des protéines Par-3 et Vangl1. Ces résultats se concordent avec un rôle essentiel et dominant de domaine LRR et un rôle moins dominant des domaines de liaison avec Vangl2 (PDZ) dans la fonction normale la protéine Scrib1. Cependant, nous avons détecté deux mutations qui correspondent aux domaines PDZ, une mutation humaine, p. Gln808His, et une mutation de souris, p.Glu814Gly, qui ont agi de manière pathogénique dans les 3 essais fonctionnels. Bien que ces deux mutations affectent l'interaction de Scrib1 avec Vangl2, nous supposons que cet effet n'est pas suffisant pour leur effet pathogénique et que ces deux mutations provoquent des

changements conformationnels majeurs de la protéine SCRIB1 ou affectent ses interactions avec d'autres protéines inconnues essentielles à sa fonction et localisation normales.

## 6. Futures directions et défis

### 6.1. Rôle de la protéine Par-3 dans le confinement de la protéine Vangl1/2 à la membrane basolatérale

Notre étude démontre un rôle important de *Scrib1* dans la pathogenèse des ATN à travers son effet médiateur sur la localisation de Par-3 et Vangl 1/2, mais la question qui se pose actuellement est comment Par-3 peut-il limiter la localisation de Vangl1/2 à la membrane basolatérale? Tel que discuté dans la section 5.2, deux modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes par lesquels Scrib confine la protéine Par-3 sur les côtés apicaux des cellules épithéliales dans la mouche. Le premier modèle représente Scrib en tant que partie d'une barrière de diffusion, qui sépare physiquement les compartiments apicaux et basolatéraux. Le deuxième modèle suggère que Scrib a un rôle dans le ciblage polarisé des vésicules de transport portant des protéines transmembranaires (125). Nous avons proposé que ces 2 modèles puissent aussi expliquer les mécanismes par lesquels Par-3 limite la localisation de Vangl1/2 à la membrane basolatérale. Nous pourrions tester ces 2 modèles :

(1) Plusieurs études ont démontré que la protéine Par-3 se colocalise avec la Protéine Zo-1 au niveau apical plus précisément au niveau des jonctions serrées et adhérentes (258, 259). Ainsi, dans notre étude, on a remarqué que Par-3 colocalise avec ZO1 au niveau membranaire dans le tube neural des souris *Crc*, ainsi que dans la partie apicale des cellules MDCK II. On a identifié une diminution significative de l'expression de ZO-1 du côté apical des cellules neuroépithéliales du tube neural dans les sections des souris mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*. On étudiera les profils d'expressions des autres éléments de ces jonctions serrées comme claudin-1, claudin-4 et occludin (260) dans les souris de type sauvages et les mutantes *Scrib1<sup>Crc/Crc</sup>*. On analysera l'effet de la suppression par shRNA de chacune de ces composantes des jonctions serrées, incluant ZO1, sur la localisation de VANGL1 dans le côté basolatérale des cellules MDCK II.

(2) Tel que discuté dans la section 5.2, l'exocyst est un élément essentiel de la voie de sécrétion requise pour la délivrance des protéines basolatérales aux membranes plasmiques

des cellules épithéliales. La livraison se produit à côté des jonctions serrées, où ces éléments reconnaissent un élément associé à ces jonctions qui est Par3. Des études ont démontré que la suppression de *Par3* provoque une apoptose, déclenchée par la réduction en phosphoinositide triphosphate et la diminution de la phosphorylation d'Akt (une protéine kinase), ce qui cause un échec de l'exocyste à délivrer des protéines basolatérales au cortex cellulaire. L'interaction entre les éléments du complexe exocyste et Par3 se fait à travers une petite région de Par3 qui se lie directement à l'Exo70 et qui est suffisante pour la fixation des exocystes, la livraison des protéines membranaires et la survie cellulaire (251).

Pour tester si Par-3 joue un rôle dans le ciblage polarisé des vésicules de transport portant Vangl1/2 et si ce ciblage est défectif dans les souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>*, on étudiera les profils d'expression des membres de complexes octamériques de l'exocyste (les protéines Sec1-8) dans ces souris pour voir si la délocalisation de la protéine Par3 affecte l'expression et le fonctionnement de ces éléments comme c'est le cas lors de la suppression de *Par3*. Ainsi, on analysera aussi l'effet de la suppression par shRNA des éléments qui composent le complexe exocyste (Sec 1-8) sur la localisation de la protéine Vangl1 dans les cellules MDCK II et on va comparer les résultats au phénotype d'enrichissement de Vangl2 du côté apical lors de la suppression de *Par3* et *Scrib1* dans notre étude.

Les dynéines sont des protéines associées aux microtubules (MT) qui permettent les déplacements de vésicules qui leur sont associées, vers le centre cellulaire. Il a été déjà montré que la suppression de la chaîne lourde de dynéine (CHD), inhibe fortement le transport d'organelle au niveau cellulaire (261). Ainsi, il a été démontré que la protéine Par3 s'associe à la dynéine et contribue à la régulation locale du MT, à la dynamique au niveau des contacts cellulaires et au positionnement correct du centrosome au centre cellulaire (262). Parce que la localisation de Par3 est significativement perturbée dans les souris mutantes *Scrib1<sup>Cre/Cre</sup>*, on pourra étudier les profils d'expression des protéines dynéines dans ces souris mutantes et voir si leur association avec la protéine Par3 est perturbée indiquant un effet sur le phénomène du transport vésiculaire de la protéine Vangl2 dans ces souris mutantes. Ainsi, on analysera aussi l'effet de la suppression par shRNA des dynéines sur la localisation de la protéine Vangl1 dans les cellules MDCK II

## **6.2. Investiguer le rôle des autres membres des deux polarités A-B et PCP au cours du développement du tube neural dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>**

Il est déjà connu chez la mouche que Fz participe dans la localisation du complexe Baz/Par-6/aPKC au côté postérieur des cellules, tandis que Vang recrute Dlg1 vers le côté antérieur des mêmes cellules (263, 264). En revanche, dans une étude très récente au niveau de l'œil des mouches, Baz se localise avec Vang plutôt qu'avec Fz (143). Ainsi, la voie PCP est perturbée par une forte surexpression de Baz et que cette protéine peut se lier spécifiquement à la protéine Stan à travers ses domaines PDZ (252). D'un autre côté, il a été déjà montré que la protéine Vangl2 dépend de la localisation asymétrique de la protéine Fz. En outre, la démonstration d'une interaction physique entre Vangl2 et Fz3 suggère que la perte de l'asymétrie de Fz3 aux bords proximaux des cellules capillaires en développement des souris mutantes Lp en absence de Vangl2 est le résultat d'une perturbation de cette interaction physique plutôt que d'un effet secondaire d'une perturbation globale de la polarisation cellulaire (228). Pour mieux analyser le lien moléculaire entre les deux polarités au cours du développement du tube neural il faut élargir les études des profils d'expression pour inclure les autres membres des deux polarités spécifiquement pour Fz et Celsr (orthologue de Stan), ainsi que les autres membres des trois complexes de la polarité A-B, Scrib1, Par et Crumbs, comme la protéine aPKC et Dlg1 dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup> et dans les cellules MDCK II en utilisant les shRNA ScrbKD et Par-3 KD.

## **6.3. Investiguer plus en détails la structure des jonctions adhérentes et du cytosquelette dans les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>**

La distribution cellulaire de la protéine  $\beta$ -caténine des jonctions adhérentes a été gravement perturbée dans les tissus épithéliaux des poumons et des cœurs des souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup> et aussi suite à la suppression de *Scrib1* dans des cultures organotypiques (180,

181). En revanche, dans notre étude cette distribution a été normale indiquant partiellement que les contacts cellulaires sont correctement entretenus dans les tissus du tube neural. Pour tester et/ou confirmer la certitude de notre conclusion, on pourrait analyser les profils d'expression des autres marqueurs des jonctions adhérentes comme GP153 et Claudine 2, soient sur les souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup> ou bien dans les cellules MDCK II en supprimant l'expression de *Scrib1* par l'utilisation des shRNA.

Ainsi, dans les tissus pulmonaires des souris mutantes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup>, les analyses moléculaires ont révélé une perturbation importante du cytosquelette de l'actine-myosine (181). En revanche, l'immunohistochimie avec la phalloïdine dans notre étude a montré une organisation cytosquelettique normale dans les sections des souris mutantes et sauvages. Cependant, son expression du côté apical du tube neural a été significativement diminuée dans les sections des souris mutantes. Il serait intéressant de tester les autres éléments qui forment le cytosquelette comme l'actine-myosine, Protéine associée aux microtubules -2 (MAP-2) dans la partie apicale du tube neural pour mieux analyser la diminution de l'expression de phalloïdien dans cette partie du tube neural.

## **6.4. Investiguer les modifications épigénétiques dans l'ADN des patients**

La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la régulation de la transcription. Ce phénomène est particulièrement intéressant pour les ATN avec le développement de l'hypothèse de méthylation qui suggère que l'acide folique prévient les ATN en les protégeant contre les défauts de réactions de méthylation qui mèneraient autrement à des altérations des niveaux d'expression de gènes essentiels à la neurulation (76). Au cours des dernières années, des changements épigénétiques ont été trouvés fortement associés à des maladies comme le cancer et certains étaient aussi suggérés dans la pathogenèse des ATN. Une étude récemment publiée a suivi les changements dans la méthylation de l'ADN de plusieurs gènes chez les enfants atteints des ATN et a montré une association avec le niveau de méthylation de *VANGL1* et *VANGL2* (265). Il sera particulièrement important d'investiguer si les changements épigénétiques tels que la méthylation et les modifications des histones dans les gènes associés

aux ATN incluant *SCRIB1* jouent un rôle important dans la pathogenèse des ATN. Les modifications épigénétiques peuvent être investiguées à l'échelle génomique par la technique de séquençage au bisulfite de l'ADN génomique où la cytosine montre une sensibilité accrue par rapport à 5-méthylcytosine (5-MeC) au bisulfite désamination dans des conditions acides. Des effets sur l'expression génique par des modifications épigénétiques seront testés par l'utilisation de la technique d'RNA-seq sur des tissus neuronaux fœtaux.

## 6.5. Rôle de *Scrib1* dans le guidage axonale

Une étude très récente réalisée chez les poissons-zèbres a démontré l'implication des gènes *Vangl2* et *Scrib1* dans le phénomène de guidage des axons commissuraux (139). Pour tester si *Scrib1* est impliqué dans le guidage axonal, nous allons d'abord analyser son profil d'expression dans le développement du cerveau et de la moelle épinière et comparer son expression à celle de chacun des 3 gènes de la voie PCP, *Vangl2*, *Fz3* et *Celsr3*. Nous étudierons la co-localisation de *Scrib1* avec *Vangl2*, TAG1 (un marqueur des axones commissuraux qui n'ont pas traversé la ligne médiane) et L1 (un marqueur des axones commissuraux qui ont traversé la ligne médiane). Dans la capsule interne qui est au cours de développement, nous étudierons la co-localisation de *Scrib1* avec L1 qui est un marqueur des voies cortico-spinales et thalamo-corticales et TAG-1 qui est un marqueur de la voie cortico-thalamique. Pour déterminer si *Scrib1* interagit avec *Vangl2* dans la médiation de l'orientation des axones commissuraux au cours du développement de la moelle épinière, une préparation à livre ouvert (open book) sera faite à partir de la moelle épinière à partir des embryons de E11.5 de type sauvage, hétérozygotes *Scrib1*<sup>Crc/+</sup>, homozygotes *Scrib1*<sup>Crc/Crc</sup> et doubles hétérozygotes *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> ; *Scrib1*<sup>Crc/+</sup>. Le trajet des axons commissuraux sera examiné par immunohistochimie avec TAG-1 ou L1 et par des études de marquage avec le colorant Dil. *Wnt5a* qui stimule la signalisation de la voie PCP est connue aussi par son rôle d'attraction des axones commissuraux après la traversée de la ligne médiane. Par conséquent, les axones commissuraux de ces souris seront testés pour leur réponse en mesurant la longueur de leur axone en culture dissociée avec ou sans enrichissement du *Wnt5a*. Pour mieux caractériser les interactions de *Vangl2* et *Scrib1* pendant la guidance axonale, leurs protéines de fusion fluorescentes seront exprimées individuellement et en combinaison dans les neurones



commissuraux dissociés, ainsi que leur localisation subcellulaire sera analysée dans les cônes de croissance des axones commissuraux.

En conclusion, toutes ces études futures sur le gène *Scrib1* sont essentielles pour mieux comprendre son rôle dans la formation du tube neural et dans les ATN ainsi que son rôle comme un élément médiateur entre les différentes voies de signalisation et polarité durant le développement embryonnaire.

## 8. Bibliographie

1. Gilbert SF, Barresi MJF. Developmental biology. Eleventh edition. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc; 2016. xxiii, 810 pages, 100 pages diversement numérotées p.
2. Gilbert SF, Singer SR. Developmental biology. 8th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2006. xviii, 817 p. p.
3. Gray H, Williams PL, Bannister LH. Gray's anatomy : the anatomical basis of medicine and surgery. 38th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. xx, 2092 p. p.
4. Levy RM. Anatomic considerations for spinal cord stimulation. *Neuromodulation*. 2014;17 Suppl 1:2-11.
5. Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2013;115:29-41.
6. Stower MJ, Bertocchini F. The evolution of amniote gastrulation: the blastopore-primitive streak transition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2017.
7. Rossi A, Biancheri R, Cama A, Piatelli G, Ravegnani M, Tortori-Donati P. Imaging in spine and spinal cord malformations. *Eur J Radiol*. 2004;50(2):177-200.
8. Ferrer-Vaquero A, Hadjantonakis AK. Birth defects associated with perturbations in preimplantation, gastrulation, and axis extension: from conjoined twinning to caudal dysgenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2(4):427-42.
9. Bassuk AG, Kibar Z. Genetic basis of neural tube defects. *Semin Pediatr Neurol*. 2009;16(3):101-10.
10. Lowery LA, Sive H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech Dev*. 2004;121(10):1189-97.
11. McCann MR, Seguin CA. Notochord Cells in Intervertebral Disc Development and Degeneration. *J Dev Biol*. 2016;4(1):1-18.
12. Keller RE, Danilchik M, Gimlich R, Shih J. The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*. 1985;89 Suppl:185-209.
13. Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clin Genet*. 2007;71(4):295-310.
14. Wang X, Sun J, Li C, Mao B. EphA7 modulates apical constriction of hindbrain neuroepithelium during neurulation in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(4):759-65.
15. Wallingford JB. Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005;135C(1):59-68.
16. Haigo SL, Hildebrand JD, Harland RM, Wallingford JB. Shroom induces apical constriction and is required for hinge point formation during neural tube closure. *Curr Biol*. 2003;13(24):2125-37.
17. Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev Dyn*. 1999;215(3):273-83.

18. Camerer E, Barker A, Duong DN, Ganesan R, Kataoka H, Cornelissen I, et al. Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo. *Dev Cell*. 2010;18(1):25-38.
19. Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene ND, et al. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development*. 2007;134(17):3203-11.
20. Squire LR. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. Nov. 20 2012;4 edition
21. Mahalik SK, Vaze D, Lyngdoh TS, Tewari MK, Narasimhan KL. Embryogenesis of triple neural tube defects: sonic hedgehog--a key? *J Pediatr Surg*. 2011;46(2):e5-8.
22. Greene ND, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn*. 2009;29(4):303-11.
23. Copp AJ, Greene ND. Defining a PARTICULAR pathway of neural tube closure. *Dev Cell*. 2010;18(1):1-2.
24. O'Shea KS, Kaufman MH. Phospholipase C-induced neural tube defects in the mouse embryo. *Experientia*. 1980;36(10):1217-9.
25. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet*. 2003;4(10):784-93.
26. O'Rahilly R, Muller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*. 2002;65(4):162-70.
27. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, et al. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet*. 1993;47(5):723-43.
28. Seller MJ. Further evidence for an intermittent pattern of neural tube closure in humans. *J Med Genet*. 1995;32(3):205-7.
29. Griffith CM, Wiley MJ, Sanders EJ. The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;185(2):101-13.
30. Catala M. Genetic control of caudal development. *Clin Genet*. 2002;61(2):89-96.
31. Schoenwolf GC, Delongo J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *Am J Anat*. 1980;158(1):43-63.
32. Développement précoce du système nerveux: différenciation du tube neural et des crêtes neurales. <http://www.wembryologych/francais/vcns/tubecrete01.html>. 2017.
33. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, et al. Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N Engl J Med*. 2007;356(14):1432-7.
34. Guyot MC, Bosoi CM, Kharfallah F, Reynolds A, Drapeau P, Justice M, et al. A novel hypomorphic Looptail allele at the planar cell polarity Vangl2 gene. *Dev Dyn*. 2011;240(4):839-49.
35. Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol*. 2005;27(3):515-24.
36. Lemire RJ. Neural tube defects. *JAMA*. 1988;259(4):558-62.
37. McComb JG. Spinal and cranial neural tube defects. *Semin Pediatr Neurol*. 1997;4(3):156-66.
38. Rasmussen SA, Olney RS, Holmes LB, Lin AE, Keppler-Noreuil KM, Moore CA. Guidelines for case classification for the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2003;67(3):193-201.

39. McComb JG. A practical clinical classification of spinal neural tube defects. *Childs Nerv Syst.* 2015;31(10):1641-57.
40. Shum L, Sadler TW. Recovery by mouse embryos following teratogenic exposure to ketosis. *Diabetologia.* 1991;34(5):289-95.
41. Blaas HG, Eik-Nes SH. Sonoembryology and early prenatal diagnosis of neural anomalies. *Prenat Diagn.* 2009;29(4):312-25.
42. Cohen MM, Jr. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *Am J Med Genet.* 2002;115(4):245-68.
43. Rufener SL, Ibrahim M, Raybaud CA, Parmar HA. Congenital spine and spinal cord malformations--pictorial review. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;194(3 Suppl):S26-37.
44. Aydin H, Yanik S, Tug E, Ahsen H, Geckinli B, Senol S, et al. Craniorachischisis, gastroschisis, and a branchial sinus defect: a case report. *Genet Couns.* 2014;25(2):237-40.
45. Singh A, Pilli GS, Bannur H. Craniorachischisis Totalis with Congenital Diaphragmatic Hernia-A Rare Presentation of Fryns Syndrome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2016;35(3):192-8.
46. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med.* 1999;341(20):1509-19.
47. Naidich TP, McLone DG, Mutluer S. A new understanding of dorsal dysraphism with lipoma (lipomyeloschisis): radiologic evaluation and surgical correction. *AJR Am J Roentgenol.* 1983;140(6):1065-78.
48. Murakami N, Morioka T, Ichiyama M, Nakamura R, Kawamura N. Lateral lipomyelomeningocele of the hemicord with split cord malformation type I revealed by 3D heavily T2-weighted MR imaging. *Childs Nerv Syst.* 2017.
49. Tortori-Donati P, Rossi A, Biancheri R, Cama A. Magnetic resonance imaging of spinal dysraphism. *Top Magn Reson Imaging.* 2001;12(6):375-409.
50. Golden JAH, B. N. *Developmental Neuropathology.* Wiley-Blackwell. 2006.
51. Menkes JH, Sarnat, H. B. & Maria, B. L. *Textbook of child neurology.* Lea & Febiger. 2005.
52. Finn MA, Walker ML. Spinal lipomas: clinical spectrum, embryology, and treatment. *Neurosurg Focus.* 2007;23(2):E10.
53. Elton S, Oakes WJ. Dermal sinus tracts of the spine. *Neurosurg Focus.* 2001;10(1):e4.
54. Radmanesh F, Nejat F, El Khashab M. Dermal sinus tract of the spine. *Childs Nerv Syst.* 2010;26(3):349-57.
55. Conti P, Tenenbaum R, Capozza M, Mouchaty H, Conti R. Diastematomyelia and tumor in adults: report of two cases and literature review. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010;35(24):E1438-43.
56. Guilloton L, Allary M, Jacquin O, Billaud Y, Drouet A, Felten D, et al. [Split-cord malformation (diastematomyelia) presenting in two adults: case report and a review of the literature]. *Rev Neurol (Paris).* 2004;160(12):1180-6.
57. Pang D. Sacral agenesis and caudal spinal cord malformations. *Neurosurgery.* 1993;32(5):755-78; discussion 78-9.
58. Lynch SA, Wang Y, Strachan T, Burn J, Lindsay S. Autosomal dominant sacral agenesis: Currarino syndrome. *J Med Genet.* 2000;37(8):561-6.
59. Duhamel B. From the Mermaid to Anal Imperforation: The Syndrome of Caudal Regression. *Arch Dis Child.* 1961;36(186):152-5.

60. Tortori-Donati P, Fondelli MP, Rossi A, Raybaud CA, Cama A, Capra V. Segmental spinal dysgenesis: neuroradiologic findings with clinical and embryologic correlation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999;20(3):445-56.
61. Morota N, Ihara S, Ogiwara H. New classification of spinal lipomas based on embryonic stage. *J Neurosurg Pediatr.* 2017:1-12.
62. Flores AL, Vellozzi C, Valencia D, Sniezek J. Global Burden of Neural Tube Defects, Risk Factors, and Prevention. *Indian J Community Health.* 2014;26(Suppl 1):3-5.
63. Yi Y, Lindemann M, Colligs A, Snowball C. Economic burden of neural tube defects and impact of prevention with folic acid: a literature review. *Eur J Pediatr.* 2011;170(11):1391-400.
64. Moore CA, Li S, Li Z, Hong SX, Gu HQ, Berry RJ, et al. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. *Am J Med Genet.* 1997;73(2):113-8.
65. Wasserman CR, Shaw GM, Selvin S, Gould JB, Syme SL. Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects. *Am J Public Health.* 1998;88(11):1674-80.
66. D. Lacombe NP. Syndromes dysmorphiques. *Progrès en pédiatrie - doin.* 2013.
67. Cherstvoy E, Lazjuk G, Lurie I, Ostrovskaya T, Shved I. Syndrome of multiple congenital malformations including phocomelia, thrombocytopenia, encephalocele, and urogenital abnormalities. *Lancet.* 1980;2(8192):485.
68. Dreux S, Nguyen C, Czerkiewicz I, Schmitz T, Azria E, Foure MA, et al. Down syndrome maternal serum marker screening after 18 weeks of gestation: a countrywide study. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208(5):397 e1-5.
69. Cameron M, Moran P. Prenatal screening and diagnosis of neural tube defects. *Prenat Diagn.* 2009;29(4):402-11.
70. Lopez J, Mikaelian I, Gonzalo P. Amniotic fluid glial fibrillary acidic protein (AF-GFAP), a biomarker of open neural tube defects. *Prenat Diagn.* 2013;33(10):990-5.
71. Araujo Junior E, Nakano ML, Nardoza LM, Haratz KK, Oliveira PS, Martins WP, et al. Comparison between 2D ultrasonography and magnetic resonance imaging for assessing brain and spine parameters in fetuses with spina bifida. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;287(5):845-9.
72. Peker N, Yeniel AO, Ergenoglu M, Hursitoglu S, Akercan F, Karadadas N. Combination of intracranial translucency and 3D sonography in the first trimester diagnosis of neural tube defects: case report and review of literature. *Ginekol Pol.* 2013;84(1):65-7.
73. Egloff A, Bulas D. Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Fetal Neural Tube Defects. *Semin Ultrasound CT MR.* 2015;36(6):487-500.
74. Zugazaga Cortazar A, Martin Martinez C, Duran Feliubadalo C, Bella Cueto MR, Serra L. Magnetic resonance imaging in the prenatal diagnosis of neural tube defects. *Insights Imaging.* 2013;4(2):225-37.
75. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child.* 1976;51(12):944-50.
76. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(9):724-31.
77. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Lowry RB, Sibbald B, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med.* 2007;357(2):135-42.

78. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):4352-89.
79. Canada lspd. Acide folique et prévention des anomalies du tube neural (ATN). <http://www.phac-aspcgcca/fa-af/fa-af08-fraphp>. 2008.
80. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, et al. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med*. 2004;350(2):134-42.
81. Molloy AM, Quadros EV, Sequeira JM, Troendle JF, Scott JM, Kirke PN, et al. Lack of association between folate-receptor autoantibodies and neural-tube defects. *N Engl J Med*. 2009;361(2):152-60.
82. Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):R113-29.
83. Mitchell LE. Epidemiology of neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005;135C(1):88-94.
84. Waller DK, Mills JL, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, et al. Are obese women at higher risk for producing malformed offspring? *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170(2):541-8.
85. Zhang T, Leng Z, Liu W, Wang X, Yan X, Yu L. Suppressed expression of mitogen-activated protein kinases in hyperthermia induced defective neural tube. *Neurosci Lett*. 2015;594:6-11.
86. Temel S, van Voorst SF, Jack BW, Denktas S, Steegers EA. Evidence-based preconceptional lifestyle interventions. *Epidemiol Rev*. 2014;36:19-30.
87. Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol*. 2010;220(2):217-30.
88. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *Am J Hum Genet*. 1990;46(2):229-41.
89. Partington MD, McLone DG. Hereditary factors in the etiology of neural tube defects. Results of a survey. *Pediatr Neurosurg*. 1995;23(6):311-6.
90. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 1995;346(8982):1070-1.
91. Perez AB, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira AC, de Lima FT, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet A*. 2003;119A(1):20-5.
92. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1044-51.
93. van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM*. 1997;90(8):511-7.
94. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab*. 1999;67(4):317-23.
95. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and

decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001;10(5):433-43.

96. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(8):653-69.

97. Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P. Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet.* 2001;28(3):251-5.

98. Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev Dyn.* 2011;240(3):616-26.

99. Reynolds A, McDearmid JR, Lachance S, De Marco P, Merello E, Capra V, et al. VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish. *Mech Dev.* 2010;127(7-8):385-92.

100. Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, Salem S, Finnell RH, De Marco P, et al. Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects. *Hum Mutat.* 2009;30(7):E706-15.

101. Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, Pauwels E, De Marco P, Merello E, et al. Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clin Genet.* 2011;80(1):76-82.

102. Allache R, De Marco P, Merello E, Capra V, Kibar Z. Role of the planar cell polarity gene CELSR1 in neural tube defects and caudal agenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94(3):176-81.

103. Bosoi CM, Capra V, Allache R, Trinh VQ, De Marco P, Merello E, et al. Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene PRICKLE1 in human neural tube defects. *Hum Mutat.* 2011;32(12):1371-5.

104. Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature.* 2004;430(6995):93-8.

105. Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, et al. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell.* 2008;15(1):23-36.

106. Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development.* 2002;129(10):2507-17.

107. Kim TH, Goodman J, Anderson KV, Niswander L. Phactr4 regulates neural tube and optic fissure closure by controlling PP1-, Rb-, and E2F1-regulated cell-cycle progression. *Dev Cell.* 2007;13(1):87-102.

108. De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E. Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development.* 1999;126(17):3957-68.

109. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* 1995;9(24):3136-48.

110. Hirata H, Tomita K, Bessho Y, Kageyama R. Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J.* 2001;20(16):4454-66.

111. Murdoch JN, Rachel RA, Shah S, Beermann F, Stanier P, Mason CA, et al. Circletail, a new mouse mutant with severe neural tube defects: chromosomal localization and interaction with the loop-tail mutation. *Genomics.* 2001;78(1-2):55-63.

112. Harris MJ, Juriloff DM. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79(3):187-210.
113. Hollander LSaW. Heredity loop-tail in the house mouse accompanied by interperforate vagina and with lethal craniorachischisis when homozygous. *Journal of Heredity.* 1949;40:29-334.
114. Greene ND, Gerrelli D, Van Straaten HW, Copp AJ. Abnormalities of floor plate, notochord and somite differentiation in the loop-tail (Lp) mouse: a model of severe neural tube defects. *Mech Dev.* 1998;73(1):59-72.
115. Kibar Z, Gauthier S, Lee SH, Vidal S, Gros P. Rescue of the neural tube defect of loop-tail mice by a BAC clone containing the *Ltap* gene. *Genomics.* 2003;82(3):397-400.
116. Iliescu A, Gravel M, Horth C, Apuzzo S, Gros P. Transmembrane topology of mammalian planar cell polarity protein *Vangl1*. *Biochemistry.* 2011;50(12):2274-82.
117. Torban E, Wang HJ, Groulx N, Gros P. Independent mutations in mouse *Vangl2* that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52703-13.
118. Rachel RA, Murdoch JN, Beermann F, Copp AJ, Mason CA. Retinal axon misrouting at the optic chiasm in mice with neural tube closure defects. *Genesis.* 2000;27(1):32-47.
119. Doudney K, Stanier P. Epithelial cell polarity genes are required for neural tube closure. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005;135C(1):42-7.
120. Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, et al. Disruption of *scribble* (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum Mol Genet.* 2003;12(2):87-98.
121. Moreau MM, Piguel N, Papouin T, Koehl M, Durand CM, Rubio ME, et al. The planar polarity protein *Scribble1* is essential for neuronal plasticity and brain function. *J Neurosci.* 2010;30(29):9738-52.
122. Ellenbroek SI, Iden S, Collard JG. Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(3):208-15.
123. Pearson HB, Perez-Mancera PA, Dow LE, Ryan A, Tennstedt P, Bogani D, et al. *SCRIB* expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4257-67.
124. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):614-30.
125. Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein *Scribble*. *Nature.* 2000;403(6770):676-80.
126. Li M, Marhold J, Gatos A, Torok I, Mechler BM. Differential expression of two *scribble* isoforms during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev.* 2001;108(1-2):185-90.
127. Dow LE, Brumby AM, Muratore R, Coombe ML, Sedelies KA, Trapani JA, et al. *hScrib* is a functional homologue of the *Drosophila* tumour suppressor *Scribble*. *Oncogene.* 2003;22(58):9225-30.
128. Harris BZ, Lim WA. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 18):3219-31.
129. Jaulin-Bastard F, Nola S, Borg JP. [LAP proteins: new gatekeepers of epithelial homeostasis]. *Med Sci (Paris).* 2005;21(3):267-72.



130. Albertson R, Chabu C, Sheehan A, Doe CQ. Scribble protein domain mapping reveals a multistep localization mechanism and domains necessary for establishing cortical polarity. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 25):6061-70.
131. Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomaic V, Subbaiah VK, et al. The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction. *Oncogene.* 2010;29(38):5311-21.
132. Halaoui R, McCaffrey L. Rewiring cell polarity signaling in cancer. *Oncogene.* 2015;34(8):939-50.
133. Sun Y, Bamji SX. beta-Pix modulates actin-mediated recruitment of synaptic vesicles to synapses. *J Neurosci.* 2011;31(47):17123-33.
134. Skouloudaki K, Puetz M, Simons M, Courbard JR, Boehlke C, Hartleben B, et al. Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8579-84.
135. Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol.* 2005;171(6):1061-71.
136. Osmani N, Vitale N, Borg JP, Etienne-Manneville S. Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol.* 2006;16(24):2395-405.
137. Wada H, Iwasaki M, Sato T, Masai I, Nishiwaki Y, Tanaka H, et al. Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. *Development.* 2005;132(10):2273-85.
138. Shafer B, Onishi K, Lo C, Colakoglu G, Zou Y. Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance. *Dev Cell.* 2011;20(2):177-91.
139. Sun SD, Purdy AM, Walsh GS. Planar cell polarity genes Frizzled3a, Vangl2, and Scribble are required for spinal commissural axon guidance. *BMC Neurosci.* 2016;17(1):83.
140. Tao H, Suzuki M, Kiyonari H, Abe T, Sasaoka T, Ueno N. Mouse prick1, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(34):14426-31.
141. Dow LE, Humbert PO. Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis. *Int Rev Cytol.* 2007;262:253-302.
142. Nigro EA, Castelli M, Boletta A. Role of the Polycystins in Cell Migration, Polarity, and Tissue Morphogenesis. *Cells.* 2015;4(4):687-705.
143. Aigouy B, Le Bivic A. The PCP pathway regulates Baz planar distribution in epithelial cells. *Sci Rep.* 2016;6:33420.
144. Shin K, Margolis B. ZONing out tight junctions. *Cell.* 2006;126(4):647-9.
145. Khursheed M, Bashyam MD. Apico-basal polarity complex and cancer. *J Biosci.* 2014;39(1):145-55.
146. Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Ellum I, Richardson HE. Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene.* 2008;27(55):6888-907.
147. Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science.* 2000;289(5476):113-6.
148. Brumby AM, Richardson HE. scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J.* 2003;22(21):5769-79.

149. Pagliarini RA, Xu T. A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science*. 2003;302(5648):1227-31.
150. Humbert P, Russell S, Richardson H. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays*. 2003;25(6):542-53.
151. Peng CY, Manning L, Albertson R, Doe CQ. The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 2000;408(6812):596-600.
152. Ohshiro T, Yagami T, Zhang C, Matsuzaki F. Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature*. 2000;408(6812):593-6.
153. Santoni MJ, Pontarotti P, Birnbaum D, Borg JP. The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet*. 2002;18(10):494-7.
154. Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev*. 2004;18(16):1909-25.
155. Zhao M, Szafranski P, Hall CA, Goode S. Basolateral junctions utilize warts signaling to control epithelial-mesenchymal transition and proliferation crucial for migration and invasion of *Drosophila* ovarian epithelial cells. *Genetics*. 2008;178(4):1947-71.
156. Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, et al. Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol*. 2003;13(9):734-43.
157. Humbert PO, Dow LE, Russell SM. The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends Cell Biol*. 2006;16(12):622-30.
158. Kallay LM, McNickle A, Brennwald PJ, Hubbard AL, Braiterman LT. Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *J Cell Biochem*. 2006;99(2):647-64.
159. Ivanov AI, Young C, Den Beste K, Capaldo CT, Humbert PO, Brennwald P, et al. Tumor suppressor scribble regulates assembly of tight junctions in the intestinal epithelium. *Am J Pathol*. 2010;176(1):134-45.
160. Roman-Fernandez A, Bryant DM. Complex Polarity: Building Multicellular Tissues Through Apical Membrane Traffic. *Traffic*. 2016;17(12):1244-61.
161. Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 6):979-87.
162. Macara IG. Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(3):220-31.
163. Harris TJ, Peifer M. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2005;170(5):813-23.
164. Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kempfues KJ, Miwa J, Ohno S. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. 1998;125(18):3607-14.
165. Solecki DJ. Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol*. 2012;22(5):791-8.
166. Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*. 2000;2(8):531-9.
167. Tai LK, Zheng Q, Pan S, Jin ZG, Berk BC. Flow activates ERK1/2 and endothelial nitric oxide synthase via a pathway involving PECAM1, SHP2, and Tie2. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29620-4.
168. Wirtz-Peitz F, Knoblich JA. Lethal giant larvae take on a life of their own. *Trends Cell Biol*. 2006;16(5):234-41.

169. Petronczki M, Knoblich JA. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2001;3(1):43-9.
170. Kim JY, Song JY, Karnam S, Park JY, Lee JJ, Kim S, et al. Common and distinctive localization patterns of Crumbs polarity complex proteins in the mammalian eye. *Gene Expr Patterns.* 2015;17(1):31-7.
171. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol.* 2003;5(2):137-42.
172. Krahn MP, Buckers J, Kastrup L, Wodarz A. Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J Cell Biol.* 2010;190(5):751-60.
173. Klose S, Flores-Benitez D, Riedel F, Knust E. Fosmid-based structure-function analysis reveals functionally distinct domains in the cytoplasmic domain of *Drosophila* crumbs. *G3 (Bethesda).* 2013;3(2):153-65.
174. Nam SC, Choi KW. Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in *Drosophila*. *Development.* 2003;130(18):4363-72.
175. Koch L, Feicht S, Sun R, Sen A, Krahn MP. Domain-specific functions of Stardust in *Drosophila* embryonic development. *R Soc Open Sci.* 2016;3(11):160776.
176. Bilder D, Schober M, Perrimon N. Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol.* 2003;5(1):53-8.
177. Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature.* 2003;422(6929):326-30.
178. Hutterer A, Betschinger J, Petronczki M, Knoblich JA. Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell.* 2004;6(6):845-54.
179. Dow LE, Kauffman JS, Caddy J, Zarbalis K, Peterson AS, Jane SM, et al. The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge. *Oncogene.* 2007;26(16):2272-82.
180. Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, Hildreth V, Peat JD, Anderson RH, et al. Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circ Res.* 2007;101(2):137-45.
181. Yates LL, Schnatwinkel C, Hazelwood L, Chessum L, Paudyal A, Hilton H, et al. Scribble is required for normal epithelial cell-cell contacts and lumen morphogenesis in the mammalian lung. *Dev Biol.* 2013;373(2):267-80.
182. LAWRENCE PA. Gradients in the insect segment: The orientation of hairs in the milkweed bug on *Copeltus fasciatus*. *J Exp Biol.* 1966;44:607-20.
183. Vladar EK, Antic D, Axelrod JD. Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(3):a002964.
184. Adler PN. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2002;2(5):525-35.
185. Strutt D. Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development.* 2003;130(19):4501-13.
186. Klein TJ, Mlodzik M. Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:155-76.
187. Axelrod JD. Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(8):964-71.

188. Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell*. 2003;12(5):1251-60.
189. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev*. 1998;12(16):2610-22.
190. Axelrod JD. Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev*. 2001;15(10):1182-7.
191. Bastock R, Strutt H, Strutt D. Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning. *Development*. 2003;130(13):3007-14.
192. Tree DR, Shulman JM, Rousset R, Scott MP, Gubb D, Axelrod JD. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell*. 2002;109(3):371-81.
193. Park M, Moon RT. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol*. 2002;4(1):20-5.
194. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003;5(3):367-77.
195. Singh J, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012;1(4):479-99.
196. Strutt D, Johnson R, Cooper K, Bray S. Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the Drosophila eye. *Curr Biol*. 2002;12(10):813-24.
197. Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, et al. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell*. 1999;98(5):585-95.
198. Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development*. 2004;131(18):4467-76.
199. Wu J, Mlodzik M. The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev Cell*. 2008;15(3):462-9.
200. Chen WS, Antic D, Matis M, Logan CY, Povelones M, Anderson GA, et al. Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell*. 2008;133(6):1093-105.
201. Lindqvist M, Horn Z, Bryja V, Schulte G, Papachristou P, Ajima R, et al. Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 3):472-83.
202. Casal J, Lawrence PA, Struhl G. Two separate molecular systems, Dachshous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity. *Development*. 2006;133(22):4561-72.
203. Ma D, Yang CH, McNeill H, Simon MA, Axelrod JD. Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature*. 2003;421(6922):543-7.
204. Lawrence PA, Struhl G, Casal J. Planar cell polarity: one or two pathways? *Nat Rev Genet*. 2007;8(7):555-63.
205. Wu J, Mlodzik M. A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. *Trends Cell Biol*. 2009;19(7):295-305.

206. Gubb D, Garcia-Bellido A. A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*. 1982;68:37-57.
207. Collier S, Gubb D. *Drosophila* tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. *Development*. 1997;124(20):4029-37.
208. Wu G, Huang X, Hua Y, Mu D. Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural [correction of neural] tube defects. *J Biomed Sci*. 2011;18:66.
209. Strutt D, Strutt H. Differential activities of the core planar polarity proteins during *Drosophila* wing patterning. *Dev Biol*. 2007;302(1):181-94.
210. May-Simera HL, Kai M, Hernandez V, Osborn DP, Tada M, Beales PL. Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol*. 2010;345(2):215-25.
211. McNeill H. Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(2):a003376.
212. Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet*. 2008;42:517-40.
213. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, et al. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):1010-5.
214. Heydeck W, Zeng H, Liu A. Planar cell polarity effector gene Fuzzy regulates cilia formation and Hedgehog signal transduction in mouse. *Dev Dyn*. 2009;238(12):3035-42.
215. Gray RS, Abitua PB, Wlodarczyk BJ, Szabo-Rogers HL, Blanchard O, Lee I, et al. The planar cell polarity effector Fuz is essential for targeted membrane trafficking, ciliogenesis and mouse embryonic development. *Nat Cell Biol*. 2009;11(10):1225-32.
216. Park TJ, Haigo SL, Wallingford JB. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat Genet*. 2006;38(3):303-11.
217. Yen WW, Williams M, Periasamy A, Conaway M, Burdsal C, Keller R, et al. PTK7 is essential for polarized cell motility and convergent extension during mouse gastrulation. *Development*. 2009;136(12):2039-48.
218. Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature*. 2003;423(6936):173-7.
219. Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, Schekman R, et al. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):41-6; sup pp 1-8.
220. Wansleben C, Feitsma H, Montcouquiol M, Kroon C, Cuppen E, Meijlink F. Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development*. 2010;137(7):1067-73.
221. Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, et al. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*. 2000;405(6782):76-81.
222. Paudyal A, Damrau C, Patterson VL, Ermakov A, Formstone C, Lalanne Z, et al. The novel mouse mutant, chuzhoi, has disruption of Ptk7 protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Dev Biol*. 2010;10:87.

223. Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J, Shi D. Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development*. 2000;127(14):3091-100.
224. Courbard JR, Djiane A, Wu J, Mlodzik M. The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors. *Dev Biol*. 2009;333(1):67-77.
225. Zeitler J, Hsu CP, Dionne H, Bilder D. Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol*. 2004;167(6):1137-46.
226. Zarbalis K, May SR, Shen Y, Ekker M, Rubenstein JL, Peterson AS. A focused and efficient genetic screening strategy in the mouse: identification of mutations that disrupt cortical development. *PLoS Biol*. 2004;2(8):E219.
227. Stottmann RW, Moran JL, Turbe-Doan A, Driver E, Kelley M, Beier DR. Focusing forward genetics: a tripartite ENU screen for neurodevelopmental mutations in the mouse. *Genetics*. 2011;188(3):615-24.
228. Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, et al. Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci*. 2006;26(19):5265-75.
229. Puvirajesinghe TM, Borg JP. Neural tube defects: from a proteomic standpoint. *Metabolites*. 2015;5(1):164-83.
230. Robinson A, Escuin S, Doudney K, Vekemans M, Stevenson RE, Greene ND, et al. Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis. *Hum Mutat*. 2012;33(2):440-7.
231. Lei Y, Zhu H, Duhon C, Yang W, Ross ME, Shaw GM, et al. Mutations in planar cell polarity gene SCRIB are associated with spina bifida. *PLoS One*. 2013;8(7):e69262.
232. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):562-71.
233. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991;251(5000):1451-5.
234. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*. 1994;107 ( Pt 12):3655-63.
235. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*. 1997;138(1):181-92.
236. Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci*. 1997;110 ( Pt 8):1013-22.
237. Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni MJ, Arsanto JP, Ginestier C, et al. Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene*. 2005;24(27):4330-9.
238. Legouis R, Gansmuller A, Sookhareea S, Boshier JM, Baillie DL, Labouesse M. LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*. 2000;2(7):415-22.
239. Su WH, Mruk DD, Wong EW, Lui WY, Cheng CY. Polarity protein complex Scribble/Lgl/Dlg and epithelial cell barriers. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:149-70.

240. Djiane A, Yogev S, Mlodzik M. The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Cell*. 2005;121(4):621-31.
241. Lee OK, Frese KK, James JS, Chadda D, Chen ZH, Javier RT, et al. Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat Cell Biol*. 2003;5(11):987-93.
242. Dollar GL, Weber U, Mlodzik M, Sokol SY. Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled. *Nature*. 2005;437(7063):1376-80.
243. Roszko I, Sawada A, Solnica-Krezel L. Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(8):986-97.
244. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*. 2007;4(3):251-6.
245. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 2004;33(2):95-103.
246. Potter H, Heller R. Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Immunol*. 2017;117:10 5 1- 5 9.
247. Mehla J, Caufield JH, Sakhawalkar N, Uetz P. A Comparison of Two-Hybrid Approaches for Detecting Protein-Protein Interactions. *Methods Enzymol*. 2017;586:333-58.
248. Jurkiewicz D, Michalec K, Skowronek K, Nalecz KA. Tight junction protein ZO-1 controls organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) in a protein kinase C-dependent way. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864(5):797-805.
249. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):660-9.
250. Yates LL, Schnatwinkel C, Murdoch JN, Bogani D, Formstone CJ, Townsend S, et al. The PCP genes *Celsr1* and *Vangl2* are required for normal lung branching morphogenesis. *Hum Mol Genet*. 2010;19(11):2251-67.
251. Ahmed SM, Macara IG. The Par3 polarity protein is an exocyst receptor essential for mammary cell survival. *Nat Commun*. 2017;8:14867.
252. Wasserscheid I, Thomas U, Knust E. Isoform-specific interaction of Flamingo/Starry Night with excess Bazooka affects planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Dev Dyn*. 2007;236(4):1064-71.
253. Zigman M, Trinh le A, Fraser SE, Moens CB. Zebrafish neural tube morphogenesis requires Scribble-dependent oriented cell divisions. *Curr Biol*. 2011;21(1):79-86.
254. Castelli M, Boca M, Chiaravalli M, Ramalingam H, Rowe I, Distefano G, et al. Polycystin-1 binds Par3/aPKC and controls convergent extension during renal tubular morphogenesis. *Nat Commun*. 2013;4:2658.
255. McNeill H. Planar polarity: location, location, location. *Curr Biol*. 2002;12(13):R449-51.
256. Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, et al. Dereglulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell*. 2008;135(5):865-78.
257. Elsum IA, Humbert PO. Localization, not important in all tumor-suppressing properties: a lesson learnt from scribble. *Cells Tissues Organs*. 2013;198(1):1-11.

258. Ando-Akatsuka Y, Yonemura S, Itoh M, Furuse M, Tsukita S. Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. *J Cell Physiol.* 1999;179(2):115-25.
259. Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 18):3565-73.
260. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors. *Anat Rec (Hoboken).* 2008;291(5):577-85.
261. Pandey JP, Smith DS. A Cdk5-dependent switch regulates Lis1/Ndel1/dynein-driven organelle transport in adult axons. *J Neurosci.* 2011;31(47):17207-19.
262. Schmoranz J, Fawcett JP, Segura M, Tan S, Vallee RB, Pawson T, et al. Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Curr Biol.* 2009;19(13):1065-74.
263. Gho M, Schweisguth F. Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature.* 1998;393(6681):178-81.
264. Bellaiche Y, Gho M, Kaltschmidt JA, Brand AH, Schweisguth F. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol.* 2001;3(1):50-7.
265. Stolk L, Bouwland-Both MI, van Mil NH, Verbiest MM, Eilers PH, Zhu H, et al. Epigenetic profiles in children with a neural tube defect; a case-control study in two populations. *PLoS One.* 2013;8(11):e78462.



## **Contribution des Co-auteurs**

### ***Scribble1* plays an important role in the pathogenesis of neural tube defects through its mediating effect of Par-3 and Vangl1/2 localization**

Fares Kharfallah<sup>1</sup>, Marie Claude Guyot<sup>1</sup>, Abdul Rahman El Hassan<sup>1</sup>, Redouane Allache<sup>1</sup>, Elisa Merello<sup>2</sup>, Patrizia De Marco<sup>2</sup>, Graziella Di Cristo<sup>1</sup>, Valeria Capra<sup>2</sup> and Zoha Kibar<sup>1,\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, CHU Sainte Justine Research Center, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1C5, Canada and <sup>2</sup>U.O. Neurochirurgia, Istituto Giannina Gaslini, Genova 16147, Italy

\*To whom correspondence should be addressed at: Department of Neurosciences, CHU Sainte Justine Research Center, University of Montreal, 3175 Cote-Sainte-Catherine, Room A711, Montreal, QC H3T 1C5, Canada. Tel: +15143454931; Fax: +15143454801; Email: zoha.kibar@recherche-ste-justine.qc.ca

**Fares Kharfallah**

Planification de toutes les expériences sous la supervision de Dr. Zoha Kibar.

Réalisations de toutes les expériences décrites dans le manuscrit.

Interprétation des résultats.

Les analyses statistiques de toutes les expériences.

La conception et la préparation des figures et des tableaux du manuscrit.

La rédaction du manuscrit, sous la supervision de Dr. Zoha Kibar

**Marie Claude Guyot**

Entretien et phénotypage de souris

Extraction d'ADN et génotypage de souris

**Abdul Rahman El Hassan**

La participation dans les expériences de Western blot sur Par3 et l'immunofluorescence sur Lgl2.

**Redouane Allache**

Clonage de hVANGL2-Cterm-pGBKT7a afin de l'utiliser dans les expériences de Y2H.

**Graziella Di Cristo**

Support scientifique et technique dans les expériences d'immuno-histochimie

**Valeria Capra, Patrizia De Marco et Elisa Merello:**

Le recrutement du groupe de 391 patients au Centre Spina Bifida de l'hôpital Gaslini en Gènes, Italie ainsi que 344 contrôles italiens inclus dans cette étude.

**Zoha Kibar:**

La conception du projet et la supervision des expériences décrites dans l'article. Le soutien scientifique, technique et matériel pour le déroulement et la réalisation des expériences.

La rédaction du manuscrit.

Cet article a été déjà publiée *Human Molecular Genetics*, Volume 26, Issue 12, 15 June 2017, Pages 2307–2320, (<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx122>)