

Université de Montréal

Études génétiques moléculaires du gène de la polarité planaire *SCRIBBLE1* chez les anomalies du tube neural

par

Kharfallah Fares

Département de Sciences Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de M.Sc
en Biochimie, option Génétique moléculaire

Mai, 2012

© Kharfallah Fares, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Études génétiques moléculaires du gène de la polarité planaire *SCRIBBLE1* chez les anomalies du tube neural

Présenté par :
Kharfallah Fares

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Muriel Aubry
Président-rapporteur

Dr. Zoha Kibar
Directeur de recherche

Dr. Andrea Richter
Membre du jury

Résumé

Les anomalies du tube neural (ATN), incluant l'anencéphalie et le spina-bifida, représentent un groupe de malformations congénitales très fréquentes chez l'homme. Ces anomalies sont causées par un défaut partiel ou complet de la fermeture du tube neurale au cours de l'embryogenèse. Les ATN ont une étiologie complexe et multifactorielle impliquant des facteurs environnementaux et génétiques. La voie de signalisation non-canonique du Frizzled (Fz)/Dishevelled (Dvl) contrôle la polarité cellulaire planaire (PCP) et le processus morphogénétique appelé l'extension convergente qui est essentiel pour la gastrulation et la fermeture du tube neural. Très important, des mutations des gènes de cette voie étaient fortement associées aux ATN chez la souris et l'humain. *Scribble* est un gène de la voie PCP qui cause une sévère ATN chez la souris Circletail. Notre étude vise à analyser le rôle de *SCRIBBLE1* dans les ATN humains par des analyses de séquence de son cadre de lecture et ses jonctions exon-introns. Notre étude comporte 396 patients recrutés au Centre Spina Bifida de l'hôpital Gaslini en Gènes, Italie et 83 patients recrutés au Centre Spina Bifida de l'hôpital Sainte Justine. Les patients sont affectés par plusieurs formes d'ATN. Nous avons identifié neuf mutations rares et non synonymes chez 10 patients, p.Asp93Ala (c. 435G>A), p.Gly145Arg (c. 278A>C), 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). Cinq mutations, p.Gly263Ser, p.Pro649His, p.Gln808His, p.Arg1150Gln, p.Thr1422Met, étaient absentes dans les contrôles analysés et prédites d'être pathogéniques *in silico*. Cette étude montre que des mutations rares dans *SCRIB1* pourraient augmenter le risque des ATN dans une fraction des patients. L'identification des gènes prédisposant aux ATN nous aidera à mieux comprendre les mécanismes pathogéniques impliqués dans ces maladies.

Mots-clés : *SCRIBBLE1*, anomalies du tube neural, polarité planaire cellulaire, extension convergente.

Abstract

Neural tube defects (NTDs), including anencephaly and spina bifida, represent a group of very common birth defects in humans. These anomalies are caused by a partial or complete failure of neural tube closure during embryogenesis. NTDs have a multifactorial etiology involving environmental and genetic factors. The non-canonical signaling pathway Frizzled (Fz) / Dishevelled (Dvl) controls the planar cell polarity (PCP) and the morphogenetic process called convergent extension (CE) which is essential for gastrulation and neural tube closure. Importantly, mutations in genes of this pathway were strongly associated with NTDs in mice and humans. *Scribble* is a PCP gene that causes a severe NTD mouse Circling. Scribble binds to another PCP protein, Stbm / Vang, and they cooperate together for the stability of the PCP pathway. Our study aims at investigating the role of *SCRIBBLE1* in human NTDs by sequence analyses of its open reading frame and exon-intron junctions. The cohort included in this study consisted of 396 patients recruited at the Spina Bifida Centre of Gaslini Hospital in Genoa, Italy, and 83 patients recruited at the Spina Bifida Center of the Sainte Justine Hospital, Montreal, Canada. Patients were affected by several forms of NTDs. We identified nine non-synonymous and rare mutations in 10 patients: p.Asp93Ala (c. 435G>A), p.Gly145Arg (c. 278A>C), 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) and p.Thr1422Met (c. 4266C>T). Five of those mutations, p.Gly263Ser, p.Pro649His, p.Gln808His, p.Arg1150Gln, p.Thr1422Met, were absent in all controls analyzed and were predicted to be pathogenic using bioinformatics. Our study demonstrates that rare mutations in *SCRIB1* could predispose to NTDs in a fraction of patients. The identification of genes that predispose to ATN will help us better understand the pathogenic mechanisms involved in these diseases.

Keywords : *SCRIBBLE1*, neural tube defects, planar cell polarity, convergent extension

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Anatomie de système nerveux central.....	1
1.2. Développement du système nerveux central.....	1
1.2.1. Gastrulation.....	2
1.2.2. Neurulation.....	3
1.2.2.1. La neurulation primaire.....	3
1.2.2.2. La neurulation secondaire.....	10
1.3. Les malformations de tube neural (ATN).....	12
1.3.1. Les formes cliniques des ATN.....	12
1.3.1.1. Les ATN ouvertes :.....	12
1.3.1.2. Les ATN fermées.....	13
1.3.2. Étiologie des ATN.....	15
1.3.2.1. Les facteurs environnementaux.....	15
1.3.2.2. Les facteurs génétiques.....	16
1.4. La polarité cellulaire planaire (PCP).....	19
1.4.1. Définition.....	19
1.4.2. La PCP chez la drosophile.....	19
1.4.2.1. La cassette <i>Frizzled/Flamingo</i>	21
1.4.2.2. La cassette <i>Fat/Dachsous/Four-jointed</i>	23
1.4.2.3. Les effecteurs et les effets de la voie PCP.....	23
1.4.3. La PCP chez les vertébrés.....	25
1.4.3.1. La voie PCP et la neurulation.....	25
1.4.3.2. La voie PCP et l'orientation des cils dans l'oreille interne.....	28
1.4.3.3. La voie PCP et la ciliogénèse.....	28
1.5. La voie canonique Wnt/Fz.....	29
1.6. La voie Wnt/Calcium.....	30
1.7. Des nouveaux gènes de la voie PCP chez les vertébrés.....	31
1.7.1. Le gène <i>SCRIBBLE1 (SCRIB1)</i>	32

1.7.2. L'expression de <i>Scribble1</i>	33
1.7.3. Rôle de <i>Scribble1</i> dans la gastrulation et migration des neurones.....	34
1.7.4. <i>Scribble1</i> et la voie PCP.....	35
1.7.5. <i>Scribble1</i> et la polarité apico basale.....	36
2. Projet de Recherche.....	38
2.1. Problématique	38
2.2. Hypothèses et objectives.....	38
2.3. Pertinences et Retombés	39
2.4. Matériels et Méthodes.....	39
2.4.1. Patients et contrôles	39
2.4.2. Séquençage et Génotypage	42
2.4.3. Outils Bioinformatiques	44
2.4.4. Analyses statistiques	45
2.5. Résultats	45
2.5.1. Mutations rares < 1% dans <i>SCRIB1</i> dans les ATN.....	45
2.5.2. Études d'association.....	49
3. Discussion	50
3.1. Effet potentiel des mutations identifiées dans les domaines PDZ de <i>SCRIB1</i>	52
3.2. Effet potentiel des mutations identifiées dans le domaine LRR de <i>SCRIB1</i>	53
3.3. Des études futures de validation fonctionnelle des mutations de <i>Scrib1</i>	54
3.4. Les animaux comme modèles puissants pour les études génétiques des ATN humains	55
4. Futures directions et défis	56

Liste des tableaux

Tableau 1 : <i>Caractéristiques des 473 patients atteints par les ATN inclus dans notre étude</i>	40
Tableau 2 : <i>Amorces pour amplifier les différents exons de SCRIB1</i>	42
Tableau 3 : <i>Mutations rares (<1%) identifiées dans SCRIB1 chez les patients atteints des ATN</i>	46
Tableau 4. <i>Les fréquences allyliques et génotypiques chez les patients ATN et les Contrôles</i>	48

Liste des figures

Figure 1 : <i>Schéma présentatif du phénomène de l'extension convergente.....</i>	<i>5</i>
Figure 2 : <i>Schéma présentatif du phénomène de la constriction apicale.....</i>	<i>6</i>
Figure 3 : <i>Schéma présentatif du phénomène de fermeture de tube neural.....</i>	<i>7</i>
Figure 4 : <i>Schéma présentatif des sites d'initiation multiple et séquentielle de la fermeture du tube neural chez l'humain(B) et chez la souris(A).....</i>	<i>10</i>
Figure 5 : <i>Schéma présentatif de la neurulation secondaire.....</i>	<i>11</i>
Figure 6 : <i>Schéma présentatif de la voie PCP avec les différentes interactions entre les gènes ainsi que les effecteurs.....</i>	<i>20</i>
Figure 7 : <i>Schéma présentatif des différentes interactions des protéines de la voie PCP.....</i>	<i>21</i>
Figure 8 : <i>Schéma présentatif de (a) La voie de la polarité planaire cellulaire, (b) La voie canonique et (c) La voie Wnt/Calcium.....</i>	<i>30</i>
Figure 9 : <i>Schéma présentatif de la structure générale de Scrib1.....</i>	<i>32</i>
Figure 10 : <i>Schéma présentatif montre le role de Scribble1 au sein de la polarité apico-basale.....</i>	<i>37</i>
Figure 11 : <i>Schéma présentatif de la protéine Scrib1 montrant la localisation des mutations. Les mutations absentes chez les contrôles sont notées en gras.....</i>	<i>47</i>

Figure 12 : *Alignement partiel des 5 mutations identifiées chez les différents patients (absents chez les contrôles) avec 7 autres séquences de SCRIBBLE1.....48*

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
aPKC	Protéine kinase atypique C
ARN	Acide ribonucléique
ATN	Anomalies du tube neural
Bbs	Syndrome de Bardet-Biedl
BMP	Protéine morphogénétique osseuse
Ca²⁺	Calcium
CAMKII	Kinase calcium/calmodulin dépendante II
CE	Extension convergente
Crc	Circletail
Dg	Diego
Ds	Dachsous
Dvl/Dsh	Dishevelled
Fj	Four-jointed
Ft	Fat
Fy	Fuzzy
Fz	Frizzled
GFP	Green fluorescent protein
GSK3β	Glycogène-synthase-kinase 3 β
Int	Inturned
JNK	Kinase Jun
LAP	Leucine-rich repeat and PDZ domain
LCS	Liquide cérébro-spinal
LEF	Lymphoid Enhancer-binding factor

Lp	Loop-tail
MTHFR	5,10-methylene-tetrahydrofolate réductase
PCP	Polarité planaire cellulaire
pk	prickle - spiny legs
PKC	Protéine kinase C
PTK7	Protéine tyrosine kinase
Rho	Ras homolog
ROCK	Kinase associée à Rho
Scrib	Scribble
Shh	Sonic Hedgehog
SNP	Polymorphisme d'un nucléotide simple
stan/fmi	Starry night/Flamingo
Tbx	T-box transcription factor
TCF	T-cell factor
Vang/Stbm	Van gogh/Strabismus
VANGL	Vang-like
Wnt	Wingless
Beat	β -caténine

À mes très chers parents

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier ma directrice de recherche, la Dre Zoha Kibar, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné toute sa confiance, ainsi de m'avoir donné tous son savoir dans le domaine de la génétique. Je remercie également les autres étudiants de mon laboratoire pour leurs conseils et soutiens techniques, particulièrement Redouane Allache et Marie-Claude Guyot.

Merci à mes parents auxquels je suis très fiers d'être leurs fils et aux autres membres de ma famille, pour m'avoir encouragé à poursuivre mes objectifs et pour m'avoir aimé et soutenu tout au long de ma vie. Un gros merci à mon ami *Nadjib LAKHLEF*, que je considère comme mon frère, pour son soutien incomparable et pour tous les beaux moments passés ensemble en France ou ici à Montréal.

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, pour me donner toujours le sourire et pour m'aider à garder la force et l'optimisme dans les moments difficiles. Et surtout, merci pour son amour. Et bien sûr, je n'oublie pas mon ange âgé d'un mois et demi **Djana**.

Enfin, un grand merci pour tous les patients des anomalies de tube neural qui ont participé à cette étude.

1. INTRODUCTION

1.1. Anatomie de système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est le système responsable de toutes les activités volontaires. Il intervient dans le réglage de toutes les fonctions en relation entre l'Homme et son entourage (l'environnement). Il est composé de **l'encéphale** et la moelle épinière.

L'encéphale est protégé par une barrière osseuse qu'on appelle la boîte crânienne. Cette unité représente 2% du poids corporel total et consomme une grande partie de l'oxygène qui rentre dans l'organisme (20% de l'oxygène qui rentre dans le corps). Cette structure est constituée du **cerveau** qui se compose de deux hémisphères, chacune d'entre eux se forme de quatre lobes : frontal, pariétal, occipital et temporal. La deuxième partie de l'encéphale est **le cervelet** qui est situé dans la concavité de l'os occipital et rattaché à la moelle épinière par **le tronc cérébral**. Ce dernier se situe dans la fosse postérieure du crâne, sous le cerveau et en avant du cervelet, et se compose de deux éléments importants. **Le bulbe rachidien** qui se divise en deux parties: la première se situe à l'intérieur du crâne, et la deuxième se localise dans la colonne vertébrale, qui assure sa protection par les vertèbres. Le deuxième élément du bulbe rachidien contient les **douze paires de nerfs crâniens** qui interviennent dans l'innervation de la tête.

La moelle épinière est la partie qui se loge dans le canal rachidien ménagé dans les vertèbres. La moelle épinière est un tube cylindrique qui mesure entre 45 et 50 cm de long, et de 1 cm à peu près de diamètre. 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 qui se ramifient dans le tronc et dans les membres. Chaque nerf rachidien naît par deux racines au niveau de la moelle, l'une antérieure centrifuge et l'autre postérieure centripète.

1.2. Développement du système nerveux central

Les premiers signes de la formation du SNC commencent très tôt au cours du développement de l'embryon (à partir de la troisième semaine du développement). Ce

développement se divise en deux grandes parties essentielles qui sont la **gastrulation** et la **neurulation**.

1.2.1. Gastrulation

Au début de ces jours, l'embryon humain est constitué de plusieurs couches cellulaires : l'**ectoderme** qui se situe à l'extérieure et qui va donner naissance après au système nerveux de l'embryon ainsi qu'à son épiderme, le **mésoderme** qui se situe entre l'ectoderme et l'endoderme et qui va donner naissance aux os du squelette et aux muscles et l'**endoderme** qui est la couche la plus interne qui va donner à la fin du développement le foie, les viscères ainsi que les poumons.

Au cours de la deuxième semaine du développement, on assiste au déclenchement de la **gastrulation**, dans laquelle les trois couches commencent à se former. Le premier événement est l'apparition d'un disque formé de l'épiblaste et de l'hypoblaste entre lesquels on va voir l'apparition du mésoderme. L'apparition de la ligne primitive aux jours 14-15 sur la ligne médiane dorsale de l'embryon va donner une symétrie bilatérale du disque, ainsi qu'une orientation caudo-crâniale de son axe. Cette ligne est formée des cellules épiblastiques omnipotentes. Ces cellules épiblastiques vont ensuite migrer par le nœud de Hensen formé à l'extrémité crâniale de la ligne primitive et vont permettre la formation des lèvres de la ligne primitive, qui à leur tour vont permettre aux cellules épiblastiques de s'invaginer 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 cellules qui s'invaginent à travers la ligne primitive vont rester sur la ligne médiane et vont donner des structures mésodermiques axiales, le mésoderme préchordal, qui va donner la future tête de l'embryon et le canal chordal tout le long du reste du corps de l'embryon. Les cellules mésodermiques vont former aussi la notochorde qui aura un rôle inducteur pour l'ectoderme neural, tandis que les cellules épiblastiques qui ingressent vont

remplacer l'hypoblaste pour devenir le future endoderme. Finalement, les cellules qui restent au niveau de l'épiblaste formeront l'ectoderme.^{1,2,3}

1.2.2. Neurulation

La **neurulation** mène à la formation de tube neural, qui donnera naissance au cerveau et à la moelle épinière. Chez l'humain, la neurulation se déroule en deux séquences qui auront lieu à des niveaux distinctes au long de l'axe rostrocaudal de l'embryon. **La neurulation primaire** (semaines 3-4) est responsable de la formation du tube neural primitif, avec une partie crâniale qui formera les deux hémisphères cérébraux, le tronc cérébral ainsi que le cervelet, et une partie caudale qui conserve un aspect primitif et donne la moelle épinière. Cette première étape (la neurulation primaire) sera suivie par **la neurulation secondaire** (semaines 5-6) qui se déroule juste au niveau du bourgeon de la queue (dans la région caudale de l'embryon) et qui donnera naissance à l'extrémité caudale de la moelle épinière, incluant la plupart des régions sacrale et coccygienne.³

1.2.2.1. La neurulation primaire

La **neurulation primaire** survient en réponse à des facteurs de croissance solubles sécrétés par la notocorde. Les cellules ectodermiques sont induites pour former le neuroectoderme par l'intervention de plusieurs signaux. L'ectoderme envoie et reçoit des signaux qui sont des protéines morphogéniques osseuses BMP (bone morphogenetic proteins) et les cellules cibles de ces BMP se développent en épiderme en inhibant en même temps la formation du neuroectoderme. Les cellules qui ne reçoivent pas les signaux des BMP à cause des effets des signaux inhibiteurs comme Chordine, Noggin et Follistatine émis par l'organisateur de Spemann vont se transformer en d'autre type de cellules qui vont former le neuroectoderme. En plus de ces facteurs, autres facteurs s'interviennent 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

Après l'apparition de la plaque neurale au 19^e jour, un allongement de cette dernière se fera en deux formes : large à l'extrémité céphalique où elle est à l'origine du futur cerveau et étroit dans la région spinale, sous forme d'un épaissement médio-sagittal de l'ectoblaste. Ce phénomène qui permet ces deux derniers changements morphologiques est connu sous le nom de l'extension convergente (CE). La CE est le processus par lequel les tissus d'un embryon sont restructurés pour être capables de converger (forme étroite) le long d'un axe et de s'étendre (forme allongée) le long de l'autre axe perpendiculaire de l'embryon par les mouvements des cellules embryonnaires (Figure 1). Au cours de CE, les cellules s'allongent sur leur axe medio-latéral et donnent naissance à des allongements (des protrusions) cellulaires qui leur permettent de migrer et s'intercaler avec les cellules avoisinantes. Toutes ces différenciations morphologiques et migratoires de ces cellules vont faire en sorte que le tissu va converger vers la ligne médiane et en même temps va s'allonger le long de l'axe antéro-postérieur; ce qui va générer un axe allongé et une largeur plus étroite de la plaque neurale.

La CE est contrôlée par la voie non-canonique du Wingless/Frizzled (Wnt/Fz), ou la voie de la polarité planaire cellulaire (PCP, planar cell polarity).^{4, 5} Les mécanismes de la CE ne sont pas dépendants des tissus environnants. Selon l'expérience de Keller en 1985, lorsque des nouveaux explants de mésoderme ou de tissu neural de Xénope sont mis en culture, le tissu est capable de s'affiner et de s'étendre de façon autonome.⁶

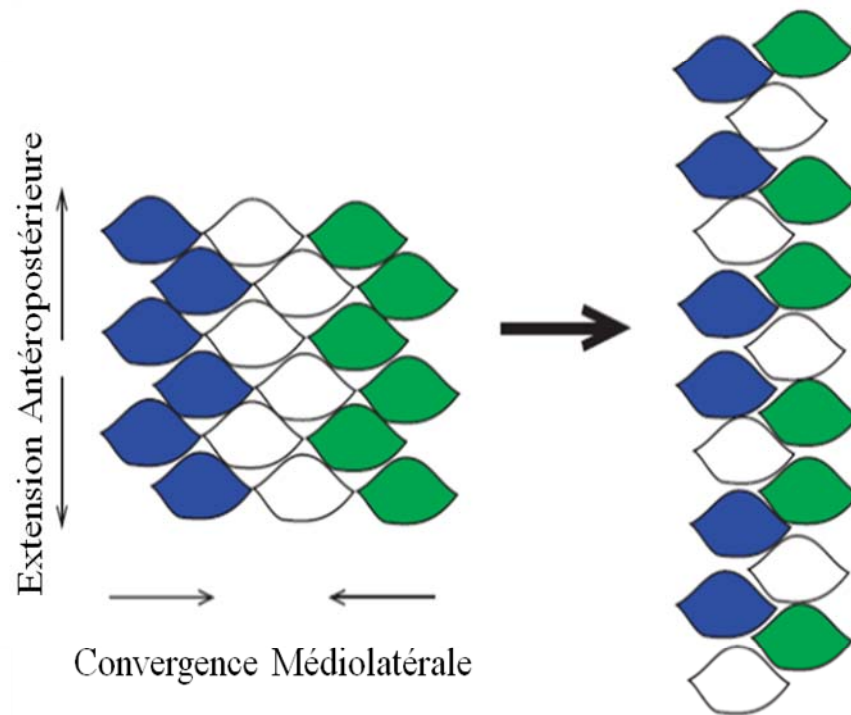


Figure 1 : Schéma présentatif du phénomène de l'extension convergente. Adaptée de Kibar et al., 2007. ¹⁴⁵

En même temps que le phénomène d'extension et de convergence, le pliage de la plaque neurale est entraîné par un actif changement de forme des cellules ; ces derniers se transformeront de forme cylindrique en forme de coin ce qui va conduire à une diminution dans leur diamètre. Ce processus, appelé la constriction apicale (**Figure 2**), est observé dans le pliage des feuilles des cellules, comme dans la morphogenèse de plusieurs espèces animales.⁴

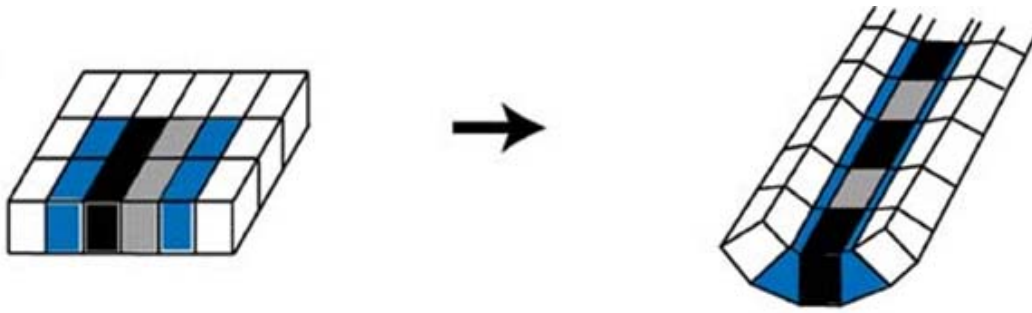


Figure 2 : Schéma représentatif du phénomène de la constriction apicale. Adapté de Wallingford JB, 2005.⁴

Peu d'études ont été faites sur ce processus chez les vertébrés au cours des dernières décennies. Ce changement de forme des cellules a été surtout examiné dans la drosophile des fruits. Plusieurs théories étaient supposées pour comprendre ce phénomène, mais la plus connue est que ces cellules cylindriques vont se rétrécir dans leurs surfaces apicales, à cause de l'effet d'un phénomène de contractions sous-membranaires, semblable à ce qui se passe dans les myocytes. Cette théorie est supportée par la démonstration que les régions apicales des cellules de l'épithélium neuronal sont enrichies en actine.⁴ Plusieurs expériences étaient faites pour confirmer cette théorie, tel que le traitement des embryons de souris avec cytochalasine D (un inhibiteur des microfilaments d'actine) qui a conduit à l'inhibition de la fermeture des plis neuraux craniaux⁷. Les mêmes observations étaient obtenues suite à la perte de fonction des diverses protéines associées aux filaments d'actine, comme Shroom, Vinculin, Mena/profilin et p190RhoGAP.⁸

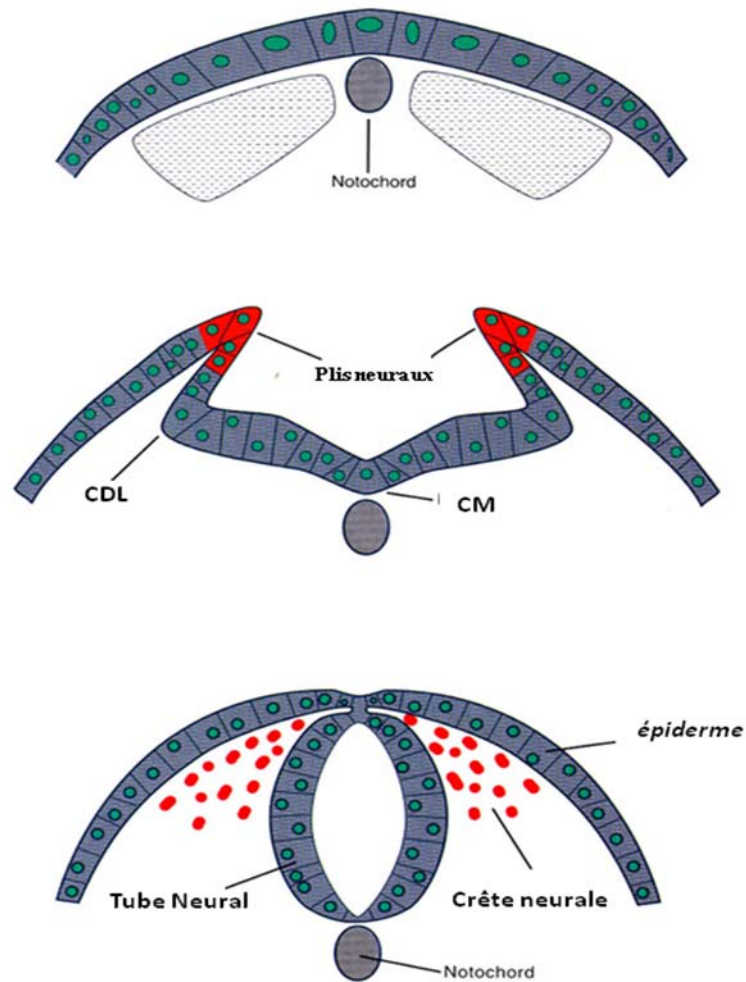


Figure 3 : Schéma présentatif du phénomène de fermeture de tube neural. Adaptée de Copp AJ et al., 2003.¹⁶

Tous ces changements morphologiques mènent à la formation des invaginations et des pliages au niveau de la plaque neurale, ce qui conduit à la formation de la gouttière neurale, où les bords de la plaque neurale vont se lever pour former des bourrelets neuraux qui délimitent cette gouttière neurale. Ces bourrelets sont le résultat d'une paire de points d'articulation dorsolatérales (les charnières dorsolatérales ou CDL) situés sur les côtés latéraux des plis neuraux (Figure 3). Un deuxième point d'articulation, la charnière médiane (CM), existe aussi juste au-dessus de la notochorde et sur la longueur de l'axe

rostrocaudal (Figure 3). Plusieurs expériences ont montré que la suppression de la notochorde empêche la formation de la CM, ce qui nous permet de conclure que la formation de ce point nécessite l'intervention de signaux provenant de la notochorde.⁹ Mais aussi l'intervention d'un autre signal (BMP) est aussi nécessaire pour la formation de la CM ainsi que pour la polarité des cellules épithéliales pour qu'elles puissent former le futur tube neurale.¹⁰

Un signal de la famille BMP, qui est BMP2, intervient aussi dans la formation des points d'articulation dorsolatérale ou CDL, par l'équilibre avec un autre signal morphogène qui est Sonic hedgehog (Shh). Cet équilibre dans la signalisation a été mis en évidence par des études chez les souris.⁹ L'expression de *BMP2* se fait au niveau de l'ectoderme dorsal. Le signal de BMP2 va stimuler l'activation de transcription d'un autre gène *NOG*, ce qui va produire la protéine Noggin tous les niveaux de l'axe antéropostérieure embryonnaire. BMP2 inhibe la formation des points d'articulation dorsolatérale et Noggin est un inhibiteur de BMP2, ce qui favorise la formation des articulations dorsolatérales. Un autre signal qui intervient aussi au niveau de ce stade est Shh. Ce dernier est exprimé par la notochorde et a un rôle inhibiteur pour Noggin. Au niveau de la région proche de notochorde, une grande concentration de Shh sera présente, ce qui conduira à l'inhibition de la formation des articulations dorsolatérales, tandis que dans la région loin de notochorde, on remarque une diminution ou une absence totale de Shh, ce qui favorise la formation des articulations dorsolatérales^{9, 11}. En résumant, toute augmentation du niveau d'expression de Shh empêche la formation des plis dorsolatérales résultant dans l'apparition de la spina bifida qui se manifeste par l'ouverture de tube neurale dans son extrémité caudale, tandis que la perte de fonction de Shh va entraîner la formation prématurée des plis dorsolatérales mais avec la fermeture du tube neural sur toute sa longueur.¹²

Les plis neuraux aux bords de la gouttière neurale vont se rapprocher puis s'accoler dès le 28e jour pour délimiter le tube neural sur la ligne médiane dorsale (Figure 3).

Plusieurs mécanismes interviennent pour finir la fusion de ces plis : le fusionnement du neuroépithélium et la fusion de l'ectoderme de surface, suivi par la distinction des deux tissus et enfin la séparation de l'ectoderme fusionné du tube neural et la différenciation ainsi que la migration des cellules des crêtes neurales entre ces structures.¹³ Plusieurs recherches en été faites pour mieux comprendre la nature et le mécanisme par lesquels le fusionnement des plis neuraux se fait. Depuis l'année 2000, on sait que les contacts cellulaires au niveau des lieux de fusionnement des deux plis se font sous le contrôle d'un récepteur tyrosine kinase Eph, ainsi que d'autres récepteurs activés à leurs tours par des protéases (Protease Activated Receptors - PAR) qui sont Par1 et Par2. Des études d'expression chez la souris ont montré qu'*Ephrin-A5* et son récepteur *EphA7* sont exprimés dans les cellules situées sur les bords des plis neuraux craniaux. Des autres études d'inactivation de gène ont aussi montré que la perte de fonction d'*Ephrin-A5* cause l'exencéphalie qui se manifeste par une absence de fermeture du tube neurale à l'extrémité antérieure (du cerveau) chez ces souris. On pourrait conclure que la réponse cellulaire à Ephrin-A5 est très importante pour le fusionnement des plis neuraux.¹⁴ Le double knock-out de *Par1* et *Par2* cause l'exencéphalie et la spina bifida et les knock-out des sous unités Gai, Gao, Gaz de la protéine hétérotrimérique G - qui joue un rôle intermédiaire pour les protéines Par1 et Par2 – causent la spina bifida. Au moment et à l'endroit de la fusion des plis neuraux, les protéines Par1 et Par2 sont exprimées au niveau des cellules de l'ectoderme couvrant le neuroépithélium. Malgré toutes ces études, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables pour cette fusion sont encore peu compris.¹⁵

La fermeture du tube neural se fait lorsque les plis neuraux s'adhèrent sur la ligne médio dorsale et a été bien étudiée chez la souris au cours de la neurulation primaire (Figure 4). Elle commence dans la région cervicale au niveau du rhombencéphale (point de fermeture 1), et continuera pour atteindre la région du futur cerveau et la région spinale. La région du futur cerveau se formera au niveau de deux points : la première se situe entre le prosencéphale et le mésencéphale (le point de fermeture 2), tandis que le deuxième point est situé à l'extrémité rostrale du prosencéphale (le point de fermeture 3). La neurulation primaire se finit par la fermeture du neuropore postérieur. Les points 1 et 3 de fermeture

étaient identifiés chez la souris d'une façon bien précise et bien constante. Le point 2 a une position variable chez la souris, et chez certaines souches les points 2 et 3 sont tellement proches qu'on ne peut même pas les distinguer. Ces études étaient faites chez la souris. Chez l'humain, les points de fermeture 1 et 3 étaient identifiés dans des embryons humains¹⁶. D'autres points de fermeture existent aussi (maximum cinq en totale).^{17, 18}

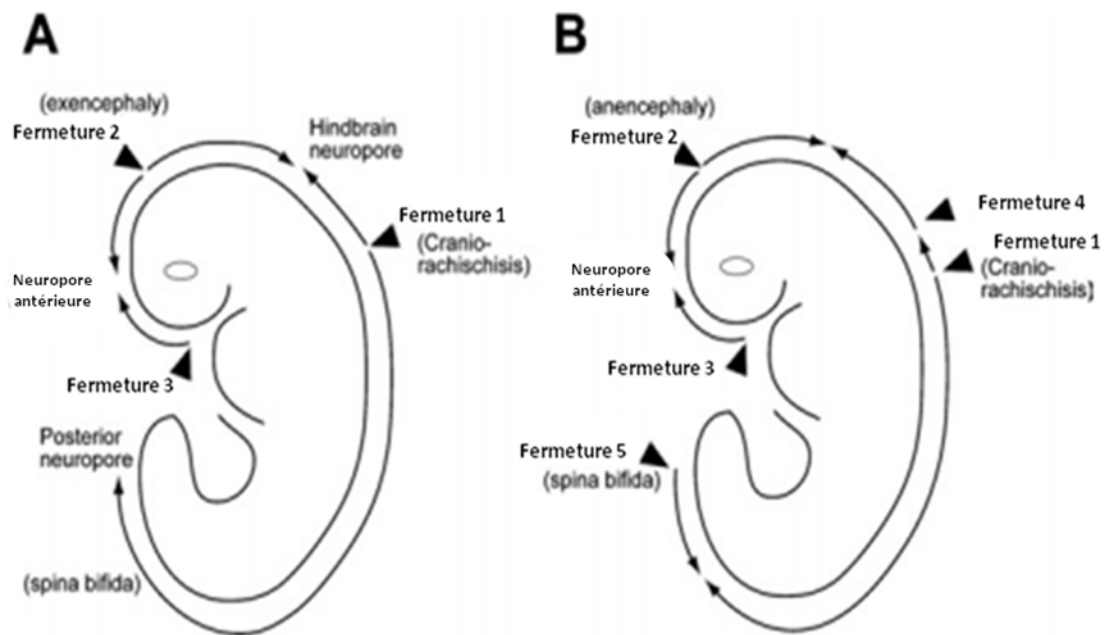


Figure 4 : Schéma présentatif des sites d'initiation multiple et séquentielle de la fermeture du tube neural chez l'humain(B) et chez la souris(A). Adaptée de Bassuk AG et Kibar, 2009.²²

1.2.2.2. La neurulation secondaire

Après la neurulation primaire, le deuxième stade de la neurulation est la neurulation secondaire. Cette dernière est une transformation de l'ectoderme de la région sous-chordale

pour devenir un tube neural primitif, qui touche le développement de la partie terminale de la moelle épinière. Une structure mésoblastique appelée l'éminence caudale sera à l'origine de la partie caudale du tube neural et de l'élongation de la moelle épinière. Au début de la neurulation secondaire, une structure sous forme d'un cordon va se former et qui sera plein au début de sa formation, ensuite une lumière s'unit au canal neural, finalement un neuroépithélium revêtira cette cavité centrale. Par cette canalisation, le tube neural sacro-caudale se forme dont la lumière est en continuité avec celle du tube neural primaire situé rostral (Figure 5).¹²

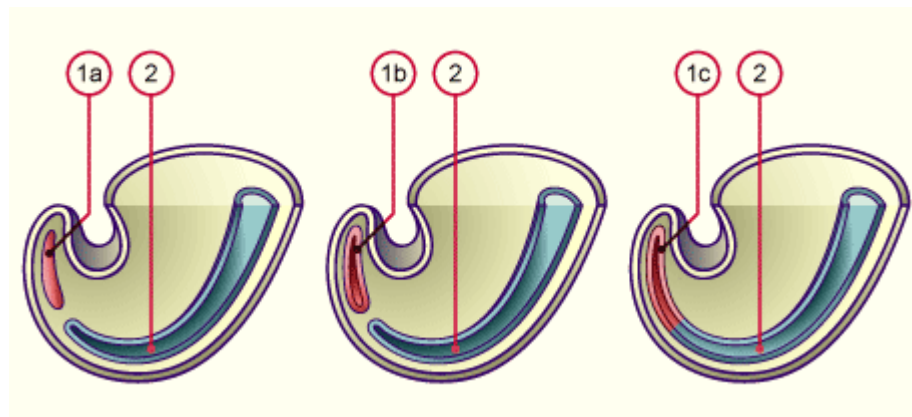


Figure 5 : Schéma présentatif de la neurulation secondaire.¹⁵⁸

1a; éminence caudale mésenchymateuse pleine

1b; éminence caudale creuse

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

2; tube neural

En résumé, la neurulation est un phénomène qui est composé de deux phases, la neurulation primaire et la neurulation secondaire. Le tube neural primaire se forme par le pliage et la formation des invaginations de la plaque neurale suivi par la fusion des plis. Le

segment caudal va générer l'éminence caudale, qui après sa canalisation, s'unit au canal neural et conduit à la formation de tube neural secondaire.¹⁹

1.3. Les malformations de tube neural (ATN)

Des défauts au niveau de la neurulation primaire ou secondaire conduisent à des anomalies de tube neural (ATN). Les ATN sont causées par un défaut partiel ou complet de la fermeture du tube neural au cours de l'embryogenèse. Elles représentent le groupe le plus commun et le plus sévère des malformations du SNC, touchant 1-2 enfant par 1000 naissances et présentant la cause majeure de la mortalité périnatale.¹⁴⁵

1.3.1. Les formes cliniques des ATN

Ces ATN sont classées en deux formes, les ATN ouvertes ou fermées, selon que le tissu neural soit exposé à l'extérieure ou recouvert par la peau:

1.3.1.1. Les ATN ouvertes :

Dans ce genre de malformations, les tissus nerveux sont exposés à l'environnement. Les ATN ouvertes représentent la forme clinique la plus fréquente des ATN et sont divisées dans deux formes principales : crâniale et spinale.³

Les ATN ouvertes crâniales sont des formes des ATN qui affectent la région crâniale et qui incluent l'anencéphalie et la céphalocèle. **L'anencéphalie** est causée par un défaut de fermeture au niveau du point de fermeture 3 (Figure 4. Panneau A) entre le 23^e et le 26^e jour de la grossesse. Cette malformation implique d'autres types de malformations du système osseux qui fait partie de la boîte crânienne et aussi des malformations des structures nerveuses qui vont se dégénérer vers la fin du premier trimestre de la grossesse à cause de leur contact avec le liquide amniotique. Ce qui va générer un tissu conjonctivo-vasculaire qui tapisse la base crâniale.^{21, 23} Les bébés atteints de l'anencéphalie naissent morts ou meurent peu après leurs naissances.²⁴ **La céphalocèle** est une malformation qui se caractérise par une insuffisance de la boîte crâniale avec protrusion d'une poche méningée (méningocèle), qui peut aussi contenir des tissus cérébraux (l'encéphalocèle).

L'encéphalocèle peut se former en plusieurs points au niveau de la boîte crâniale : frontale, médiane, dans la base de la boîte crâniale, latérale et surtout occipitale (75% des cas).²³

Les ATN ouvertes spinales ou les myélodysraphies ouvertes affectent surtout la région spinale de la moelle épinière et incluent la myéломéningocèle et la myélocèle. **La myéломéningocèle** encore appelée spina bifida est la plus fréquente et la plus sévère forme des ATN spinales. Cette forme d'ATN est le résultat d'un défaut de fermeture au niveau du point de fermeture 1 (Figure 4, Panneau A), où la moelle épinière quitte sa protection osseuse en poussant les espaces sous-arachnoïdiens, qui vont se développer pour former un sac clairement visible au niveau du dos; ce qui va produire des dommages pour les nerfs ainsi que pour la moelle épinière.^{24, 26} **La myélocèle** est une forme très rare des ATN caractérisée par une absence de fermeture du tube neural au niveau lombosacré, elle se diffère de la myéломéningocèle par l'absence d'expansion des espaces sous-arachnoïdiens.

En plus des ATN ouvertes crâniale et spinales, une forme rare d'ATN appelée **la craniorachischisis** affecte toute la moelle épinière (Figure 4, Panneau A). Cette forme résulte d'un défaut de la fermeture de tube neural au niveau du point 1 et mène à une disparition totale du cerveau et une ouverture totale de la moelle épinière.²⁴ Les bébés qui sont nés atteints de cette forme d'ATN sont toujours nés morts.²⁵

1.3.1.2. Les ATN fermées

Ce sont des ATN où les tissus neuraux ne sont pas exposés à l'environnement, mais couverts par la peau. On compte plusieurs formes des ATN dans cette catégorie incluant le lipomyeloschisis, La lipomyéломéningocèle, la méningocèle, la myélocystocèle, le sinus dermique, la diastématomyélie et le syndrome de régression caudale

Le lipomyeloschisis est un défaut dans la vertèbre dorsale où un lipome sous-cutané se forme au niveau lombo-sacré. Dans cette forme d'ATN, la moitié dorsale de la

moelle épinière est présente, et au niveau du défaut, on trouve une fissure qui est toujours en continuité avec la lumière de la colonne vertébrale.²⁷

La lipomyéломéningocèle est causée par une masse qui colle à la colonne vertébrale. Cette masse est causée par une expansion de l'espace subarachnoïdien ventral qui cause la protrusion postérieure de la placode, de la moelle, de l'arachnoïde et de la dure-mère.²⁸

La méningocèle représente la forme la plus rare des ATN fermées où la partie postérieure de certaines vertèbres est fondue, ce qui conduit à la formation d'une protrusion méningée à travers ces parties fondues qui sera couverte par la peau.

La myélocystocèle est une lésion très rare sous forme d'un kyste formé par l'étirement du segment terminal du canal central.²⁹

Le sinus dermique est habituellement associé à un kyste dermoïde. Cette forme décrit une communication, bordée par l'épithélium, entre la peau et le système nerveux central. Ce kyste se forme au cours de la cinquième semaine de la vie embryonnaire. On peut le retrouver sur la ligne médiane, à tous les niveaux de l'axe neural et résulte d'une adhésion anormale du tube neural au derme.³⁰

La diastématomyélie est une malformation qui donne un aspect de dédoublement médullaire plus ou moins complet. Elle représente 4% de tous les dysraphismes fermés. C'est la forme dans laquelle 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.³¹

Le syndrome de régression caudale représente un groupe de malformations sévères du segment terminal spinal incluant l'agénésie du coccyx et celle des vertèbres sacrales, lombaires et même thoraciques. Ce sont des malformations congénitales rares

des segments inférieurs de la colonne vertébrale associées à une aplasie ou hypoplasie des vertèbres sacrées et lombaires. La grande majorité d'entre eux implique le sacre seul et donc le terme d'agénésie sacral et souvent utilisé pour nommer la régression caudale.³² Les anomalies rachidiennes dans la régression caudale sont associées avec celles des autres structures dérivées de la région caudale de l'embryon : les membres inférieures, l'intestin postérieur et le système urogénitale, avec la symptomatologie consécutive pour tous ces systèmes et organes affectés.³³

1.3.2 Étiologie des ATN

Les ATN ont une étiologie complexe et multifactorielle impliquant des facteurs environnementaux et génétiques.³⁶

1.3.2.1. Les facteurs environnementaux

Le facteur le plus important qui est associé avec les ATN et qui joue un rôle préventif des ATN est l'acide folique (vitamine B9). L'acide folique est consommé, soit comme supplément médicamenteux (0,4 mg tous les jours), soit alimentaire (utilisée principalement en Amérique de Nord par la fortification des produits céréaliers). Des études ont montré qu'une consommation péri-conceptionnelle de l'acide folique peut diminuer l'incidence des ATN jusqu'à 60 – 70%.^{37,38} L'acide folique joue un rôle d'accepteur et donneur des radicaux méthyles. Ce rôle est important pour la synthèse des nucléotides purine (adénine et guanine) par la reméthylation de l'homocystéine à travers la vitamine B12. Le phénomène de la méthylation existe dans toutes les cellules sauf les hématies, et il est essentiel pour la méthylation de l'ADN (dans la régulation de l'expression des gènes), des protéines (modifications post traductionnelles) et des lipides³⁷. Malgré cette relation étroite entre le cycle de l'acide folique et l'expression des gènes, les mécanismes exacts par lesquels la carence en acide folique prédispose aux ATN restent inconnus.²²

Des études en 2004, ont montré que 70% des mères qui ont des enfants touchés par les ATN produisent des anticorps contre les récepteurs des folates sur la membrane

placentaire, ce qui va empêcher la liaison et l'absorption de l'acide folique. Le supplément de 0,4 mg de l'acide folique au cours de la grossesse peut remplacer ce manque par l'augmentation de l'apport intracellulaire par des voies alternatives et restaurer ainsi l'homéostasie des folates.³⁹ Mais en 2009 une étude menée sur des patientes irlandaises a montré aucune association entre la présence des anticorps contre les récepteurs des folates et les grossesses affectées par des ATN. Actuellement, plusieurs études étaient menées pour mieux comprendre les facteurs qui affectent l'absorption de l'acide folique, son transport, son métabolisme ainsi que son rôle dans la pathogenèse des ATN.^{40, 41}

D'autres facteurs environnementaux associés avec les ATN incluent le diabète, la carence en inositol, l'administration de l'acide valproïque ou acide 2-propylpentanoïque, l'hyperthermie maternelle et la carence en zinc dont les mécanismes d'action restent encore inconnus.^{12, 42}

1.3.2.2. Les facteurs génétiques

Plusieurs preuves suggèrent une composante génétique aux ATN. Les ATN sont associées avec plusieurs malformations chromosomiques incluant les trisomies 13, 18 (environ 6.5%) et l'aneuploïdie (5 à 17% des cas).²⁵ Les ATN sont aussi associés avec plusieurs syndromes génétiques comme le syndrome de Meckel, le syndrome de Currarino et la sténose anale.⁴³ Des études ont montré que le risque des ATN augmente de 10 à 50 fois lorsque le fœtus a des frères ou des sœurs qui sont atteints par ces malformations.^{22, 25, 44}

L'héritabilité des ATN est estimée à 60% mais elle implique plusieurs gènes en même temps (un modèle multifactoriel oligogénique et pas un modèle Mendélien).²⁵ Le nombre et l'identité des gènes prédisposant aux ATN restent toujours inconnus.⁴⁵ Les ATN ont une étiologie complexe et des grandes familles avec plusieurs membres affectés sont très rares, ce qui rend difficile l'identification des gènes prédisposant aux les ATN chez les humains par clonage positionnel traditionnel. Une étude d'association du génome entier a été effectuée chez les ATN et a identifié des régions candidates au niveau des chromosomes

2,7 et 10. Ces résultats n'étaient pas suivis et pourraient être compliqués par la pénétrance variable et l'hétérogénéité génétique.^{46, 47} La majorité des études génétiques sur les ATN chez l'humain se sont concentrées sur: (a) les gènes de la voie métabolique des folates du à leur rôle protecteur dans les ATN et (b) les gènes candidats inférés des souris modèles.

Les gènes impliqués dans le métabolisme des folates étaient étudiés en détail chez les patients qui sont atteints par des ATN. Le gène le plus important dans cette voie est le gène 5,10-méthylène-tetrahydrofolate réductase (MTHFR). Ce gène code pour une enzyme qui a un rôle central dans la régulation des niveaux des folates disponibles pour la reméthylation de l'homocystéine. Un polymorphisme d'un nucléotide simple (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) commun dans *MTHFR*, c.677C>T a été associé avec un niveau réduit d'activité de l'enzyme, des niveaux élevés de homocystéine plasmatique et un risque élevé pour les ATN dans certaines populations, tandis que, par exemple, la population hispanique semble ne pas être affectée. 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^{48, 49, 50}. Malgré ces résultats, la souris knockout pour le gène MTHFR n'a pas réussi à expliquer le mécanisme complet par lequel ces mutations augmentent le risque des ATN. Cette souris modèle ne présentait pas un phénotype d'ATN, même en condition de carence en acide folique, quoique les niveaux d'homocystéine étaient élevés.⁵⁰

On a aussi suggéré que des SNP dans deux autres gènes de la voie des folates soient, associés avec une hausse du risque pour les ATN. Il s'agit de c.2756A>G dans *méthionine synthétase* et c.66A>G dans *méthionine synthétase réductase*^{37, 52,53}. Mais aussi le knockout de ces deux gènes dans des souris modèles n'ont pas montré des phénotypes liés aux ATN^{54, 55}. Des autres gènes candidats de la voie ont été étudiés incluant le *méthylène-THF déshydrogénase/formyle-THF synthétase/méthényl-THF cyclohydrolase*, qui est impliqué dans des réactions de conversion des substrats utilisés pour la synthèse des

purines et des thymidines. Un SNP, c.1958G>A, a été identifié dans ce gène et a été fortement associé avec une hausse du risque maternel pour les ATN.^{56, 58}

Plus que 245 souches de souris mutantes atteintes des ATN existent et servent comme un outil puissant pour identifier des gènes importants pour la neurulation.⁵⁹ Grâce au grand nombre de ces souches et à la grande similarité au niveau de la neurulation humaine et celle des souris, les études génétiques moléculaires de ces souris modèles ont aidé pour mieux comprendre ces anomalies chez les humains. Plusieurs gènes impliqués dans les ATN chez la souris ont été identifiés et incluent : 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 liées 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 des gènes impliqués dans les interactions entre la surface cellulaire et la matrice extracellulaire comme *Laminin*^{12, 60, 64}. Les gènes des voies de signalisation, incluant *Notch*, *Shh* et les *Bmp* qui contrôlent la fermeture de tube neural (Chapitre 1.2.2) ont été proposés comme des bons candidats pour les ATN.^{65, 66}

Très important, plusieurs études génétiques accomplies sur des homologues de ces gènes ont été effectuées chez des patients humains atteints des ATN mais aucun de ces gènes n'a été identifié comme un gène majeur impliqué dans leur pathogénèse.

Des études des gènes de la voie de la polarité planaire (PCP) qui est associée aux ATN chez la souris et l'humain (**chapitre 1-4**) ont montré une contribution importante des gènes *VANG-LIKE 1 (VANGL1)*, *VANGL2*, *PRICKLE1*, *FRIZZLED6* et *CELSR1* dans la pathogénèse des ATN.^{67, 69}

1.4. La polarité cellulaire planaire (PCP)

1.4.1. Définition

Les cellules de tous les organismes sont organisées par 2 types principaux de polarité : la polarité apico-basale et la polarité cellulaire planaire (PCP). Au niveau des cellules épithéliales, la PCP, encore appelée la polarité tissulaire, est perpendiculaire à l'axe de la polarité apico-basale et intervient dans l'organisation de plusieurs structures comme les cils et les poiles. Le terme de la polarité planaire a été utilisé pour la première fois par Wigglesworth chez la punaise *Rhodnius* en 1940. En 1966, le même terme a été utilisé par Lawrence qui a essayé d'expliquer le mécanisme qui contrôle l'orientation des poiles des petits insectes milkweed bug.¹¹⁰ Ensuite, plusieurs autres études étaient faites sur des autres modèles animaux, surtout la *Drosophile*, pour mieux comprendre le mécanisme ainsi que les membres de la voie PCP.

1.4.2. La PCP chez la drosophile

DROSOPHILA melanogaster représente un excellent modèle pour étudier les mécanismes fondamentaux de la PCP. En fait, la PCP a été étudiée en détails pour la première fois dans les poils des ailes, les soies abdominales ainsi que les ommatidies et dans tous les épithéliums dérivants des différents disques imaginaux de la drosophile.^{120, 121, 122, 82} Les études génétiques de la PCP chez la drosophile ont identifié un groupe de gènes centraux de la PCP qui inclut : *van gogh/strabismus (vang/stbm)*, *frizzled (fz)*, *dishevelled (dsh)* chez la *Drosophile*, *Dvl* chez les vertébrés), *starry night/flamingo (stan/fmi)*, *prickle (pk)* et *diego (dg)* (**Figure 6**). La voie de signalisation PCP implique une voie non canonique *Wnt / Frizzled (Wnt / Fz)* où *Wnt* se lie au récepteur *Fz* menant au recrutement et à l'activation de *Dishevelled*. La famille des gènes *WNT* se compose des gènes liés structurellement, qui codent pour des protéines de signalisation. Ces protéines ont été impliquées dans l'oncogenèse et dans plusieurs processus du développement, y compris l'orientation du destin cellulaire et la structuration lors de l'embryogenèse. Ainsi, les interactions spécifiques entre ces protéines et la distribution sous-cellulaire des

différents complexes multi-protéiques sont fondamentales pour l'établissement et la propagation des signaux polarisants dans les tissus.

Les gènes de la PCP se distribuent en 2 cassettes principales: la cassette *Frizzled/Flamingo* et la cassette *Fat/Dachsous/Four-jointed*.

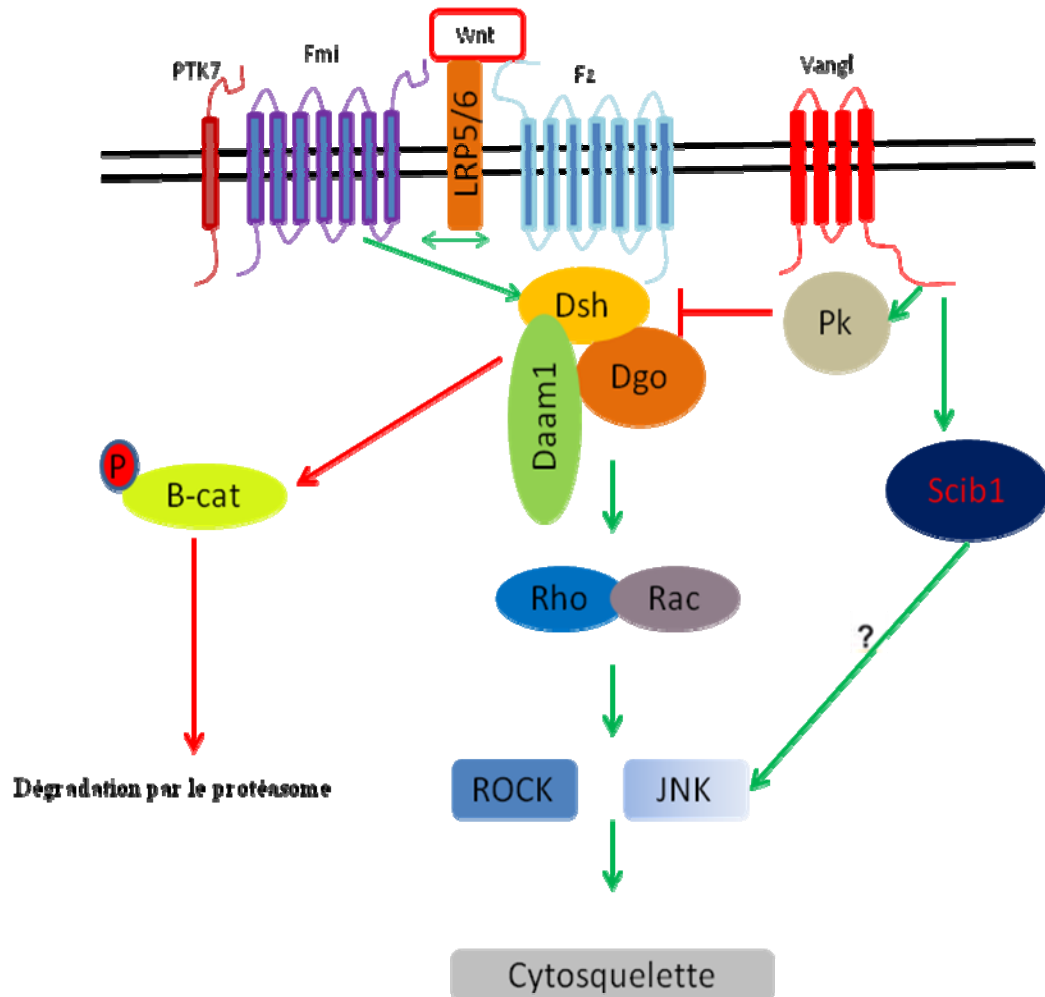


Figure 6 : Schéma représentatif de la voie PCP avec les différentes interactions entre les gènes ainsi que les effecteurs.

1.4.2.1. La cassette *Frizzled/Flamingo*

Cette cassette est composée des gènes centraux de la voie PCP qui sont essentiels pour le maintien de la polarité planaire et se caractérise par plusieurs critères : a) Les mutations au niveau de ces gènes causent des problèmes de polarité cellulaire, conduisant à une mauvaise orientation des trichomes, chez la drosophile. Le gain de fonction pour l'un de ces gènes se traduit également par un problème de polarité cellulaire; (b) les protéines codées par ces gènes se localisent de façon asymétrique au niveau apical des cellules polarisées; (c) si l'un de ces gènes subit une mutation, la localisation et l'organisation de tous les autres membres de cette cassette vont être déséquilibrés.¹²²

Plusieurs interactions sont effectuées entre les membres de la cassette *Frizzled/Flamingo* pour maintenir leur bonne distribution et asymétrie au niveau des cellules polarisées⁷⁹. Au cours de cette asymétrie, deux groupes des protéines sont localisés sur deux pôles différents : Fmi/ Fz/ Dsh/ Dgo au pôle distal de la cellule en même temps qu'un deuxième groupe, Fmi/ Vangl/ Pk, prend une position proximale (Figure 7).

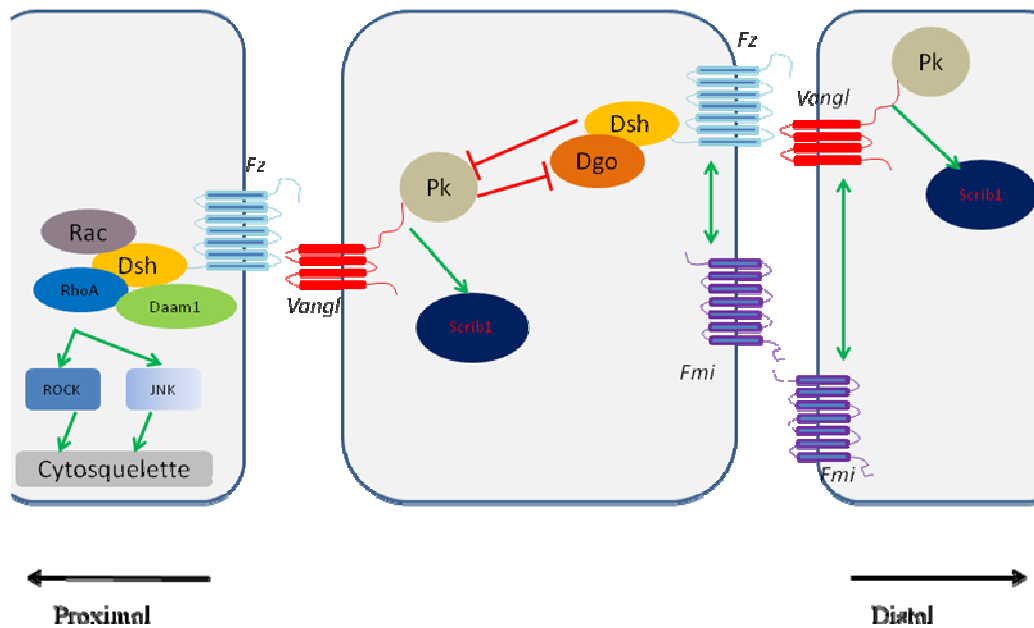


Figure 7 : Schéma représentatif des différentes interactions des protéines de la voie

PCP.

Au cours de la signalisation par la PCP, **Fz** (récepteur avec sept domaines transmembranaires faisant partie de la superfamille des protéines couplées aux protéines G) se trouve distribuée d'une façon asymétrique au niveau de la membrane cytoplasmique, mais beaucoup plus dans le pôle apicale des interfaces proximo-distales des cellules polarisées. 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.¹²⁸ La protéine **Dsh** (une phosphoprotéine cytoplasmique qui agit directement en aval de récepteurs Fz) est concentrée sur la membrane distale et interagit avec Fz qui la recrute à la membrane cellulaire.^{72, 73} **Stbm** (une protéine membranaire avec quatre domaines transmembranaires) se localise dans le pôle proximale. Chez la drosophile Stbm se localise dans la région des jonctions adhérentes des cellules de l'aile nymphale et interagit physiquement avec Pk, Dsh et Dgo. **Pk** interagit avec Stbm qui assure son recrutement à la membrane proximale⁷⁵, Pk interagit aussi avec Dsh et Dgo.^{76, 127} La protéine **Dgo** est distribuée aux pôles distale et proximale des cellules et Fmi est indispensable pour maintenir cette distribution.⁷⁸ Dgo interagit avec les protéines Pk et Stbm, avec lesquels il partage un rôle essentiel dans la distribution apicale de Fmi. **Fmi** (récepteur avec sept domaines transmembranaires faisant partie de la superfamille des cadhérines) à son tour se concentre dans le pôle proximal et distal et dépend dans sa distribution des protéines Fz (qui est responsable du positionnement de Fmi) et Dsh où des études ont montré que l'absence ou la perte de fonction de l'un de ces deux protéines conduit à la perte de la distribution de la protéine Fmi dans la cellule.^{71, 74, 80, 81} **Fmi** maintient le complexe initial des protéines de la PCP au niveau membranaire pour faciliter leurs interactions ultérieures dans la signalisation.⁷⁷

Chez la drosophile, des études ont montré l'existence d'une communication entre les deux complexes des deux cellules voisines à travers l'interaction entre Fz situé dans le pôle distal d'une cellule avec la protéine Vang qui se présente dans le pôle proximale d'une autre cellule voisine.⁸⁰ Une autre étude a montré que cette communication se fait par l'intermédiaire de Fmi, qui se positionne dans les deux complexes et contrôle l'asymétrie

de ces deux complexes à travers ses liaisons homophiliques⁸¹. Toutes ces communications intercellulaires à travers ces protéines de la voie PCP, vont établir une polarité tissulaire, ce qui va conduire à une organisation parfaite au niveau tissulaire⁸² (Figure 6,7).

1.4.2. 2. La cassette *Fat/Dachsous/Four-jointed*

Au moment de la découverte de cette cassette, Axelrod a supposé que ses gènes agissent en amont de la cassette *Frizzled/Flamingo*.¹⁵⁹ La théorie actuelle est que les gènes des deux cassettes agissent en même temps et en parallèle. Il a été démontré que les gènes de cette cassette sont impliqués dans la régulation de la polarité planaire^{71, 123, 124}, comme ils sont impliqués dans l'établissement d'un signal dépolarisant global faisant la liaison avec les axes des tissus. Cette cassette est composée de deux cadhérines atypiques *Fat* (*Ft*), *Dachsous* (*Ds*) et le gène *Four-jointed* (*Fj*) codant une protéine transmembranaire de type II¹²⁵ et qui est située dans l'appareil de Golgi. Des cellules mutantes pour ces gènes chez la drosophile se polarisent normalement, mais n'arrivent jamais à s'aligner avec les axes des tissus, ce qui rend leur morphologie globale affectée.⁸³

Les protéines *Ft*, *Ds* et *Fj* ne sont pas localisées d'une façon asymétrique chez la drosophile. L'expression de ces gènes est différente de celle des gènes centraux de PCP. Les gènes *ds* et *fj* sont exprimés selon un gradient, où *ds* est exprimé d'une façon très forte du côté proximale puis sa concentration diminue dans le côté distale et *fj* est exprimé avec un gradient inverse. *Fat* est exprimé d'une façon uniforme au niveau du tissu de la drosophile.⁸⁴ La perte de fonction ou l'expression ectopique du gène *fj* au niveau de l'œil de la drosophile conduit à une anomalie au niveau de l'orientation des ommatidies.¹²⁴ La combinaison entre les deux cassettes de la voie PCP est nécessaire pour l'organisation de ces structures.

1.4.2.3. Les effecteurs et les effets de la voie PCP

En plus des gènes centraux de la voie PCP, la polarisation des cellules implique d'autres gènes qu'on appelle les effecteurs, qui incluent *Rac1*, *Rho1*, *Cdc42*, *Inturned* et

Fuzzy. Les protéines Rac et Rho interviennent dans l'organisation du cytosquelette d'actine qui est une protéine bi-globulaire de 5,46 nm de diamètre importante pour les mouvements et l'architecture des cellules. Rho contrôle la formation de fibres de stress ancrées au niveau de la plaque d'adhésion. Rac et Cdc42 contrôlent les mouvements de la membrane cellulaire. Les protéines Rho1 et Rac1 jouent un rôle intermédiaire dans la régulation des jonctions d'adhérence par Vangl2.¹²⁶ Ainsi, Une protéine RhoA et son effecteur Rho-associated kinase chez la drosophile (leurs activations résultent dans l'activation consécutive de C-Jun kinase) sont deux protéines qui sont requises en aval de Frizzled et Dishevelled pour arrêter la formation du poil à un seul site apical. Cette kinase a comme cible la chaîne régulatrice légère de la myosine (MRLC) lors de la polarisation planaire de l'aile.^{4,108, 109}

Les gènes *Inturned* (*Int*) et *Fuzzy* (*Fy*) sont impliqués dans la polarisation des cellules des poils chez la Drosophile. Ces gènes interviennent d'une façon directe ou indirecte dans le contrôle de la polymérisation et l'assemblage de l'actine. Des mutations au niveau de ces gènes dans l'aile de la Drosophile donnent naissance à des poils avec une polarité modifiée et des cellules avec plus qu'un seul poil. Ces deux protéines sont nécessaires pour la transmission de signal polarisant entre les différentes cellules (ce qui peut aider dans la détermination de la polarité des poils) et se positionnent en aval de Dsh.^{86, 88} Le gène *Fy* joue un autre rôle dans la stabilisation de l'assemblage des microtubules qui intervient dans la formation et le développement du poil épidermique.⁸⁸ Ainsi une étude d'une perte de fonction avec des morpholino oligonucleotides qui ciblent *Int* ou *Fy* chez le xenopus montre une anomalie de fermeture de tube neural, ce qui prouve l'implication de ces deux gènes dans le processus de la fermeture de tube neural et spécialement dans la CE.¹¹¹

Les effets des gènes de la voie PCP se différencient d'un gène à l'autre. Selon l'analyse des mutants mosaïques des drosophile de la drosophile, les gènes PCP sont classés en deux familles selon leurs effets : **(a) les gènes agissant de manière autonome** qui lorsque

mutés ou surexprimés n'affectent que la PCP des cellules où ces gènes sont mutés, tandis que les cellules avoisinantes où les gènes ne sont pas mutés ne seront pas affectées. Les gènes agissant de manière autonome incluent *dishevelled*, *prickle*, *flamingo* et *diego*.¹³⁰ (b) **les gènes agissant de manière autonome et non-autonome** qui lorsque mutés ou surexprimés affectent à la fois la PCP des cellules mutées et celle des cellules avoisinantes non mutées. Les gènes agissant de cette manière incluent *frizzled* et *strabismus/vang*.¹³⁰

1.4.3. La PCP chez les vertébrés

Chez les vertébrés, l'identification des homologues des gènes de la voie PCP de la drosophile a permis d'identifier les mécanismes et le fonctionnement de plusieurs phénomènes. Au cours de l'évolution, les gènes de la voie PCP ont devenu des familles multigéniques, mais malgré cette évolution ces gènes restent toujours fidèles à leurs rôles dans le remodelage de la polarisation de cytosquelette comme chez la drosophile. Plusieurs autres gènes sont impliqués dans la voie PCP chez les vertébrés mais n'ont pas leurs homologues chez la drosophile ou ces homologues ne sont pas encore identifiés.⁹⁰

Chez les vertébrés, la signalisation par la voie PCP contrôle plusieurs phénomènes dont la complexité est plus évoluée que ceux chez la drosophile, et qui incluent l'extension convergente pendant la gastrulation et la neurulation (Sections 1.2.1. et 1.2.2.), la fermeture des paupières, l'orientation des touffes de cils des cellules ciliées dans l'oreille interne et l'orientation des follicules pileux. Des récentes études ont montré une liaison étroite entre la PCP et la ciliogénèse.¹⁵³

1.4.3.1. La voie PCP et la neurulation

La neurulation représente un des phénomènes développementaux le plus importants qui est régulé par la voie PCP. La preuve que la voie de signalisation PCP intervient dans le phénomène de CE au cours de la neurulation chez les vertébré, a été met en évidence à partir de l'études d'une large gamme de mutants et des morpholino-oligonucleotide knock-

downs des orthologues des gènes PCP de la drosophile dans les modèles de poisson-zèbre (**Danio rerio**), de grenouilles (**Xenopus**) et de la souris (**Mus Musculus**).¹⁴⁵

Les études sur les gènes Wnt dans le poisson zèbre, le xenopus et la souris ont démontré que Wnt5, Wnt7 et Wnt11 sont impliqués dans la signalisation par la PCP. Wnt11 (silberblick, slb) participe dans la régulation de l'extension convergente dans le mésoderme non-axial pendant la gastrulation du poisson zèbre¹⁰⁴ et, chez le Xenopus, Fz7 a été identifié d'être le partenaire d'interaction de Wnt11.¹⁰⁵ L'inactivation de chacun de *Vangl1*, *Pk1*, *Diversin* (orthologue de *diego*) et de *Ptk7* (un gène PCP identifié chez les vertébrés, Section 1.7.) par injection des morpholinos chez le Xenopus et/ou le poisson zèbre bloque la fermeture du tube neural et mène à un tronc raccourci¹⁰³. Par ailleurs, d'autres études chez le Xenopus, ont montré que la perte de fonction d'Int et *Fy* par injection de morpholino mène à un tube neural qui reste ouvert démontrant une implication des deux gènes dans la CE.¹⁵⁴

Les souris modèles ont fourni un outil important pour comprendre le rôle de la PCP dans la neurulation.¹² La souris looptail (Lp) représente le premier modèle qui a impliqué la voie PCP dans la neurulation chez les mammifères. Lp est causé par une mutation dans le gène *Vangl2* qui est un gène principal de la voie PCP (Section 1.3.2.2.). Les souris homozygotes Lp/Lp souffrent de la craniorachischisis où le tube neural reste ouvert tout au long de la moelle épinière. Cette ATN est due à un défaut de l'extension convergente des cellules neuro-épithéliales au niveau de la plaque neurale et une extension diminuée des cellules mésodermes de la ligne médiane. Ce qui mène à un développement normal des plis neuraux, mais aussi à très grande distance entre eux empêchant leurs rapprochements.⁹² Plusieurs études des autres souris mutantes pour des autres gènes de la voie PCP ont confirmé un rôle important de cette voie dans les ATN. En fait, le même phénotype du craniorachischisis a été identifié chez les souris mutantes pour les gènes *Celsr1*, *Ptk7* et *Scribble1* (Section 1.7.1) et pour les doubles knockouts de *Dvl1/ Dvl2*, *Dvl2/ Dvl3* et *Fz3/Fz6* aussi que les doubles hétérozygotes *Vangl2:Scrib* et *Vangl2:Dvl3*.^{41, 93, 94}

Toutes ces études prouvent l'implication des différents gènes de la voie PCP dans le processus développementale de la neurulation.^{95,96}

Plusieurs études ont montré une association forte entre les gènes PCP et le développement des ATN chez l'humain.^{67,69} Dans une cohorte de 137 patients atteints des ATN, trois nouvelles et rares mutations, p.Val239Ile, p.Arg274Gln et la p.Met328Thr, étaient identifiées, incluant une mutation *de novo* (p.Val239Ile). Cette mutation affecte l'interaction de VANGL1 avec ses partenaires Dishevelled (Dvl) 1, 2 et 3. Des validations fonctionnelles de ces 3 mutations étaient effectuées dans le modèle du poisson-zèbre. Ablation de l'expression de *tri*, l'orthologue de *Vangl2*, en utilisant un morpholino antisense (MO), ou surexpression du *VANGL1*, conduit à un défaut de la CE qui se manifeste par un raccourcissement de l'axe du corps et un élargissement des somites. La co-injection du *VANGL1* humain avec le *tri*-MO a pu sauver le phénotype du défaut de l'extension convergente induit chez le poisson zèbre; alors que la co-injection de deux variantes, p.Val239Ile et p.Met328Thr, n'a pas pu sauver ce phénotype. La surexpression du *VANGL1* a entraîné une CE défectueuse sévère, alors que la surexpression de ces deux variantes n'a pas affecté ce processus. Ces résultats suggèrent que ces deux variantes plus probablement représentent '« une perte de fonction » qui affectent la fonction de la protéine au cours du développement embryonnaire. D'autres mutations spécifiques aux patients au niveau du gène *VANGL1* avaient été ensuite identifiées dans une cohorte plus grande, ayant des diverses origines ethniques.^{68,70}

Trois autres gènes de la voie PCP, *VANGL2*, *PK1* et *CELSRI*, ont été analysés par séquençage de leurs régions codantes dans la même cohorte des patients que les deux études précédentes. Des mutations rares, nouvelles et faux - senses ont été identifiées dans chacun de ces gènes dans presque 2.5% des ATN.⁶⁹ La validation fonctionnelle de 5 variantes de *PK1* chez les poissons-zèbres a montré qu'une variante, p.Arg682Cys, contrarie le phénotype de la CE induit par la surexpression du type sauvage de *prickle1*

chez des poissons zèbres.¹⁵⁶ Ces études montrent une forte implication de la voie PCP dans la pathogenèse des ATN humaines.

1.4.3.2. La voie PCP et l'orientation des cils dans l'oreille interne

Chez les vertébrés, l'oreille est un organe d'audition et d'équilibre composé de trois parties, l'oreille externe, moyenne et interne. Au niveau de cette dernière (l'oreille interne) se trouve l'organe de Corti qui est composé de trois couches de cellules ciliées externes (CCE) situées dans la face externe et une couche des cellules ciliées internes (CCI) située dans la partie interne de cet organe. Les CCEs et les CCI sont rangées par des cellules non sensorielles et de soutien. Chaque cellule ciliée envoie des stéréocils dérivés de microvillosités qui sont arrangés en ordre croissant vers le bord du cortex apical pour former une structure en forme de "V" avec un cil primaire unique, connue sous le nom kinocil, placé près de la plus haute stéréocil au sommet de la structure en "V". Tous les sommets des structures ciliaires pointent vers la périphérie de la cochlée, manifestant ainsi la polarité planaire. Ce qui les rend un modèle très important pour l'étude de la voie PCP.^{97, 98}

Chez les mammifères et contrairement à la *Drosophile*, *Vangl2*, *Fz3* et *Fz6* sont localisés dans une seule côté au niveau des cellules ciliées de l'organe de Corti. Cette asymétrie joue un rôle important dans l'orientation de ces cils.^{100, 101} Plusieurs études ont montré des cils désorientés dans des souris looptail et dans des souris mutantes pour *Scrib1*, *Ptk7*, *Celsr1*, *Dvl1/Dvl2*, *Fz3/Fz6* et *Wnt7a*.^{97, 99} Ces études confirment que les gènes de la voie PCP jouent un rôle important dans la polarité planaire de l'organe de Corti.

1.4.3.3. La voie PCP et la ciliogénèse

Le syndrome de Bardet-Biedl (SBB) est une ciliopathie génétiquement hétérogène, autosomique récessive, au moins 15 locus sont responsables de ce syndrome qui se manifeste par une obésité, une rétinite pigmentaire, une hexadactylie post-axiale, un hypogénitalisme, une atteinte rénale et un retard mental.¹³⁵ Les gènes mutés dans le SBB sont impliqués dans l'assemblage des cils ainsi que l'assemblage de leurs corps basaux.

Des souris mutantes au niveau des gènes BBS ont les mêmes phénotypes que les souris mutantes PCP.^{109,135} Les mutantes *BBS4* -/- et *BBS1* +/- montrent une désorganisation dans l'orientation des cils dans l'oreille interne et les souris mutantes *BBS4* -/- présentent aussi une exencéphalie et un défaut de fermeture des paupières. Ces phénotypes, ainsi qu'une interaction génétique entre les gènes *BBS8* et *Vangl2* chez le poisson zèbre, suggèrent une association entre les gènes *BBS* et la voie PCP.^{110, 153} Des gènes effecteurs chez les vertébrés de la voie PCP, *Int* et *Fy* (section 1.4.2.3.) sont aussi impliqués dans la ciliogenèse, par leurs interventions dans l'organisation des microtubules pendant la signalisation PCP. Chez le Xénopus, des études ont montré qu'*Int* agit en amont de *Dvl* au cours de la morphogénèse des cils.¹⁵³ Une étude récente chez les poissons zèbres a montré que *Vangl2* n'est pas nécessaire pour la ciliogenèse mais pour la localisation asymétrique de cils à la membrane apicale des cellules postérieure neuroépithéliales. Ces résultats indiquent un rôle plus large et essentiel pour la PCP dans la localisation asymétrique et l'orientation des cils primaires mobiles dans le développement embryonnaire.¹⁵⁷

1.5. La voie canonique Wnt/Fz

Wnt intervient dans la signalisation de trois voies : la voie non-canonique de la polarité planaire cellulaire, la voie canonique Wnt/Fz et la voie Wnt/Calcium. (Figure 8). Dans l'absence du ligand Wnt, la β -caténine est recrutée dans un complexe inhibiteur formé par plusieurs protéines cytoplasmiques qui sont, Axine, APC (Adenomatous Polyposis Coli), et GSK3 β . La voie canonique est initiée par la liaison du facteur soluble Wnt/Wng au récepteur membranaire Frizzled. Cette première interaction membranaire conduit au recrutement de la protéine Dishevelled à la membrane par Frizzled et par la suite à l'inhibition de la sérine /thréonine kinase GSK3 β qui ne peut plus phosphoryler la β -caténine. Cette dernière dans son état non phosphorylé est ainsi transloquée dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription LEF/ TCF et active des gènes cibles tel que : c-myc, un facteur de transcription oncogénique, la cycline D1, un régulateur important du cycle cellulaire, la matrilysine, qui est impliquée dans l'invasion et la formation de métastases ou encore la gastrine qui stimule la prolifération des cellules

tumorales coliques¹⁵⁵. La voie canonique Wnt/Fz intervient dans plusieurs processus comme la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi dans le développement des différentes pathologies humaines, notamment les cancers.¹⁴⁶

1.6. La voie Wnt/Calcium

La voie Wnt/Calcium est considérée comme une voie alternative de signalisation de Wnt/Fz. Il a été montré que les gènes Wnt5a et Wnt11 stimulent l'activité des CamKII (la kinase calcium/calmoduline dépendante II) par la stimulation de la libération de Calcium intracellulaire. Cette libération de calcium intracellulaire est induite par Wnt5 accompagnée par Fz2 à travers la voie du phosphatidylinositol. L'interaction entre Wnt5 et Fz2 agisse sur les protéines G au niveau des sous unités α et $\beta\gamma$, qui, par la suite, hydrolysent l'inositol membranaire avec la libération de diacylglycérol (stimulateur de la protéine kinase C) et de 1, 4, 5-triphosphate (qui mène à la libération de Ca^{2+} intracellulaire). Wnt5 et Fz2 semblent agir indépendamment de β -caténine et de la voie canonique. L'expression maternelle de ces deux gènes et leur signalisation à travers CamKII sont responsables de destins des cellules ventrales chez l'embryon de *Xenopus*, et ainsi du maintien d'un gradient de l'activité de CamKII (réduit au niveau dorsal et élevé au niveau ventral).¹¹⁹

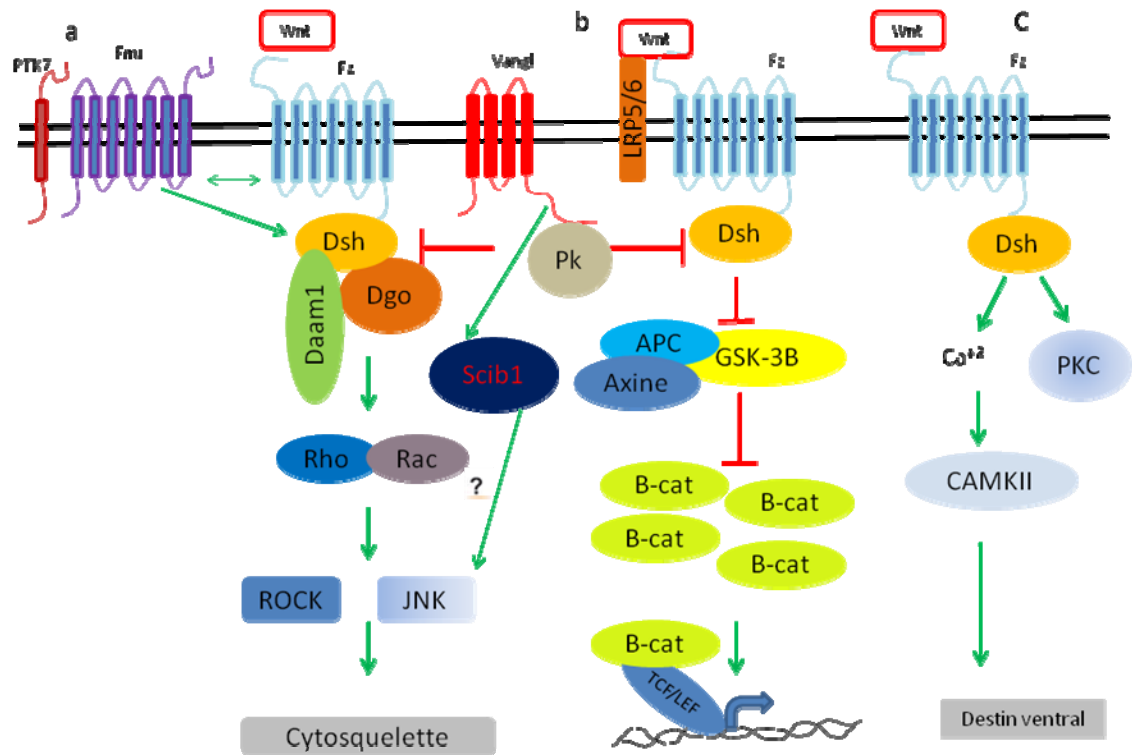


Figure 8 : Schéma présentatif de (a) La voie de la polarité planaire cellulaire, (b) La voie canonique et (c) La voie Wnt/Calcium.

1.7. Des nouveaux gènes de la voie PCP chez les vertébrés

La caractérisation des souris modèles générées par l'agent mutagénique ENU et des souris Knockout a permis d'identifier, en plus des gènes centraux de la voie PCP qui existent chez la drosophile, des nouveaux gènes chez les vertébrés. Ces gènes incluent *Scribble1*, protéine tyrosine kinase 7 (*Ptk7*) et *Sec24b*.¹³¹ *Scribble1* est décrit en détails dans la section 1.7.1. *Ptk7*, l'orthologue d'*Otk* chez la drosophile, code pour une tyrosine kinase inactive impliquée dans la voie de signalisation Wnt. *Ptk7* est un activateur de la voie non-canonique et en même temps un inhibiteur de la voie de signalisation canonique.

Elle joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire, la polarité cellulaire, la prolifération, la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans l'apoptose. Elle est aussi impliquée dans l'organisation du tissu épithélial pendant l'embryogenèse et l'angiogenèse.⁹⁵ La perte de fonction du gène *Ptk7* conduit à une disposition désordonnée des kinocils et un défaut de la fermeture de tube neural au niveau du point 1 causant le phénotype sévère de la craniorachischisis (Section 1.3.1.1.). *Ptk7* interagit génétiquement avec *Lp* (Loop-tail), où les doubles hétérozygotes montrent une spina bifida.¹⁰³ *Sec24b* code pour une protéine composante de « coat protein II » (COPII), présent dans les vésicules couvertes. Généralement cette protéine intervient dans le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers la membrane. Des études ont montré des interactions génétiques entre *Sec24b* et les gènes de la voie PCP.¹³²

1.7.1. Le gène SCRIBBLE1 (*SCRIB1*)

SCRIBBLE1 fait partie d'une famille connue sous le nom des protéines LAP (*LRR AND PDZ*), contenant des domaines LRR et PDZ (PSD-95/Disc-large/ZO-1). Les membres de cette famille partagent des caractéristiques communes où ils sont constitués d'un domaine LRR (Leucine Rich Repeats) du côté N-terminale, suivi par des motifs LAPSD (LAP specific domain) et des domaines PDZ.¹¹¹ *Scrib1* présente 44% d'identité avec la protéine scribble de la Drosophile, et est codée par un gène de 4968 nucléotides répartis sur 37 exons chez l'humain. La protéine SCRIB1 est composée de 1655 acides aminés et est composée de 4 parties : LRR, LAPSD, PDZ et une partie C-terminale (Figure 9).¹⁰² Le domaine LRR, situé dans la partie N-terminale, est constitué de 402 acides aminés qui sont répartis sur 16 LRR, chacun d'entre eux est constitué de 20 à 30 acides aminés avec une forme de fer à cheval. Le domaine des LRR intervient essentiellement dans l'interaction de la protéine avec plusieurs protéines impliquées dans la polarité apico-basale. Le domaine LAPSD est formé de deux domaines a et b, qui sont très importants pour l'import /export de Scrib1 vers le noyau. Une délétion du domaine LAPSDb

empêche Scrib1 d'aller vers le noyau. Le domaine PDZ est généralement connu par son rôle dans les interactions protéine-protéine dans la transduction de signal ainsi que dans les jonctions cellulaires. Les domaines PDZ ont une structure globulaire compacte dont le repliement est un baril de six brins β (β A- β F) encadré par deux hélices α (α A et α B). Au niveau de SCRIB1, 4 domaines PDZ existent avec une longueur de 466 acides aminés, et où chaque PDZ est constitué de 85 à 95 acides aminés¹¹¹. Ces domaines PDZ interviennent dans l'interaction de scrib1 avec plusieurs protéines incluant la protéine Vangl2 de la PCP¹³¹. La dernière partie de SCRIB1 est la partie C terminale qui est constituée de 436 acides aminés. Cette partie est la moins conservée à travers l'évolution et son rôle reste toujours inconnu.¹¹²

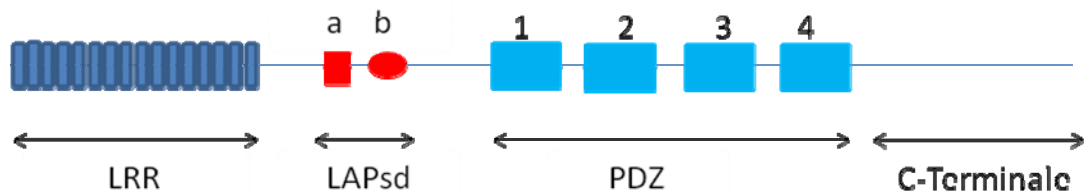


Figure 9 : Schéma représentatif de la structure générale de Scrib1.

1.7. 2. L'expression de *Scribble1*

Chez la Drosophile, Scrib existe sous deux isoformes : Scrib1 composé de 1756 acides aminés et Scrib2 composé de 1247 acides aminés et qui perd les deux domaines PDZ 3 et 4 ainsi que la partie C-terminale. *Scrib1* montre une expression « omniprésente » chez la drosophile dès le début de la formation du blastoderme jusqu'à l'élongation de la bande de germe. Cette expression devient préférentielle et se localise au niveau des neuroblastes et plus spécifiquement dans le développement du système nerveux central (SNC). Après l'embryogenèse, l'expression de *Scrib1* est limitée à un nombre limité de cellules, surtout

dans la corde nerveuse ventrale et d'une façon plus faible au niveau des cellules épithéliales et des fibres musculaires.¹¹⁵

Chez la souris, 4 isoformes (1637 acides aminés, 1665 acides aminés, 1619 acides aminés et 1612 acides aminés) de *Scribl* existent. *Scribl* (Scrib-001 ENSMUST00000002603) est exprimé très tôt à 7.5 jours de l'embryogenèse au moment de l'initiation de la fermeture du tube neural, où l'expression la plus intense est détectée dans le neuroépithélium. À ce stade, une expression moins intense est également détectée dans le mésenchyme des arcs branchiaux crâniens et dans le mésoderme somatique ainsi que, plus caudalement, dans le mésoderme latéral. Au cours du développement, *Scribl* est exprimé au niveau du cœur, dans le primordium hépatique et au niveau du mésoderme latéral au niveau de la paroi de futur corps. Lors des étapes avancées du développement, *Scribl* est exprimée dans l'épithélium des paupières, en particulier à la région de la fusion de la paupière, et dans la rétine. Il est également exprimé dans les glandes sous-maxillaires, les moustaches et les follicules pileux, les ganglions sympathiques dans l'oreille de développement interne et aussi dans certain nombre d'autres tissus incluant le thymus, les testicules, les reins, le revêtement épithélial de l'œsophage et l'estomac, le ganglion trigéminal et les ganglions rachidiens, et l'épithélium pulmonaire. L'expression de *Scribl* est détectée dans tous les tissus dans lesquels un phénotype morphologique a été détecté dans la souris mutante Circletail (*Crc*) (Section 1.7.4), mais pas tous les sites d'expression de *Scribl* présentent un phénotype mutant, ce qui suggère une redondance avec d'autres homologues co-exprimés.¹⁰²

1.7.3. Rôle de *Scribble1* dans la gastrulation et migration des neurones

Des allèles zygotiques modifiés de *scribl* sont viables chez les poissons-zèbres permettant les études fonctionnelles du *Scribl*. *Scribl* intervient dans l'extension convergente par un mécanisme qui exige la présence du domaine PDZ1 chez ces poissons. Des études ont montré que c'est la forme maternelle de *Scribl* et non pas la forme zygotique qui intervient dans la régulation de ce phénomène. Des mutations et des délétions

au niveau de ce gène ont conduit à des perturbations dans le processus de l'extension convergente ainsi que dans le phénomène de la migration neuronale. Des études sur les gènes *Vangl2* et *Scrib1* ont montré que l'interaction entre ces deux gènes intervient dans la régulation de la gastrulation chez les poissons-zèbres. Ces deux gènes, en plus de leurs rôles dans la gastrulation, interviennent dans la migration des neurones au niveau du moteur neurone nVII.^{140, 116}

1.7.4. *Scribble1* et la voie PCP

Scrib1 a été identifié la première fois comme un membre de la voie PCP chez la souris mutante circletail (Crc). Cette mutante contient une insertion de base unique de Cytosine - C - entre les positions 3182-3183 dans le gène *Scrib1*, ce qui a causé un décalage du cadre de lecture du gène et conduit à un arrêt prématuré de la protéine Scrib1 juste après PDZ 2. La mutation de *Scrib1* cause un défaut de fermeture de tube neural au niveau du point 1, ce qui résulte en un craniorachischisis chez les souris Crc homozygotes^{102, 113}. Les mutantes homozygotes présentent aussi un défaut de la fermeture abdominale, un échec dans la formation des paupières fermées ainsi que des défauts observés dans la rétine, Les souris doubles hétérozygotes *Lp/+ ; Crc/+* présentent des défauts d'orientation des cellules ciliées CCI et CCEs de l'organe de Corti. Scrib1 interagit physiquement avec Vangl2 par les domaines PDZ 3 et 4 chez les vertébrés, tandis que chez les mammifères l'interaction est assurée par les domaines PDZ 2 et 3. Ces observations ainsi que la co-localisation de Scrib1 avec Vangl2 dans les poissons zèbres, prouvent que les deux protéines interagissent ensemble^{101, 131}. Des études conduites chez la drosophile ont montré des interactions génétiques entre ces deux gènes et physiques entre les 2 protéines, en se basant sur la mauvaise orientation, l'asymétrie et aussi la chiralité des ommatidies de l'œil.¹³⁹ Chez la drosophile, *Scrib1* est impliqué seulement dans la polarité apico-basale et non dans la PCP.¹⁰²

1.7.5. *Scribble1* et la polarité apico basale

Chez la souris, *Scribble1* joue un rôle crucial dans la régulation de la polarité apico-basale et un rôle d'intermédiaire entre ce type de polarité et la PCP. *Scrib1* fait partie d'un groupe de gènes qui contrôlent la polarité apico-basale, Ces gènes s'organisent en trois complexes essentiels : (1) Crumbs, constitué des protéines Crumbs (Crb), PALS1 (Stardust (Sdt)) et PATJ; (2) Par3 (Bazooka), constitué des protéines Par3, Par6 et de la protéine kinase C atypique (aPKC) et (3) Scribble1, constitué de Scribble1, Lethal Giant Larvae (LGL), et de Discs large (Dlg).

La majorité des protéines, incluant Par3, Scribble, Dlg, PALS1 et PATJ, constituant ces complexes sont des protéines incluant des domaines PDZ et appartenant à la classe des protéines appelée MAGUKs (member of the membrane-associated guanylate kinase). Ces complexes se localisent dans les pôles apicaux des cellules, plus précisément dans les jonctions septés chez la drosophile et les jonctions serrées chez les mammifères. Les complexes Crumbs et Par3 se situent au niveau apical des cellules dans les jonctions serrées, tandis que le complexe Scribble1 est localisé en position latérale dans les jonctions adhérentes qui se situent au dessous des jonctions serrées. **Dans le complexe du Scribble**, la liaison entre LGL et Dlg et Scribble n'est pas directe, où Scribble se lie avec Dlg par l'intermédiaire d'une autre protéine Gukh, où l'interaction entre Scrib1 et Gukh se fait par la PDZ2. Plusieurs autres interactions sont faites entre Scribble et d'autres protéines intermédiaires par une liaison par le domaine LRR chez la drosophile.¹¹⁷ Le rôle de ce complexe n'est pas encore certain chez les mammifères.¹⁴¹ Grâce à une interaction avec les protéines claudines et les Zonula Occludens de type 3 (ZO-3) qui composent les jonctions serrées, le complexe Crumbs se positionne dans les jonctions serrées au niveau apical et va recruter au pôle apical le complexe Par3 grâce à une interaction PALS1/Par6/Crumbs. Le complexe Par6 va ensuite s'associer avec les protéines aPKC et LGL.^{112, 117}

Une liaison existe entre les gènes constituant les trois complexes apico-basale et les gènes de la voie PCP.^{118, 131, 139} Scrib1 interagissent génétiquement et physiquement avec

Vangl2 (Section 1.7.4). La protéine Dlg interagit avec la protéine Strabismus/Vang, et une surexpression de Dlg avec une surexpression de Vangl2 conduit à une formation abusive de la membrane.¹¹⁸ D'autres études ont montré que la phosphorylation d'aPKC règle l'activité ainsi que la stabilité de Frizzled, ce dernier est inhibé par d'autres protéines des complexes apico-basales qui sont Par3/Bazooka¹⁴². Dishevelled à son tour peut intervenir dans la régulation de la polarité apico-basale par la régulation de la protéine LGL.^{142, 143}

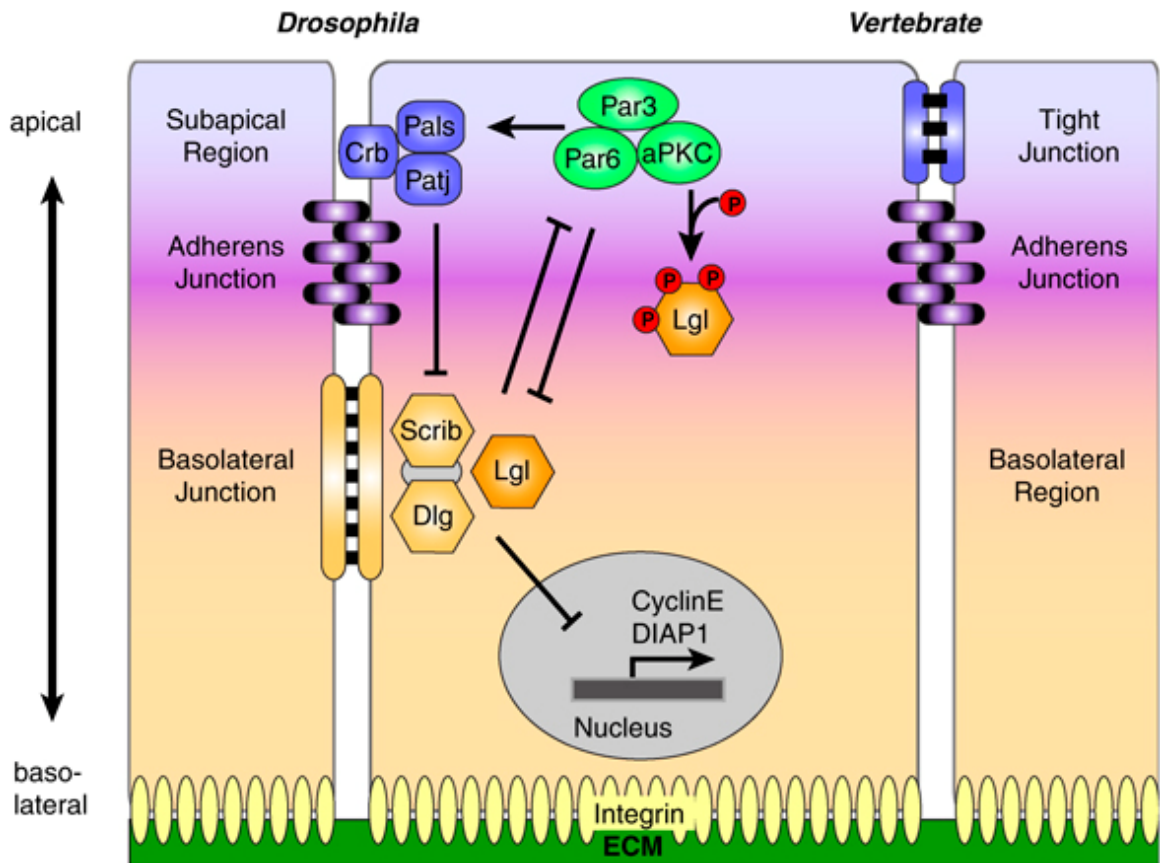


Figure 10 : Schéma présentatif montrant le rôle du Scribble au sein de la polarité apico-basale.¹⁶⁵

2. PROJET DE RECHERCHE

2. 1. Problématique

Les anomalies du tube neural (ATN) touchent 1-2/1000 naissance 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 l'embryogenèse. Dans leur première année de vie, les enfants atteints de ces maladies ont un risque de mortalité plus élevé, comparé aux enfants normaux.²⁴

Les ATN ont une étiologie complexe et multifactorielle impliquant des facteurs environnementaux et génétiques. Malgré un nombre des études génétiques des ATN, Le nombre et l'identité des gènes impliqués dans le développement des ATN restent jusqu'à présent largement inconnus¹⁴⁵.

2. 2. Hypothèses et objectives

La voie de signalisation non canonique du Frizzled (Fz)/Dishevelled (Dvl) est fortement impliquée dans le contrôle de la polarité cellulaire planaire (PCP) et du processus morphogénétique appelé l'extension convergente, qui est essentiel pour la gastrulation et la fermeture du tube neural. Plusieurs mutations dans les gènes de la voie non canonique Fz/Dvl qui causent une perte de fonction conduisent à des ATN chez la souris. Chez l'humain, des mutations des membres de la voie PCP, *VANGL1*, *VANGL2*, *PRICKLE1* et *CELSRI*, ont été associées aux ATN.^{147,148, 149,156, 161} Ces études impliquent fortement la contribution des principaux gènes de la voie PCP dans le développement des ATN chez l'humain.

Notre hypothèse est que le membre de la voie de signalisation non canonique du Fz/Dvl *SCRIBBLE1* est impliqué dans le développement des ATN chez l'humain.

Notre projet implique l'étude génétique du *SCRIBBLE1* chez une cohorte bien définie des patients atteints des ATN en ayant 2 objectifs principaux :

Objective 1. L'identification et la caractérisation des variantes rares (<5%) spécifiques aux ATN dans le gène *SCRIBBLE1* par des analyses de séquençage de son cadre de lecture et ses jonctions exons-introns.

Objective 2. L'identification des variantes communes (>5%) qui augmentent la risque pour les ATN par des études d'association.

2. 3. Pertinences et Retombés

Notre étude aidera à mieux comprendre le rôle de la voie PCP, et plus spécifiquement de *SCRIB1*, dans l'étiologie complexe des ATN chez l'humain. L'identification de gènes prédisposant aux ATN aidera à mieux comprendre les mécanismes pathogéniques impliqués dans ces maladies. Ces études sont essentielles pour caractériser les interactions entre les gènes et l'environnement dans les ATN, ce qui permettra de développer des nouvelles stratégies de prévention et de faciliter le conseil génétique pour les couples à risque.

2. 4. Matériels et Méthodes

2. 4. 1. Patients et contrôles

Notre étude comporte 391 patients recrutés au Centre Spina Bifida de l'hôpital Gaslini en Gènes, Italie en collaboration avec Dr. Valeria Capra et 82 patients recrutés au Centre Spina Bifida de l'hôpital Sainte Justine. Les 473 patients étudiés dans cette étude sont affectés par plusieurs formes d'ATN et ont été diagnostiqués selon le classement de Tortori-Donati (Tortori-Donati et al., 2000; Rossi et al., 2004; 2006). Les détails de cette cohorte sont décrits dans le tableau 1. En résumé, La répartition des principales formes d'ATN dans cette cohorte était comme suit: 2% crâniennes, 46% ouvertes spinales et 52% fermées spinales. Myéломéningocèle était l'ATN majeure dans cette cohorte à une fréquence de 45%. La majorité des patients inclus dans cette cohorte (97%) étaient caucasiens, 19% des patients ont un positif historique familial, documenté par les dossiers cliniques (IRM et des images avec des rayons X). Le statut de la consommation de l'acide

folique est connu seulement pour les mères des patients Italiens. Ces mères ont manqué l'acide folique avant et pendant leurs grossesses.

De plus, cette étude comporte 344 contrôles Italiens ethniquement appariés, recrutés à travers l'hôpital Gaslini et sélectionnés au hasard. Ce groupe contrôle constituait des enfants choisis au hasard et qui étaient admis à l'Hôpital Gaslini pour des maladies des enfants autres que les ATN, et des jeunes adultes en bonne santé qui ont contribué à la banque de sang de l'Institut Gaslini. Notre étude comporte aussi 123 contrôles caucasiens obtenus du Centre d'Étude du polymorphisme humain (<http://www.cephb.fr/>), et composé de plusieurs générations des familles de caucasiens comme des contrôles pour les patients atteints par des ATN d'origine caucasienne.

Tous les échantillons provenant des patients et des contrôles ont été recueillis avec l'approbation du comité local d'éthique ainsi qu'un consentement écrit éclairé a été obtenu à partir de tous les patients, les parents et les contrôles.

Tableau 1 : *Caractéristiques des 473 patients atteints par les ATN inclus dans notre étude.*

Origine ethnique	459 (97,04%) Caucasiens Blancs, 5 (1,05%) Espagnoles, 3 (0,63%) Haïtiens, 4 (0,84%) de l'Afrique du nord, 2 (0,42%) Moyen-Orient Asiatiques
Sexe Masculin (%)	44
Age moyenne (ans)	2.6
Dysraphie Craniale	11
Anencéphalie	1
Céphalocèle	10
ATN ouvertes	215
Myéломéningocèle	214
Myélocèle	1
ATN fermées	186
Lipomyéломéningocèle	37
Lipomyeloschisis	34
Myélocystocèle Terminal	1
Méningocèle	12
Lipome	48
Tight filum terminale	17
Sinus dermique	3
Diastématomyélie	17
Type inconnu	17
Agénésie caudale	61

2. 4. 2. Séquençage et Génotypage

L'isolation et l'extraction de l'ADN génomique ont été réalisées avec le kit QIAamp (KIT de l'ADN sanguin) de Qiagen, selon le protocole du fabricant. La structure génomique du gène humain *SCRIBBLE1* a été déterminée en utilisant les banques de données génomiques NCBI (GenBank Accession No. NM_015356) et Ensembl (<http://useast.ensembl.org>) Genome Browser (*SCRIB1* Transcript ID : ENST00000356994). Le cadre de lecture du *SCRIB1* est de 4968 bp et comprend 37 exons. Les exons des cadres de lecture du *SCRIB1* ainsi que les jonctions intron-exon ont été amplifiés par réaction de polymérase en chaîne (PCR), pour les 473 patients ainsi que pour les 467 contrôles. L'amplification est réalisée à l'aide de l'AmpliTaqGold (Applied Biosystems) utilisé dans la PCR par essais (Touchdown PCR) pour amplifier de l'ADN faiblement représenté et/ou subissant une compétition sur leurs amorces par des produits de pseudo-gène. Il consiste à avoir une température d'hybridation très haute lors des premiers cycles afin d'assurer une forte stringence et donc une amplification spécifique. Une fois que la séquence d'intérêt devient majoritaire vis-à-vis de ses compétiteurs, la température d'hybridation est progressivement abaissée afin d'assurer une meilleure efficacité de PCR. Toutes les amorces étaient préparées d'une façon manuelle (Tableau 2) pour tous les 23 amplicons (chacun peut contenir jusqu'à trois exons). « Direct Dye Terminator » séquençage des produits de PCR a été réalisée en utilisant les ABI Prism Big Dye Systems. Les échantillons ont été analysés sur séquenceur ABI 3700 automatisée au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

Le génotypage des variantes rares de *SCRIB1* dans les contrôles (**Section 2.4.1**) et des SNP (single nucleotide polymorphisms) dans les patients et les contrôles (**Section 2.4.5**) a été fait en utilisant la technologie Sequenom iPLEX Gold. Ce dernier est une technique qui a comme but l'analyse de 5 - 400 loci (SNP et indel) en parallèle. La réaction de génotypage est basée sur une PCR en multiplexe suivie d'une extension en simple base dirigée par une sonde (template-directed single base extension - SBE). Les

produits d'extension sont ensuite séparés et détectés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS).¹⁶⁰ Les tag SNPs étaient identifiés en utilisant le programme Tagger (www.broadinstitute.org/mpg/tagger/). Tagger est un outil pour la sélection et l'évaluation de marqueurs SNP à partir des données génotypiques tels que celui du Projet international HapMap (www.hapmap.org).¹⁶⁴

Tableau 2 : *Amorces pour amplifier les différents Fragments de SCRIB1.*

Exon	Primer	Exon	Primer
1	F;GGCGGCCGGGTGGGTGTCG R;TCTGCCCGCCGGAGGAATCA	19	F;CCACACCGGGTTTCAGAGGA R; CGGCAATGCGGGAGACGA
2-4	F;TGCAAATGGGGTGTCTGGTTAGA R; AGGCGCTGGGGCAAGAGGA	20-21	F;GCGAGAGGGGGCTGGGCTTCA R; CCTGGGTGGGGCTTGTGTCTCA
5-7	F;CTCAGGTGGAAGTAGGGTGG R; CTGCAGGTGGGCAGAGAG	22	F;CCTTGCGGCCACTCCA R; CGTCTTGCCCGTTCCTGC
8	F;GTGAGTCAGGGTGGGGC R; TCCACACCACACACAGCC	23	F;ATCCAGGCGGTTCTGTGAG R; TGTGGGGAGACGTGGTATG
9	F;TTCTGGCCAGGTGGGTAAG R; AGACACAGGCTGATGCCC	24	F;GCATCTTCATCTCCAAGGTG R; GAGAGGTGTCAGCGGCTC
10-11	F;GGGTGTCTGTGCCCTCC R; AGGACCCAGGCTAGTCCC	25-27	F;CCGTTGCTGACTATTCTGGG R; CGTTTGTCTGCGGGTGG
12-13	F;AGCCTCGGTAGGTTGTTGG R; ACTCCAGGATGGACCG	28	F;CCAGTCCCTCCTGGTCCG R; CATCCCTGGAGGAGGGG
14	F;CGTTAACGGTGCCTGGTC R; CTGCACCAAACCGATCC	29-30	F;ACAGCCGGTGGTGAGTTG R; TGCTGTAGTTTTCTGGCTGC
15	F;GAGTCTTTGTGTGGCGGG R; AGGGGCCAGTGGGTCAG	31-32	F;GAGGAGGAAGGTGAGGGG R; CTGCAGAGAACAGCGGG
16	F;TCTGTCCTTTCTGCTTGTGG R; AGAGGGATCTGCGCTCAAG	33-35	F;TGTCCCTGCTCCTGCCCCAAGTCA R; TGCCAGCCCTGCCCCAAACCAC
17	F;CAGAAATGGCATCTGCGTG R; CTGTGTGCCATCAGTGTGAAC	36-37	F;TTCAGCCGGGCTCTGTG R; TAAAAGACTTGGGGCAAGGG
18	F;GTCTTCCCCTCCTGGGTC R; GCAGCCAAGCACCCCTAATAC		

2. 4. 3. Outils Bioinformatiques

Les séquences étaient analysées en utilisant le logiciel PhredPhrap. Phred est un programme de base-vocation des traces de séquences d'ADN; phrap est un programme pour l'assemblage de séquences d'ADN. Les variantes identifiées par PhredPhrap étaient vérifiées par le logiciel **SeqMan de DNASTAR** qui représente un outil de montage de séquence permettant d'assembler deux séquences à des dizaines de milliers de séquences en contigs.

Dans notre étude, la stratégie d'analyse se concentrait sur les régions codantes où la majorité des mutations pathogéniques chez l'humain sont trouvées¹⁴⁸. Tous les variations de séquence identifiées dans *SCRIB1* ont été interrogées contre trois bases de données publiques: la dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), le projet sur le génome 1000 (<http://www.1000genomes.org>) et le NHLBI GO exome projet de séquençage (ESP) (<http://snp.gs.washington.edu/EVS/>). Les nouvelles mutations rares (<5%) ont été confirmées dans un second tour de séquençage de l'échantillon d'ADN d'origine.

Le niveau de la conservation des acides aminés affectés par les variantes identifiées dans *SCRIB1* a été évalué après l'alignement multiple de 7 protéines orthologues de SCRIB1 (Humain, Souris, Drosophile, Xenopus, Poissons zèbre, Gallus, Caenorhabditis elegans) en utilisant le programme CLUSTALW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html). La localisation des variantes dans les domaines de la protéine Scrib1 a été évaluée par **Uniprot** (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q14160>).

L'impact pathogénique potentiel des nouvelles mutations rares identifiées dans *SCRIB1* a d'abord été validé génétiquement par des études d'association allélique (absence de la variante chez les contrôles). Pour les nouvelles mutations faux-sens absentes des contrôles et des bases de données publiques, leurs effets sur la protéine a été prédit in silico en utilisant le **PolyPhen** (Polymorphism phenotyping) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) et **SIFT** (<http://sift.jcvi.org/>). Ces deux programmes prédisent l'impact possible d'une substitution d'un acide aminé sur la structure et la fonction

de la protéine humaine (Polyphen), ainsi en utilisant l'homologie de séquence et les propriétés physiques des acides aminés (SIFT). Les deux programmes ont été utilisés avec leurs conditions initiales (par défaut).

2. 4. 4. Analyses statistiques

Un test du Chi Carré a été utilisé pour comparer la fréquence des mutations chez les patients par rapport aux contrôles.

2. 5. Résultats

2.5.1. Mutations rares < 1% dans *SCRIB1* dans les ATN

Dans cette étude, nous rapportons une étude génétique moléculaire de *Scrib1* par l'analyse et le ré-séquençage de son cadre de lecture et jonctions exon-intron dans une grande et multi-ethnique cohorte de patients. Nous avons détecté un total de 9 mutations faux sens et rares (fréquence allylique mineure ou MAF <1%) dans *SCRIB1* dans 9 patients atteints des ATN (Tableau 3). 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**) identifiées dans 2 patients (IT218 et IT33 successivement) étaient présentes chacune dans un contrôle et aussi déjà répertoriées dans dbSNP avec une fréquence de 0.01 pour chacune des deux mutations.

Un total de 7 mutations, p.Gly263Ser, p.Pro649His, p.Gln808His, p.Arg1150Gln, p.Thr1422Met, p.Gly469Ser et p.Val1066Met représentaient des nouvelles mutations qui n'étaient pas répertoriées dans les banques de données publiques. Parmi ces 7 mutations, 2 mutations, p.Gly469Ser et p.Val1066Met, étaient présentes chacune dans deux contrôles de notre cohorte. Le reste des mutations (5 mutations) étaient absentes dans tous les 467 contrôles. La première mutation, p.Gly263Ser, était détectée dans le patient IT75, qui était

affecte par une lipomyéломéningocèle (LMMC) (Tableau 3) avec un bas cône médullaire, hydromyélie accompagnée d'un anus microscopique et disloqué. Cette mutation affecte un acide aminé situé dans le domaine LRR et conservé dans les 8 espèces (mentionnée dans la section 2.4.3) sauf les poissons zèbres et *C. elegans* (**Caenorhabditis elegans**). La **deuxième** mutation, p.Pro649His, était détectée chez le patient IT383 atteint de l'agénésie caudale de type II accompagnée d'un sinus dermique, une moelle attachée, un reflux vésicale urétéral, une agénésie costale, un ptosis (chute de la paupière supérieure) et un déficit de croissance remarqué surtout dans une hypoplasie au niveau du bras droit. Cette mutation affecte un acide aminé situé dans le domaine qui lie les LRR et le domaine PDZ et qui est conservé seulement chez les mammifères. La **troisième** mutation, p.Gln808His, a été détectée chez le patient IT165 atteint d'une myéломéningocèle (MMC) accompagnée d'une hydrocéphalie, malformation de Chiari II, un syndrome de moelle attachée, des pieds équins, et une puberté précoce. Cette mutation touche un acide aminé localisé au niveau du domaine PDZ1 et conservé seulement chez les mammifères. La **quatrième** mutation, p.Arg1150Gln, a été détectée chez le patient IT37 atteint d'une myéломéningocèle accompagnée d'une hydrocéphalie et d'une malformation de Chiari II. Cette mutation affecte un acide aminé qui est conservé chez tous les espèces utilisées dans notre alignement sauf les *Xenopus Tropicalis* et *C. elegans*. La mutation est localisée au niveau du domaine PDZ4 (qui est un domaine très important pour l'interaction avec Vangl2). La **cinquième** mutation, p.Thr1422Met, a été détectée chez le patient IT239 atteint d'une myéломéningocèle, hydrocéphalie et d'une malformation de Chiari II. Cette mutation est située au niveau de C-terminale (on ne connu pas le rôle encore) et affecte un acide aminé qui n'est pas conservé chez les autres espèces.

Tableau 3 : Mutations rares (<1%) identifiées dans *SCRIB1* chez les patients atteints des ATN

CD, dysraphisme crâniale ; CRS, caudal régression syndrome; MMC, myéломéningocèle; LMMC, lipomyéломéningocèle

D: Endommagé B: Bénin

N/T: Non Toléré T: Toléré

Acide aminé	D93A	G145R	G263S	G469S	P649H	Q808H	V1066M	R1150Q	T1422M
Mutation	A278C	G435A	G787A	G1407A	C1945A	G2426T	G3198A	G3449A	C4267T
Polyphen	D	B	D	D	D	D	D	B	B
Sift	N/T	N/T	T	T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T
Patients	IT218	IT33	IT75	IT18, IT165	IT383	IT165	34398	IT37	IT239
Diagnostic clinique	MMC	MMC	LMMC	MMC	CRS	MMC	MMC	MMC	MMC
Exon	3	4	8	13	15	19	23	24	31
Présence chez Les contrôles	1	1	0	2	0	0	2	0	0

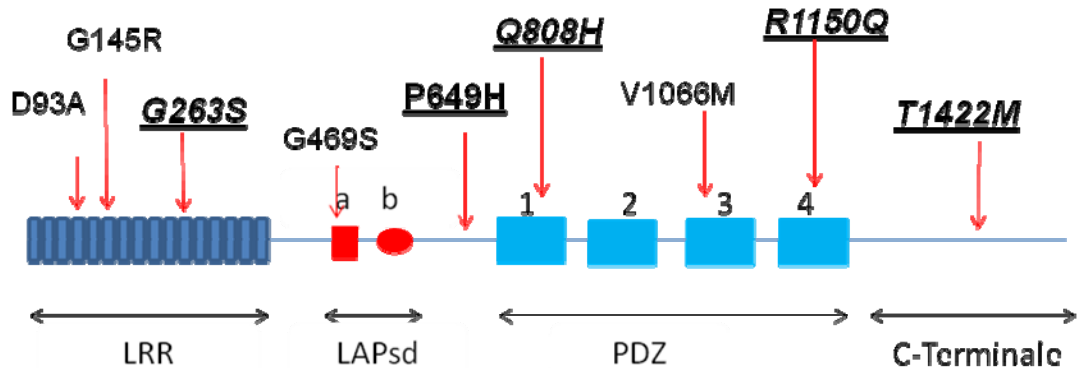


Figure 11 : Schéma représentatif de la protéine *Scrib1* montrant la localisation des mutations. Les mutations absentes chez les contrôles sont notées en gras et souligner.

	p.Gly263Ser ↓	p.Pro649His ↓	p.Gln808His ↓
humain	LLSQNLLRRLFDGIGQLKQL	NGPHAWAPRAKEREEREKGS	AVEALRGAGTAVQHRVWRER
musculus	LLSQNLLQRLFDGIGQLKQL	NGPHTPWAPRAHEEEEEEE--	AVEALRGAGAAYQHRVWRER
Rattus	LLSQNLLQRLFDGIGQLKQL	NGPHTPWAPRAHEEEEEEE----	AVEALRGAGAAYQHRVWRER
Gallus	LLSQNLLLECI FDGIGQLKQL	KEREELGCMNIVEPEDEE--	AVEALRGSQSVSHTVLRER
Danio rerio	LLSENLEILFDGIGSLKKL	TPENERDGEDDEEEDEDEED	AVEALRNSGAAYVHTVLRER
Xenopus	LVSNHSTIVLFDGIGKLNKL	-----	-----
drosophila	DLAQNLEALFDGIKLRRL	TQKHLQCKVTSPIEEEE-Q--	AVQVLKACGAVLVLVQREY
Caenorhabditis	NISINHEIIEFSSFGELKRL	-----LS-----PEREER----	-----
Prim. cons.	LLSQNLLERLFDGIGQLKQL	NGPH22#2 PRAHEEEEEEE22	AVEALRGAGAAYQHRVWRER

	p.Arg1150Gln ↓	p.Thr1422Met ↓
humain	SKYSPTGAAGRDGRLRVGLRL	----AEARLALDGETLGEEEQ
musculus	SKYSPTGAAGRDGRLRVGLRL	----PDNGLASDRESQ-DDQQ
Rattus	SKYSPTGAAGRDGRLRVGLRL	----PDTGLASDRESL-DDEQ
Gallus	SKYSSEGAARDGRLRVGNRI	PENGNOSTVIIEGVYKIERL
Danio rerio	SKYSINGAARDGRLRVGNRI	AHNKANGKVVLDGVEYKVESL
Xenopus	-----	-----
drosophila	SKINRYGAARDGRLRVGNRL	----PAAFLSAGAES-ANSA
Caenorhabditis	TSTTIVYAS-----	-----
Prim. cons.	SKYSPTGAAGRDGRLRVG2RL	22N2PDAGLA3DGE22KDE2Q

Figure 12 : Alignement partiel des 5 mutations identifiées chez les différents patients (absents chez les contrôles) avec 7 autres séquences de SCRIBBLE1. Numéros d'accèsion : humain NP_874365.2, musculus NP_598850.1 Rattus XP_343267.2 Gallus XP_427026.2 Danio rerio NP_001007176.1; Xénopus XP_002943523; Drosophila NP_001163747.1 Cenorhabditis NP_001023851.1

2.5.2. Études d'association

Tableau 4. *Les fréquences allyliques et génotypiques chez les patients ATN et les contrôles*

			Caucasiens	
			Contrôles (N= 184)	Patients (N=170)
rs4875054 : C>T	Allèle	C	0.61	0.58
		T	0.39	0.42
	Génotype	CC	0.37	0.37
		CT	0.49	0.42
		TT	0.14	0.20
rs4875059 : G>T	Allèle	G	0.90	0.92
		T	0.10	0.08
	Génotype	GG	0.82	0.86
		GT	0.17	0.13
		TT	0.01	0.01
rs118022661 : G>A	Allèle	G	0.92	0.91
		A	0.08	0.09
	Génotype	GG	0.85	0.83
		GA	0.15	0.16
		AA	0	0.01
rs117338714: G>A	Allèle	G	0.93	0.95
		A	0.07	0.05
	Génotype	GG	0.88	0.92
		GA	0.11	0.07
		AA	0.01	0.01
p. His1217Pro c. 3651 : A>C	Allèle	A	0.97	0.96
		C	0.03	0.04
	Génotype	AA	0.94	0.93
		CA	0.06	0.06
		CC	0	0.01
p.Pro1609Leu c. 4827 : G>A	Allèle	G	0.98	0.98
		A	0.20	0.20
	Génotype	GG	0.96	0.96
		AG	0.04	0.04

Deux nouvelles mutations p. His1217Pro (c. 3651A>C), p.Pro1609Leu (c. 4827G>A) étaient identifiées dans *SCRIB1* chez les patients ATN avec des fréquences de 6.54% et 3.57% respectivement. Les analyses avec les programmes Polyphen et SIFT ont montré que la mutation p.Pro1609Leu est tolérée et non dommageable pour la structure et la fonction de la protéine de *SCRIB1*. Tandis que, pour la mutation p. His1217Pro, Polyphen a prévu un dommage dans la structure et la fonction de la protéine. Nous avons effectué une étude d'association entre 9 SNPs de *SCRIB1* et les patients atteints des ATN. Les SNPs testés étaient : les deux nouvelles mutations détectées dans le gène *SCRIB1*, p. His1217Pro, et p.Pro1609Leu, deux SNP qui étaient prédits d'être pathogéniques rs118022661(**chr8:144,891,518-144,892,018**)¹⁷² (p. Ala1217Thr (c. 1653G>A)) et rs117338714 (**chr8:144,873,828-144,874,328**)¹⁷² (p. Gly1555Ser (c. 4665G>A)) et quatre autres « tag » SNP rs4875054 (**chr8:144,875,338-144,875,838**),¹⁷² rs4875059 (**chr8:144,893,765-144,894,265**),¹⁷² rs118022661, rs117338714 sélectionnés à partir de la population HapMap CEU. La cohorte utilisée dans cette étude d'association constituait de 164 patients italiens atteints de la myéломéningocèle (le principal sous-type des ATN et le principal groupe ethnique dans notre cohorte) et de 184 contrôles italiens. Aucune association significative n'a été détectée entre ces différents SNP et la myéломéningocèle dans ce groupe (Tableau 4).

Des études d'association des variantes communes de *SCRIB1* dans une cohorte plus large sont essentielles nous permettra à tirer des conclusions plus claires et définitives sur l'association de ce gène avec les ATN.

3. DISCUSSION

Ce travail de Maitrise s'inscrit dans le programme de recherche du laboratoire qui consiste à étudier la génétique moléculaire des anomalies congénitales de système nerveux central et squelettique. Mon projet impliquait essentiellement le rôle du gène *SCRIBBLE1* dans le développement des ATN chez l'humain.

Nous avons identifié 5 nouvelles mutations faux sens et rares (<5%) dans *SCRIB1* dans 5 sur 473 patients. Ces mutations étaient spécifiques aux patients atteints par les ATN et absentes dans les données publiques et dans 467 contrôles ethniquement appariés. Deux mutations, p.Gly263Ser et p.Arg1150Gln, affectent des acides aminés hautement conservés et 2 mutations, p.Pro649His et p.Gln808His, affectent des acides aminés conservés seulement chez les mammifères. Les analyses bioinformatiques ont démontré que tous les 5 mutations pourraient être dommageables pour la fonction de la protéine. Nos résultats sont cohérents avec une étude récemment publiée des mutations potentiellement pathogéniques dans *SCRIB1* chez les fœtus atteints de l'ATN craniorachischisis.¹⁶⁶ Notre étude et celle de Robinson et al. (2011) suggèrent que les mutations rares dans *SCRIB1* pourraient contribuer à la pathogenèse des ATN dans une petite fraction des patients.

Les 5 mutations détectées dans *SCRIB1* ont été identifiées dans des ATN ouvertes (3 myéломéningocèle) et fermées (1 lipomyéломéningocèle et 1 agénésie caudale), suggérant un défaut moléculaire sous-jacent commun dans les deux principales formes des ATN. Toutes les mutations ont été détectées dans des cas sporadiques et étaient privées. Les parents des patients n'étaient pas disponibles pour déterminer si ces mutations sont « de novo » ou sont transmises de l'un des parents avec une faible pénétrance. Un patient était hétérozygote composé pour p.Gln808His et p.Gly469Ser; cette dernière était détectée dans 2 contrôles italiens. Comme pour les autres maladies complexes, les mutations détectées dans *SCRIB1* dans les ATN, doivent interagir avec des autres variantes génétiques et facteurs environnementaux inconnus afin de moduler l'incidence et la sévérité du phénotype.

Le nombre de patients porteurs de nouvelles mutations prévues pour être pathogéniques détectées dans *SCRIB1* dans cette étude (5 sur 473; 1%) est comparable à d'autres études de gènes PCP dans les ATN (1% pour *VANGL2*; 2,1% et 1% pour *VANGL1*, 0,8% pour *PRICKLE1* et 2.9% pour *CELSRI*).^{67, 102,156} Notre cohorte de cette étude se ressemble avec les cohortes utilisées dans nos études précédentes de 4 gènes PCP, *VANGL1*, *VANGL2*, *PRICKLE1* et *CELSRI*. Nous avons identifié 2 patients qui étaient doubles hétérozygotes pour des mutations dans *SCRIB1* et *CELSRI* : p.Gly145Arg (*SCRIB1*) et p.Gln834X (*CELSRI*) étaient détectées dans un patient atteint d'une myéломéningocèle localisée dans D12-L1, malformation Chiari II, hydrocéphalie et hydromyélie; p.Gly263Ser (*SCRIB1*) et p.Asp1401Gly (*CELSRI*) étaient détectées dans un patient atteint d'une myéломéningocèle, malformation Chiari II et hydrocéphalie. Ca sera particulièrement intéressant de tester l'interaction génétique entre ces mutations des 2 différents gènes PCP détectées dans le même patient.

La protéine Scrib1 est une protéine qui interagit avec Vangl2 par l'intermédiaire des domaines PDZ 2, 3 et 4^{101, 131}. Des mutations qui ont été découvertes chez les souris au niveau de gène *Scrib1* conduisent à un défaut de fermeture de tube neural au niveau du point de fermeture 1, ce qui résulte un craniorachischisis^{102, 113}. Cette protéine intervient aussi dans la polarité apico-basale où elle établit plusieurs interactions via son domaine LRR et le domaine PDZ¹¹⁷. Les mutations potentiellement pathogéniques identifiées dans *SCRIB1* dans notre étude pourraient affecter ces interactions de Scrib1 avec ses partenaires dans la voie PCP ou dans la polarité apico-basale.

3. 1. Effet potentiel des mutations identifiées dans les domaines PDZ de *SCRIB1*

Scrib1 et *Vangl2* interagissent génétiquement et physiquement. L'interaction physique est réalisée à travers les domaines PDZ 2,3 et 4 de Scrib1 et de PDZ-BDM (PDZ-Binding Domain Motif) de Vangl2^{101, 131}. La souris circletail contient une insertion d'une seule base qui crée un décalage du cadre et conduit à une terminaison prématurée de la Scrib1 protéine juste après le domaine PDZ2. La protéine tronquée manque les 2 domaines

PDZ3 et PDZ4 et l'extrémité C-terminale. Cette mutation conduit à un défaut sévère dans la fermeture de tube neural, ce qui prouve l'importance de ces domaines dans la fonction de la protéine dans la voie PCP pendant ce processus embryonnaire¹³¹. Des études réalisées en France en 2006 par le groupe de Montcouquiol ont pu montrer par l'utilisation de la technique GST Pull Down que l'interaction de Scrib1 avec Vangl2 s'affaiblit lorsqu'on enlève le PDZ1 et s'intensifie dans le cas normal (présence de PDZ1)¹⁰¹. Deux mutations de *SCRIB1* identifiées dans notre étude, p.Gln808His et p.Arg1150Gln, sont localisées dans les domaines PDZ 1 et 4 respectivement. L'analyse bio-informatique de ces 2 mutations avec les programmes SIFT et Polyphen prédit des dommages dans la structure ainsi que dans le fonctionnement de la protéine Scrib1. Ces mutations pourraient affecter l'interaction avec la protéine Vangl2.

La protéine LPP est un marqueur des cellules musculaires lisses et intervient dans la régulation de la migration de ces cellules. Une interaction directe entre l'extrémité C-terminale de la protéine LPP (LIM domain containing preferred translocation partner in Lipoma) humaine et les domaines PDZ de Scrib humain a été montrée récemment. Cette interaction joue un rôle important dans la régulation de la CE pendant la gastrulation chez les poissons zèbres.¹⁴⁹ Les 2 mutations de *SCRIB1*, p.Gln808His et p.Arg1150Gln, localisées dans les domaines PDZ 1 et 4 respectivement pourraient affecter l'interaction de Scrib1 avec Lpp. Ce défaut d'interaction pourrait affecter le phénomène de la CE important pour la fermeture de tube neural.

3. 2. Effet potentiel des mutations identifiées dans le domaine LRR de *SCRIB1*

L'alignement du domaine LRR de SCRIB dans les différentes espèces animales montre une très grande conservation de tous les acides aminés qui le constituent sauf chez la *C.elegans*. Les domaines LRR interviennent dans la stabilisation du complexe SCRIB1 au cœur de la polarité apico basale, l'instabilisation de ce complexe conduit à l'instabilisation de cette polarité et par la suite à des effets néfastes sur la structure épithéliale. Une mutation de *SCRIB1* identifiée dans notre étude, p.Gly263Ser, est située

dans le domaine LRR de la protéine Scrib1 (**Section 3-1**). Cette mutation pourrait affecter l'interaction de la protéine Scrib1 avec les différents membres du complexe SCRIBBLE 1 qui intervient dans la polarité apicobasale, ce qui pourrait avoir un effet indirecte sur la PCP pendant la fermeture du tube neural. Alternativement, cette mutation pourrait affecter la fonction du SCRIB1 dans la voie PCP indépendamment de la polarité apicobasale à travers des interactions inconnues à date. En effet, l'importance des domaines LRR de Scrib1 dans la fermeture du tube neural était montrée dans une souris mutante générée par l'ENU et qui souffre de la sévère ATN « craniorachischisis ». Cette mutante interagit génétiquement avec la souris Looptail (causée par une mutation dans le gène PCP Vangl2) et est causée par une mutation, p. ILE285Lys dans le domaine LRR 3 de Scrib1.

3. 3. Des études futures de validation fonctionnelle des mutations de *Scrib1*

Pour mieux comprendre le rôle de *Scrib1* dans la fermeture du tube neural, il serait très important de poursuivre les études fonctionnelles des mutations identifiées dans notre étude afin d'identifier les mécanismes par lesquels ces mutations pourraient affecter les interactions de Scribble1 avec ses partenaires dans la polarité planaire cellulaire ainsi que dans la polarité apico-basale. Plusieurs méthodes de validation fonctionnelle nous permettront d'investiguer la capacité des variantes de *SCRIB1* d'affecter l'interaction de Scribble1 avec Vangl2 et/ou avec Lpp pendant la signalisation de la voie PCP (p.Gln808His et p.Arg1150Gln), ainsi qu'avec ses partenaires dans le complexe SCRIBBLE1 dans la polarité apico-basale (p/Gly263Ser). La méthode du système double hybride (Yeast two hybrid, Y2H) chez la levure représente une méthode très efficace afin de mesurer des interactions directes entre 2 protéines. Ce système avait déjà été utilisé pour tester l'effet des mutations au niveau de *VANGL1* sur les interactions avec Dvl permettant ainsi de conclure l'effet pathogénique d'une de ces mutations.⁶⁷

Le poisson zèbre est un modèle bien adapté pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de gastrulation et de la fermeture du tube neural chez les vertébrés. En particulier, les membres de la voie PCP sont très conservées chez le poisson

zèbre, où l'abrogation de leurs activités ou leur surexpression conduit à divers défauts de l'extension convergente (EC), y compris le raccourcissement marqué de l'axe antéro-postérieur.⁷⁰ Ce modèle puissant pourrait être utilisé pour valider l'effet des 5 mutations, p.Gly263Ser, p.Pro649His, p.Gln808His, p.Arg1150Gln, p.Thr1422Met), sur le processus de la CE chez l'embryon. Des études de surexpression du *Scrib1* chez les poissons zèbres ont montré un défaut important de l'EC.¹⁴⁰ Une surexpression d'une variante de *Scrib1* qui ne cause pas un défaut de l'EC suggère une perte de fonction de la protéine mutée.

3.4. Les animaux comme modèles puissants pour les études génétiques des ATN humains

Des études sur la PCP effectuées chez plusieurs modèles animaux (la Drosophile, la souris, le poisson zèbre et la grenouille) ont pu démontrer une très grande conservation des gènes de cette voie et un rôle très important au cours de la neurulation. La découverte du gène responsable pour l'ATN de craniorachischisis chez la souris Lp, *Vangl2*⁹³, a déclenché plusieurs études sur des souris modèles atteintes des ATN. Ces études ont permis d'identifier d'autres gènes de la voie PCP et de les rajouter sur la liste de facteurs génétiques qui jouent un rôle important dans la fermeture du tube neural chez les vertébrées. Un total de 14 gènes sont connus pour générer un phénotype de craniorachischisis chez les souris modèles. Tous ces gènes, sauf *Ptch1*, affectent la voie PCP et sont capables de générer ce phénotype. L'identification de gènes défectueux dans ces souris mutantes a fourni un point d'entrée pour des études génétiques moléculaires des homologues et orthologues des gènes PCP chez les ATN humaines. Plusieurs études ont montré des mutations dans les gènes *VANGLI1*, *VANGL2*, *PK1*, *DIVERSIN* et *CELSRI1*, qui étaient associées avec une faction des ATN humains (Section 1.4.3.1).^{69, 147, 149,156} Ces études confirment la puissance de la souris modèle pour les études étiologiques des ATN humaines.

4. Futures directions et défis

L'identification de gènes prédisposant aux ATN humains a été entravée par l'étiologie complexe de ces malformations. Les études des gènes candidats, incluant cette étude et les autres études des gènes PCP, ont identifié des mutations associées à la maladie dans une petite fraction des patients. Ces mutations sont incomplètement pénétrantes, limitant le succès de ces études. Des avancées importantes dans les technologies de la génomique ont le potentiel de révolutionner l'exploration de ATN en permettant l'analyse génétique des lésions au-delà des mutations ponctuelles dans des exons codants connus.

Des données intéressantes ont émergé sur le rôle des variants d'ADN du nombre de copies (CNV) comme une cause importante de troubles neurodéveloppementaux et des malformations congénitales.¹⁶² La nouvelle technologie d'hybridation génomique comparative (aCGH) peut surveiller tout le génome pour la détection de larges segments de déséquilibre génomique qui sont habituellement détectables par caryotype ainsi que les petites CNV.¹⁶³ Plusieurs délétions et insertions qui ne sont pas détectables au niveau microscopique avaient été impliquées dans d'autres classes d'anomalies congénitales telles que le retard mental¹⁵¹. Ce genre de lésions génétiques pourrait ainsi jouer un rôle important dans la pathogenèse des ATN.

Les études des gènes candidats incluant cette étude se concentraient sur les régions codantes et les jonctions intron-exon où la majorité des mutations des maladies étaient identifiées. Par contre, des mutations dans les régions régulatrices telles que le promoteur ou les régions non traduites pourraient être pathogéniques comme elles pourraient affecter le niveau de transcription du gène. L'étude et l'investigation de ces régions seraient un but parmi les prochaines étapes nécessaires dans notre étude et les autres études génétiques des ATN.

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.³⁷ Les modifications épigénétiques peuvent être aussi investiguées à l'échelle génomique par l'utilisation de l'immunoprécipitation de chromatine sur puce à ADN (ChIP-chip). Le manque de tissus des patients affectés pose un grand problème dans ce genre d'étude, ce qui marque leurs limitations, mais on peut anticiper la puissance des souris modèles pour les études de la méthylation dans les ATN.

Finalement, l'utilisation des technologies de séquençage de prochaine génération est capable de séquencer des exomes entiers ou des génomes des patients atteints des ATN. Les mutations identifiées lors du séquençage de la totalité des régions codantes ou du génome de chaque patient atteint des ATN, permettront potentiellement l'identification des nouveaux gènes qui sont impliqués dans la pathogenèse des ATN. Un défi majeur impliqué dans ces technologies innovantes est la gestion et l'analyse des ensembles de données massifs qui seront générés.

Conclusion

Nous avons identifié dans cette étude 9 mutations dont 5 sont des nouvelles mutations hétérozygotes, spécifiques aux patients, dans le gène de la polarité planaire cellulaire *SCRIBBLE1*. Les cinq mutations avaient été prédites par des méthodes bioinformatiques d'être pathogéniques. Cela suggère qu'ils ont, probablement, pathogénique et indique la nécessité des études supplémentaires (validation fonctionnelle par le système double hybride) pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces mutation identifiées dans notre étude peuvent être prédisposantes, pour les anomalies du tube neural dans la population humaine. Les 5 mutations de *SCRIBBLE1* comptent pour une proportion de 1% de cette cohorte et considérées ensemble, les mutations identifiées jusqu'à présent dans ce gène pourraient justifier une partie des anomalies du tube neural chez l'humain. De cette perspective, l'analyse moléculaire de ce gène de la voie PCP sera un excellent outil pour mieux comprendre la pathogenèse de ce spectre de malformations congénitales.

Bibliographie

1. *Gray's Anatomy*. Thirty-eighth Edition. Churchill Livingstone
2. Gilbert SF. *Developmental Biology*. Eighth Edition. Sinauer Associates Inc. 2006.
3. Rossi, Andrea, Roberta Biancheri, Armando Cama, Gianluca Piatelli, Marcello Ravegnani, et Paolo Tortori-Donati. « Imaging in spine and spinal cord malformations ». *European journal of radiology* 50, n° 2 (mai 2004): 177-200.
4. Wallingford, John B. « Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns ». *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 135C, n° 1 (mai 15, 2005): 59-68.
5. Wallingford, John B, Scott E Fraser, et Richard M Harland. « Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development ». *Developmental cell* 2, n° 6 (juin 2002): 695-706.
6. Keller, R. E., et al. Convergent extension by cell intercalation during gastrulation of *Xenopus laevis*. In *Molecular Determinants of Animal Form* (ed. G. M. Edelman). 1985a; 111-141.
7. Ybot-Gonzalez, P, et A J Copp. « Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 215, n° 3 (juillet 1999): 273-283.
8. Hildebrand, J. D. « Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network ». *Journal of Cell Science* 118, n° 22 (octobre 25, 2005): 5191-5203.

9. Ybot-Gonzalez, Patricia, Carles Gaston-Massuet, Gemma Girdler, John Klingensmith, Ruth Arkell, Nicholas D E Greene, et Andrew J Copp. « Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling ». *Development (Cambridge, England)* 134, n°. 17 (septembre 2007): 3203-3211.
10. Eom, Dae Seok, Smita Amarnath, Jennifer L Fogel, et Seema Agarwala. « Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway ». *Development (Cambridge, England)* 138, n°. 15 (août 2011): 3179-3188.
11. Ybot-Gonzalez, Patricia, Patricia Cogram, Dianne Gerrelli, et Andrew J Copp. « Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure ». *Development (Cambridge, England)* 129, n°. 10 (mai 2002): 2507-2517.
12. Copp, Andrew J, et Nicholas D E Greene. « Genetics and development of neural tube defects ». *The Journal of pathology* 220, n°. 2 (janvier 2010): 217-230.
13. Camerer, Eric, Adrian Barker, Daniel N Duong, Rajkumar Ganesan, Hiroshi Kataoka, Ivo Cornelissen, Molly R Darragh, et al. « Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo ». *Developmental cell* 18, n°. 1 (janvier 19, 2010): 25-38.
14. Holmberg, J, D L Clarke, et J Frisé. « Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor ». *Nature* 408, n°. 6809 (novembre 9, 2000): 203-206.
15. Copp, Andrew J, et Nicholas D E Greene. « Defining a PARTICULAR pathway of neural tube closure ». *Developmental cell* 18, n°. 1 (janvier 19, 2010): 1-2.
16. Copp, Andrew J, Nicholas D E Greene, et Jennifer N Murdoch. « The genetic basis of mammalian neurulation ». *Nature reviews. Genetics* 4, n°. 10 (octobre 2003): 784-793.

17. O’Rahilly, Ronan, et Fabiola Müller. « The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo ». *Teratology* 65, n^o. 4 (avril 2002): 162-170.
18. Mahalik, Santosh Kumar, Dhananjay Vaze, Toijam Soni Lyngdoh, Manoj Kumar Tewari, et Kannan Lakshmi Narasimhan. « Embryogenesis of triple neural tube defects: sonic hedgehog--a key? » *Journal of pediatric surgery* 46, n^o. 2 (février 2011): e5-8.
19. Catala, M. « Genetic control of caudal development ». *Clinical genetics* 61, n^o. 2 (février 2002): 89-96.
20. Lowery, Laura Anne, et Hazel Sive. « Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation ». *Mechanisms of development* 121, n^o. 10 (octobre 2004): 1189-1197.
21. Blaas, H-G K, et S H Eik-Nes. « Sonoembryology and early prenatal diagnosis of neural anomalies ». *Prenatal diagnosis* 29, n^o. 4 (avril 2009): 312-325.
22. Bassuk, Alexander G, et Zoha Kibar. « Genetic basis of neural tube defects ». *Seminars in pediatric neurology* 16, n^o. 3 (septembre 2009): 101-110.
23. Cohen, M Michael, Jr. « Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives ». *American journal of medical genetics* 115, n^o. 4 (décembre 30, 2002): 245-268.
24. Detrait, Eric R, Timothy M George, Heather C Etchevers, John R Gilbert, Michel Vekemans, et Marcy C Speer. « Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics ». *Neurotoxicology and teratology* 27, n^o. 3 (juin 2005): 515-524.

25. Rufener, Stephanie L, Mohannad Ibrahim, Charles A Raybaud, et Hemant A Parmar. « Congenital spine and spinal cord malformations--pictorial review ». *AJR. American journal of roentgenology* 194, n^o. 3 Suppl (mars 2010): S26-37.
26. Rufener, Stephanie L, Mohannad Ibrahim, Charles A Raybaud, et Hemant A Parmar. « Congenital spine and spinal cord malformations--pictorial review ». *AJR. American journal of roentgenology* 194, n^o. 3 Suppl (mars 2010): S26-37.
27. Naidich, T P, D G McLone, et S Mutluer. « A new understanding of dorsal dysraphism with lipoma (lipomyeloschisis): radiologic evaluation and surgical correction ». *AJR. American journal of roentgenology* 140, n^o. 6 (juin 1983): 1065-1078.
28. Tortori-Donati, P, A Rossi, R Biancheri, et A Cama. « Magnetic resonance imaging of spinal dysraphism ». *Topics in magnetic resonance imaging: TMRI* 12, n^o. 6 (décembre 2001): 375-409.
29. Finn, Michael A, et Marion L Walker. « Spinal lipomas: clinical spectrum, embryology, and treatment ». *Neurosurgical focus* 23, n^o. 2 (2007): E10.
30. Elton, S, et W J Oakes. « Dermal sinus tracts of the spine ». *Neurosurgical focus* 10, n^o. 1 (2001): e4.
31. Conti, Piero, Ron Tenenbaum, Matteo Capozza, Homere Mouchaty, et Renato Conti. « Diastematomyelia and tumor in adults: report of two cases and literature review ». *Spine* 35, n^o. 24 (novembre 15, 2010): E1438-1443.
32. Pang, D. « Sacral agenesis and caudal spinal cord malformations ». *Neurosurgery* 32, n^o. 5 (mai 1993): 755-778; discussion 778-779.

33. Lynch, S A, Y Wang, T Strachan, J Burn, et S Lindsay. « Autosomal dominant sacral agenesis: Currarino syndrome ». *Journal of medical genetics* 37, n^o. 8 (août 2000): 561-566.
34. Rossi, A, A Cama, G Piatelli, M Ravegnani, R Biancheri, et P Tortori-Donati. « Spinal dysraphism: MR imaging rationale ». *Journal of neuroradiology. Journal de neuroradiologie* 31, n^o. 1 (janvier 2004): 3-24.
35. Tortori-Donati, P, M P Fondelli, A Rossi, C A Raybaud, A Cama, et V Capra. « Segmental spinal dysgenesis: neuroradiologic findings with clinical and embryologic correlation ». *AJNR. American journal of neuroradiology* 20, n^o. 3 (mars 1999): 445-456.
36. Mitchell, Laura E. « Epidemiology of neural tube defects ». *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 135C, n^o. 1 (mai 15, 2005): 88-94.
37. Blom, Henk J, Gary M Shaw, Martin den Heijer, et Richard H Finnell. « Neural tube defects and folate: case far from closed ». *Nature reviews. Neuroscience* 7, n^o. 9 (septembre 2006): 724-731.
38. De Wals, Philippe, Fassiatou Tairou, Margot I Van Allen, Soo-Hong Uh, R Brian Lowry, Barbara Sibbald, Jane A Evans, et al. « Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada ». *The New England journal of medicine* 357, n^o. 2 (juillet 12, 2007): 135-142.
39. Rothenberg, Sheldon P, Maria P da Costa, Jeffrey M Sequeira, Joan Cracco, Jaclyn L Roberts, Jeremy Weedon, et Edward V Quadros. « Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect ». *The New England journal of medicine* 350, n^o. 2 (janvier 8, 2004): 134-142.

40. Molloy, Anne M, Edward V Quadros, Jeffrey M Sequeira, James F Troendle, John M Scott, Peadar N Kirke, et James L Mills. « Lack of association between folate-receptor autoantibodies and neural-tube defects ». *The New England journal of medicine* 361, n°. 2 (juillet 9, 2009): 152-160.
41. Greene, Nicholas D E, Philip Stanier, et Andrew J Copp. « Genetics of human neural tube defects ». *Human molecular genetics* 18, n°. R2 (octobre 15, 2009): R113-129.
42. Cogram, Patricia, Andrew Hynes, Louisa P E Dunlevy, Nicholas D E Greene, et Andrew J Copp. « Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol ». *Human molecular genetics* 13, n°. 1 (janvier 1, 2004): 7-14.
43. Lynch, Sally Ann. « Non-multifactorial neural tube defects ». *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 135C, n°. 1 (mai 15, 2005): 69-76.
44. Khoury, M J, T H Beaty, et K Y Liang. « Can familial aggregation of disease be explained by familial aggregation of environmental risk factors? » *American journal of epidemiology* 127, n°. 3 (mars 1988): 674-683.
45. Manning, S M, R Jennings, et J R Madsen. « Pathophysiology, prevention, and potential treatment of neural tube defects ». *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 6, n°. 1 (2000): 6-14.
46. Stamm, Demetra S, Evadnie Rampersaud, Susan H Slifer, Lorraine Mehlretter, Deborah G Siegel, Jianzhen Xie, Diane Hu-Lince, et al. « High-density single nucleotide polymorphism screen in a large multiplex neural tube defect family refines linkage to loci at 7p21.1-pter and 2q33.1-q35 ». *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 76, n°. 6 (juin 2006): 499-505

47. Rampersaud, E, A G Bassuk, D S Enterline, T M George, D G Siegel, E C Melvin, J Aben, et al. « Whole genomewide linkage screen for neural tube defects reveals regions of interest on chromosomes 7 and 10 ». *Journal of medical genetics* 42, n°. 12 (décembre 2005): 940-946.
48. van der Put, N M, R P Steegers-Theunissen, P Frosst, F J Trijbels, T K Eskes, L P van den Heuvel, E C Mariman, M den Heyer, R Rozen, et H J Blom. « Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida ». *Lancet* 346, n°. 8982 (octobre 21, 1995): 1070-1071.
49. van der Put, N M, T K Eskes, et H J Blom. « Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis ». *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* 90, n°. 2 (février 1997): 111-115.
50. van der Put, N M, F Gabreëls, E M Stevens, J A Smeitink, F J Trijbels, T K Eskes, L P van den Heuvel, et H J Blom. « A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? » *American journal of human genetics* 62, n°. 5 (mai 1998): 1044-1051.
51. Chen, Z, A C Karaplis, S L Ackerman, I P Pogribny, S Melnyk, S Lussier-Cacan, M F Chen, et al. « Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition ». *Human molecular genetics* 10, n°. 5 (mars 1, 2001): 433-443.
52. van der Linden, Ivon J M, Lydia A Afman, Sandra G Heil, et Henk J Blom. « Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk ». *The Proceedings of the Nutrition Society* 65, n°. 2 (mai 2006): 204-215.

53. Franke, Barbara, Sita H H M Vermeulen, Regine P M Steegers-Theunissen, Marieke J Coenen, Mascha M V A P Schijvenaars, Hans Scheffer, Martin den Heijer, et Henk J Blom. « An association study of 45 folate-related genes in spina bifida: Involvement of cubilin (CUBN) and tRNA aspartic acid methyltransferase 1 (TRDMT1) ». *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 85, n° 3 (mars 2009): 216-226.
54. Swanson, D A, M L Liu, P J Baker, L Garrett, M Stitzel, J Wu, M Harris, R Banerjee, B Shane, et L C Brody. « Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice ». *Molecular and cellular biology* 21, n° 4 (février 2001): 1058-1065.
55. Elmore, C Lee, Xuchu Wu, Daniel Leclerc, Erica D Watson, Teodoro Bottiglieri, Natalia I Krupenko, Sergey A Krupenko, et al. « Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase ». *Molecular genetics and metabolism* 91, n° 1 (mai 2007): 85-97.
56. Hol, F A, N M van der Put, M P Geurds, S G Heil, F J Trijbels, B C Hamel, E C Mariman, et H J Blom. « Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects ». *Clinical genetics* 53, n° 2 (février 1998): 119-125.
57. Brody, Lawrence C, Mary Conley, Christopher Cox, Peadar N Kirke, Mary P McKeever, James L Mills, Anne M Molloy, et al. « A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group ». *American journal of human genetics* 71, n° 5 (novembre 2002): 1207-1215.

58. De Marco, Patrizia, Elisa Merello, Maria Grazia Calevo, Samantha Mascelli, Alessandro Raso, Armando Cama, et Valeria Capra. « Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk ». *Journal of human genetics* 51, n° 2 (2006): 98-103.
59. Harris, Muriel J, et Diana M Juriloff. « 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 research. Part A, Clinical and molecular teratology* 88, n° 8 (août 2010): 653-669.
60. Kim, Tae-Hee, Jessica Goodman, Kathryn V Anderson, et Lee Niswander. « Phactr4 regulates neural tube and optic fissure closure by controlling PP1-, Rb-, and E2F1-regulated cell-cycle progression ». *Developmental cell* 13, n° 1 (juillet 2007): 87-102.
61. Ruland, J, G S Duncan, A Elia, I del Barco Barrantes, L Nguyen, S Plyte, D G Millar, et al. « Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure ». *Cell* 104, n° 1 (janvier 12, 2001): 33-42.
62. Li, Q, G Estepa, S Memet, A Israel, et I M Verma. « Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation ». *Genes & development* 14, n° 14 (juillet 15, 2000): 1729-1733.
63. Miner, J H, J Cunningham, et J R Sanes. « Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain ». *The Journal of cell biology* 143, n° 6 (décembre 14, 1998): 1713-1723.
64. De Arcangelis, A, M Mark, J Kreidberg, L Sorokin, et E Georges-Labouesse. « Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse ». *Development (Cambridge, England)* 126, n° 17 (septembre 1999): 3957-3968.

65. Ishibashi, M, S L Ang, K Shiota, S Nakanishi, R Kageyama, et F Guillemot. « 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 & development* 9, n^o. 24 (décembre 15, 1995): 3136-3148.
66. Hirata, H, K Tomita, Y Bessho, et R Kageyama. « Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain ». *The EMBO journal* 20, n^o. 16 (août 15, 2001): 4454-4466.
67. Kibar, Zoha, Elena Torban, Jonathan R McDearmid, Annie Reynolds, Joanne Berghout, Melissa Mathieu, Irena Kirillova, et al. « Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects ». *The New England journal of medicine* 356, n^o. 14 (avril 5, 2007): 1432-1437.
68. Kibar, Zoha, Ciprian M Bosoi, Megan Kooistra, Sandra Salem, Richard H Finnell, Patrizia De Marco, Elisa Merello, Alexander G Bassuk, Valeria Capra, et Philippe Gros. « Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects ». *Human mutation* 30, n^o. 7 (juillet 2009): E706-715.
69. Kibar, Z, S Salem, C M Bosoi, E Pauwels, P De Marco, E Merello, A G Bassuk, V Capra, et P Gros. « Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects ». *Clinical genetics* 80, n^o. 1 (juillet 2011): 76-82.
70. Reynolds, Annie, Jonathan R McDearmid, Stephanie Lachance, Patrizia De Marco, Elisa Merello, Valeria Capra, Philippe Gros, Pierre Drapeau, et Zoha Kibar. « VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish ». *Mechanisms of development* 127, n^o. 7-8 (août 2010): 385-392.

71. Strutt, David, Ruth Johnson, Katherine Cooper, et Sarah Bray. « Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the *Drosophila* eye ». *Current biology: CB* 12, n^o. 10 (mai 14, 2002): 813-824.
72. Axelrod, J D, J R Miller, J M Shulman, R T Moon, et N Perrimon. « Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways ». *Genes & development* 12, n^o. 16 (août 15, 1998): 2610-2622.
73. Axelrod, J D. « Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling ». *Genes & development* 15, n^o. 10 (mai 15, 2001): 1182-1187.
74. Usui, T, Y Shima, Y Shimada, S Hirano, R W Burgess, T L Schwarz, M Takeichi, et T Uemura. « Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled ». *Cell* 98, n^o. 5 (septembre 3, 1999): 585-595.
75. Bastock, Rebecca, Helen Strutt, et David Strutt. « Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning ». *Development (Cambridge, England)* 130, n^o. 13 (juillet 2003): 3007-3014.
76. Tree, David R. P., Joshua M. Shulman, Raphaël Rousset, Matthew P. Scott, David Gubb, et Jeffrey D. Axelrod. « Prickle Mediates Feedback Amplification to Generate Asymmetric Planar Cell Polarity Signaling ». *Cell* 109, n^o. 3 (mai 3, 2002): 371-381.
77. Das, Gishnu, Andreas Jenny, Thomas J Klein, Suzanne Eaton, et Marek Mlodzik. « Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes ». *Development (Cambridge, England)* 131, n^o. 18 (septembre 2004): 4467-4476.

78. Feiguin, F, M Hannus, M Mlodzik, et S Eaton. « The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization ». *Developmental cell* 1, n°. 1 (juillet 2001): 93-101.
79. Goodrich, Lisa V. « The plane facts of PCP in the CNS ». *Neuron* 60, n°. 1 (octobre 9, 2008): 9-16.
80. Wu, Jun, et Marek Mlodzik. « The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling ». *Developmental cell* 15, n°. 3 (septembre 2008): 462-469.
81. Chen, Wei-Shen, Dragana Antic, Maja Matis, Catriona Y Logan, Michael Povelones, Graham A Anderson, Roel Nusse, et Jeffrey D Axelrod. « Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling ». *Cell* 133, n°. 6 (juin 13, 2008): 1093-1105.
82. Axelrod, Jeffrey D. « Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling ». *Seminars in cell & developmental biology* 20, n°. 8 (octobre 2009): 964-971.
83. Casal, José, Peter A Lawrence, et Gary Struhl. « Two separate molecular systems, Dachous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity ». *Development (Cambridge, England)* 133, n°. 22 (novembre 2006): 4561-4572.
84. Ma, Dali, Chung-hui Yang, Helen McNeill, Michael A Simon, et Jeffrey D Axelrod. « Fidelity in planar cell polarity signalling ». *Nature* 421, n°. 6922 (janvier 30, 2003): 543-547.
85. Lawrence, Peter A, José Casal, et Gary Struhl. « Towards a model of the organisation of planar polarity and pattern in the Drosophila abdomen ». *Development (Cambridge, England)* 129, n°. 11 (juin 2002): 2749-2760.

86. Park, W J, J Liu, E J Sharp, et P N Adler. « The Drosophila tissue polarity gene inturned acts cell autonomously and encodes a novel protein ». *Development (Cambridge, England)* 122, n^o. 3 (mars 1996): 961-969.
87. Collier, S, et D Gubb. « Drosophila tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein ». *Development (Cambridge, England)* 124, n^o. 20 (octobre 1997): 4029-4037.
88. Lee, Haeryun, et Paul N Adler. « The function of the frizzled pathway in the Drosophila wing is dependent on inturned and fuzzy ». *Genetics* 160, n^o. 4 (avril 2002): 1535-1547.
89. Jenny, Andreas, et Marek Mlodzik. « Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization ». *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 73, n^o. 5 (septembre 2006): 738-750.
90. Wang, Yanshu, et Jeremy Nathans. « Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions ». *Development (Cambridge, England)* 134, n^o. 4 (février 2007): 647-658.
91. Vladar, Eszter K, Dragana Antic, et Jeffrey D Axelrod. « Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass ». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, n^o. 3 (septembre 2009): a002964.
92. Clare H Faux, Nicholas D E Greene, et Andrew J Copp. « Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure ». *Development (Cambridge, England)* 134, n^o. 4 (février 2007): 789-799.
93. Kibar, Z, K J Vogan, N Groulx, M J Justice, D A Underhill, et P Gros. « Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail ». *Nature genetics* 28, n^o. 3 (juillet 2001): 251-255.

94. Wansleeben, Carolien, et Frits Meijlink. « The planar cell polarity pathway in vertebrate development ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 240, n^o. 3 (mars 2011): 616-626.
95. Lu, Xiaowei, Annette G M Borchers, Christine Jolicœur, Helen Rayburn, Julie C Baker, et Marc Tessier-Lavigne. « PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates ». *Nature* 430, n^o. 6995 (juillet 1, 2004): 93-98.
96. Yamamoto, Shinji, Osamu Nishimura, Kazuyo Misaki, Michiru Nishita, Yasuhiro Minami, Shigenobu Yonemura, Hiroshi Tarui, et Hiroshi Sasaki. « Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex ». *Developmental cell* 15, n^o. 1 (juillet 2008): 23-36.
97. Simons, Matias, et Marek Mlodzik. « Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease ». *Annual review of genetics* 42 (2008): 517-540.
98. McNeill, Helen. « Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple ». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, n^o. 2 (février 2010): a003376.
99. Dabdoub, Alain, Maura J Donohue, Angela Brennan, Vladimir Wolf, Mireille Montcouquiol, David A Sassoon, Jen-Chih Hseih, Jeffrey S Rubin, Patricia C Salinas, et Matthew W Kelley. « Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea ». *Development (Cambridge, England)* 130, n^o. 11 (juin 2003): 2375-2384.
100. Wang, Yanshu, Nini Guo, et Jeremy Nathans. « The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26, n^o. 8 (février 22, 2006): 2147-2156.

101. Montcouquiol, Mireille, Nathalie Sans, David Huss, Jacob Kach, J David Dickman, Andrew Forge, Rivka A Rachel, et al. « Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26, n°. 19 (mai 10, 2006): 5265-5275.
102. Murdoch, Jennifer N, Deborah J Henderson, Kit Doudney, Carles Gaston-Massuet, Helen M Phillips, Caroline Paternotte, Ruth Arkell, Philip Stanier, et Andrew J Copp. « Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse ». *Human molecular genetics* 12, n°. 2 (janvier 15, 2003): 87-98.
103. Paudyal, Anju, Christine Damrau, Victoria L Patterson, Alexander Ermakov, Caroline Formstone, Zuzanna Lalanne, Sara Wells, 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 developmental biology* 10 (2010): 87.
104. Heisenberg, C P, M Tada, G J Rauch, L Saúde, M L Concha, R Geisler, D L Stemple, J C Smith, et S W Wilson. « Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation ». *Nature* 405, n°. 6782 (mai 4, 2000): 76-81.
105. Djiane, A, J Riou, M Umbhauer, J Boucaut, et D Shi. « Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis* ». *Development (Cambridge, England)* 127, n°. 14 (juillet 2000): 3091-3100.
106. Kilian, Beate, Hannu Mansukoski, Filipa Carreira Barbosa, Florian Ulrich, Masazumi Tada, et Carl Philipp Heisenberg. « The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation ». *Mechanisms of development* 120, n°. 4 (avril 2003): 467-476.

107. Gong, Ying, Chunhui Mo, et Scott E Fraser. « Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation ». *Nature* 430, n° 7000 (août 5, 2004): 689-693.
108. Strutt, D I, U Weber, et M Mlodzik. « The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling ». *Nature* 387, n° 6630 (mai 15, 1997): 292-295.
109. Winter, C G, B Wang, A Ballew, A Royou, R Karess, J D Axelrod, et L Luo. « Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton ». *Cell* 105, n° 1 (avril 6, 2001): 81-91.
110. Lawrence, Peter A. « Gradients in the Insect Segment: The Orientation of Hairs in the Milkweed Bug *Oncopeltus Fasciatus* ». *Journal of Experimental Biology* 44, n° 3 (janvier 6, 1966): 607-620.
111. Jaulin-Bastard, Fanny, Sébastien Nola, et Jean-Paul Borg. « Protéines LAP \square : de nouvelles clés de voûte de l'architecture épithéliale ». *MS. Médecine sciences* 21, n° 3 (s. d.): 267-272.
112. Albertson, Roger, Chiswili Chabu, Amy Sheehan, et Chris Q Doe. « Scribble protein domain mapping reveals a multistep localization mechanism and domains necessary for establishing cortical polarity ». *Journal of cell science* 117, n° Pt 25 (décembre 1, 2004): 6061-6070.
113. Ybot-Gonzalez, Patricia, Dawn Savery, Dianne Gerrelli, Massimo Signore, Claire E Mitchell, Zarbalis, Konstantinos, Scott R May, Yiguo Shen, Marc Ekker, John L R Rubenstein, et Andrew S Peterson. « A focused and efficient genetic screening strategy in the mouse: identification of mutations that disrupt cortical development ». *PLoS biology* 2, n° 8 (août 2004): E219.

114. Moreau, Maïté M, Nicolas Piguel, Thomas Papouin, Muriel Koehl, Christelle M Durand, Maria E Rubio, François Loll, et al. « The planar polarity protein Scribble1 is essential for neuronal plasticity and brain function ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30, n°. 29 (juillet 21, 2010): 9738-9752.
115. Li, M, J Marhold, A Gatos, I Török, et B M Mechler. « Differential expression of two scribble isoforms during Drosophila embryogenesis ». *Mechanisms of development* 108, n°. 1-2 (octobre 2001): 185-190.
116. Skouloudaki, Kassiani, Michael Puetz, Matias Simons, Jean-Remy Courbard, Christopher Boehlke, Björn Hartleben, Christina Engel, et al. « Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, n°. 21 (mai 26, 2009): 8579-8584.
117. Etienne-Manneville, Sandrine. « Scribble at the crossroads ». *Journal of biology* 8, n°. 12 (2009): 104.
118. Lee, Ok-Kyung, Kristopher K Frese, Jennifer S James, Darshana Chadda, Zhi-Hong Chen, Ronald T Javier, et Kyung-Ok Cho. « Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation ». *Nature cell biology* 5, n°. 11 (novembre 2003): 987-993.
119. Margolis, Ben, et Jean-Paul Borg. « Apicobasal polarity complexes ». *Journal of cell science* 118, n°. Pt 22 (novembre 15, 2005): 5157-5159.
120. Adler, Paul N. « Planar signaling and morphogenesis in Drosophila ». *Developmental cell* 2, n°. 5 (mai 2002): 525-535.

121. Strutt, David. « Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates ». *Development (Cambridge, England)* 130, n° 19 (octobre 2003): 4501-4513.
122. Klein, Thomas J, et Marek Mlodzik. « Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction ». *Annual review of cell and developmental biology* 21 (2005): 155-176.
123. Lawrence, Peter A, Gary Struhl, et José Casal. « Planar cell polarity: one or two pathways? » *Nature reviews. Genetics* 8, n° 7 (juillet 2007): 555-563.
124. Wu, Jun, et Marek Mlodzik. « A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues ». *Trends in cell biology* 19, n° 7 (juillet 2009): 295-305.
125. Zeidler, M P, N Perrimon, et D I Strutt. « The four-jointed gene is required in the *Drosophila* eye for ommatidial polarity specification ». *Current biology: CB* 9, n° 23 (décembre 2, 1999): 1363-1372.
126. Lindqvist, Maria, Zachi Horn, Vitezslav Bryja, Gunnar Schulte, Panagiotis Papachristou, Rieko Ajima, Cecilia Dyberg, et al. « Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions ». *Journal of cell science* 123, n° Pt 3 (février 1, 2010): 472-483.
127. Park, Maiyon, et Randall T Moon. « The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos ». *Nature cell biology* 4, n° 1 (janvier 2002): 20-25.
128. Wong, Hing-C, Audrey Bourdelas, Anke Krauss, Ho-Jin Lee, Youming Shao, Dianqing Wu, Marek Mlodzik, De-Li Shi, et Jie Zheng. « Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled ». *Molecular cell* 12, n° 5 (novembre 2003): 1251-1260.

129. Jenny, Andreas, Rachel S Darken, Paul A Wilson, et Marek Mlodzik. « Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling ». *The EMBO journal* 22, n°. 17 (septembre 1, 2003): 4409-4420.
130. Strutt, David, et Helen Strutt. « Differential activities of the core planar polarity proteins during Drosophila wing patterning ». *Developmental biology* 302, n°. 1 (février 1, 2007): 181-194.
131. Montcouquiol, Mireille, Rivka A Rachel, Pamela J Lanford, Neal G Copeland, Nancy A Jenkins, et Matthew W Kelley. « Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals ». *Nature* 423, n°. 6936 (mai 8, 2003): 173-177.
132. Wansleeben, Carolien, Harma Feitsma, Mireille Montcouquiol, Carla Kroon, Edwin Cuppen, et Frits Meijlink. « Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b ». *Development (Cambridge, England)* 137, n°. 7 (avril 2010): 1067-1073.
133. Yates, Laura L, Carsten Schnatwinkel, Jennifer N Murdoch, Debora Bogani, Caroline J Formstone, Stuart Townsend, Andy Greenfield, Lee A Niswander, et Charlotte H Dean. « The PCP genes Celsr1 and Vangl2 are required for normal lung branching morphogenesis ». *Human molecular genetics* 19, n°. 11 (juin 1, 2010): 2251-2267.
134. Guirao, Boris, Alice Meunier, Stéphane Mortaud, Andrea Aguilar, Jean-Marc Corsi, Laetitia Strehl, Yuki Hirota, et al. « Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia ». *Nature cell biology* 12, n°. 4 (avril 2010): 341-350.

135. Ross, Alison J, Helen May-Simera, Erica R Eichers, Masatake Kai, Josephine Hill, Daniel J Jagger, Carmen C Leitch, et al. « Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates ». *Nature genetics* 37, n°. 10 (octobre 2005): 1135-1140.
136. Phillips, Helen M, Victoria Hildreth, Jonathan D Peat, Jennifer N Murdoch, Kazuto Kobayashi, Bill Chaudhry, et Deborah J Henderson. « Non-cell-autonomous roles for the planar cell polarity gene *Vangl2* in development of the coronary circulation ». *Circulation research* 102, n°. 5 (mars 14, 2008): 615-623.
137. Nakagawa, S, T Yano, K Nakagawa, S Takizawa, Y Suzuki, T Yasugi, J M Huijbregtse, et Y Taketani. « Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix ». *British journal of cancer* 90, n°. 1 (janvier 12, 2004): 194-199.
138. Nola, Sébastien, Michael Sebbagh, Sylvie Marchetto, Naël Osmani, Claire Nourry, Stéphane Audebert, Christel Navarro, et al. « Scrib regulates PAK activity during the cell migration process ». *Human molecular genetics* 17, n°. 22 (novembre 15, 2008): 3552-3565.
139. Courbard, Jean-Remy, Alexandre Djiane, Jun Wu, et Marek Mlodzik. « The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor *Stbm/Vang* and functions as one of its effectors ». *Developmental biology* 333, n°. 1 (septembre 1, 2009): 67-77.
140. Wada, Hironori, Miki Iwasaki, Tomomi Sato, Ichiro Masai, Yuko Nishiwaki, Hideomi Tanaka, Atsushi Sato, Yasuhiro Nojima, et Hitoshi Okamoto. « Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos ». *Development (Cambridge, England)* 132, n°. 10 (mai 2005): 2273-2285.

141. Bilder, David. « Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors ». *Genes & development* 18, n°. 16 (août 15, 2004): 1909-1925.
142. Djiane, Alexandre, Shaul Yogev, et Marek Mlodzik. « The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye ». *Cell* 121, n°. 4 (mai 20, 2005): 621-631.
143. Dollar, Gretchen L, Ursula Weber, Marek Mlodzik, et Sergei Y Sokol. « Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled ». *Nature* 437, n°. 7063 (octobre 27, 2005): 1376-1380.
144. Margolis, Ben, et Jean-Paul Borg. « Apicobasal polarity complexes ». *Journal of cell science* 118, n°. Pt 22 (novembre 15, 2005): 5157-5159.
145. Kibar, Z, V Capra, et P Gros. « Toward understanding the genetic basis of neural tube defects ». *Clinical genetics* 71, n°. 4 (avril 2007): 295-310.
146. Kestler, Hans A, et Michael Kühl. « From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network ». *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363, n°. 1495 (avril 12, 2008): 1333-1347.
147. Kibar, Zoha, Elena Torban, Jonathan R McDearmid, Annie Reynolds, Joanne Berghout, Melissa Mathieu, Irena Kirillova, et al. « Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects ». *The New England journal of medicine* 356, n°. 14 (avril 5, 2007): 1432-1437.

148. Kibar, Zoha, Ciprian M Bosoi, Megan Kooistra, Sandra Salem, Richard H Finnell, Patrizia De Marco, Elisa Merello, Alexander G Bassuk, Valeria Capra, et Philippe Gros. « Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects ». *Human mutation* 30, n° 7 (juillet 2009): E706-715.
149. Kibar, Z, S Salem, C M Bosoi, E Pauwels, P De Marco, E Merello, A G Bassuk, V Capra, et P Gros. « Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects ». *Clinical genetics* 80, n° 1 (juillet 2011): 76-82.
150. Bassuk, Alexander G, Robyn H Wallace, Aimee Buhr, Andrew R Buller, Zaid Afawi, Masahito Shimojo, Shingo Miyata, et al. « A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome ». *American journal of human genetics* 83, n° 5 (novembre 2008): 572-581.
151. Vissers, Lisenka E L M, Joris A Veltman, Ad Geurts van Kessel, et Han G Brunner. « Identification of disease genes by whole genome CGH arrays ». *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2 (octobre 15, 2005): R215-223.
152. Gustavsson, Peter, Jacqueline Schoumans, Johan Staaf, Ake Borg, Magnus Nordenskjöld, et Göran Annerén. « Duplication 16q12.1-q22.1 characterized by array CGH in a girl with spina bifida ». *European journal of medical genetics* 50, n° 3 (juin 2007): 237-241.
153. May-Simera, Helen L, Masatake Kai, Victor Hernandez, Daniel P S Osborn, Masazumi Tada, et Philip L Beales. « Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish ». *Developmental biology* 345, n° 2 (septembre 15, 2010): 215-225.

154. Park, Tae Joo, Brian J Mitchell, Philip B Abitua, Chris Kintner, et John B Wallingford. « Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells ». *Nature genetics* 40, n^o. 7 (juillet 2008): 871-879.
155. Seva, Catherine. « La β -caténine: un acteur clé dans le développement des cancers colorectaux ». *Hépatogastro* 8, n^o. 2 (s. d.): 149-154ec.
156. Bosoi, Ciprian M, Valeria Capra, Redouane Allache, Vincent Quoc-Huy Trinh, Patrizia De Marco, Elisa Merello, Pierre Drapeau, Alexander G Bassuk, et Zoha Kibar. « Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene PRICKLE1 in human neural tube defects ». *Human mutation* 32, n^o. 12 (décembre 2011): 1371-1375.
157. Borovina, Antonia, Simone Superina, Daniel Voskas, et Brian Ciruna. « Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia ». *Nature cell biology* 12, n^o. 4 (avril 2010): 407-412.
158. Développement précoce du système nerveux: différenciation du tube neural et des crêtes neurales. <http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete01.html>
159. Axelrod, J D, J R Miller, J M Shulman, R T Moon, et N Perrimon. « Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways ». *Genes & development* 12, n^o. 16 (août 15, 1998): 2610-2622.
160. Ehrich, Mathias, Sebastian Böcker, et Dirk van den Boom. « Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS ». *Nucleic acids research* 33, n^o. 4 (2005): e38.

161. Allache, Redouane, Patrizia De Marco, Elisa Merello, Valeria Capra, et Zoha Kibar. « Role of the planar cell polarity gene CELSR1 in neural tube defects and caudal agenesis ». *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 94, n°. 3 (mars 2012): 176-181.
162. Vissers, Lisenka E L M, Joris A Veltman, Ad Geurts van Kessel, et Han G Brunner. « Identification of disease genes by whole genome CGH arrays ». *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2 (octobre 15, 2005): R215-223.
163. Gustavsson, Peter, Jacqueline Schoumans, Johan Staaf, Ake Borg, Magnus Nordenskjöld, et Göran Annerén. « Duplication 16q12.1-q22.1 characterized by array CGH in a girl with spina bifida ». *European journal of medical genetics* 50, n°. 3 (juin 2007): 237-241.
164. de Bakker, Paul I W, Roman Yelensky, Itsik Pe'er, Stacey B Gabriel, Mark J Daly, et David Altshuler. « Efficiency and power in genetic association studies ». *Nature genetics* 37, n°. 11 (novembre 2005): 1217-1223.
165. Humbert, P O, N A Grzeschik, A M Brumby, R Galea, I Elsum, et H E Richardson. « Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module ». *Oncogene* 27, n°. 55 (novembre 24, 2008): 6888-6907.
166. Robinson, Alexis, Sarah Escuin, Kit Doudney, Michel Vekemans, Roger E Stevenson, Nicholas D E Greene, Andrew J Copp, et Philip Stanier. « Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis ». *Human mutation* 33, n°. 2 (février 2012): 440-447.
167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
168. <http://www.1000genomes.org>

169. http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html

170. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

171. <http://sift.jcvi.org/>

172. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>