

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse N°1761

Thèse

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 2 Décembre 2010

par **GIESE Arnaud, Pierre**

Né le 14 Mars 1982 à Pau (64)

**Régulation de la Protéine Centrale de la Polarité
Planaire Cellulaire Vangl2 dans l'Organe de Corti**

Membres du Jury

Pr. Marc Landry

Dr. Nathalie Spassky

Dr. Aziz El Amraoui

Dr. André Le Bivic

Dr. Cécile Duplâa

Dr. Mireille Montcouquiol

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury, Pr Marc Landry, Dr André le Bivic, Dr Nathalie Spassky, Dr Aziz El Amraoui, Dr Cécile Duplâa, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier Dr Aziz El Amraoui pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en janvier 2010 et m'avoir enseigné la dissociation des cellules de l'organe de Corti.

Je remercie Dr Mireille Montcouquiol et Dr Nathalie Sans pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et encadré lors de ce travail de thèse. J'ai apprécié les interactions scientifiques et les nombreux congrès auxquels j'ai pu participer et présenter mes travaux.

Je remercie tous les membres et ex-membres du laboratoire : Elodie Richard, Christelle Durand, François Loll, Muna Hilal, Maité Moreau, Nicolas Piguel, Marie-Claude Donat, Chantal Médina, Déborah Scheffer, Cyrille Sage, Konstantin Glebov, Claire Mazzocco, Daniela Arma, Julie Rumi et Christine Richard.

Je remercie Déborah Scheffer, Elodie Richard et Agnès Recart pour les nombreuses activités extra-laboratoires que nous avons partagées.

Je remercie Jérôme Ezan, Christelle Durand et Elodie Richard, sans oublier Mireille Montcouquiol et Nathalie Sans pour les corrections apportées à ce manuscrit.

Je remercie ma famille pour leur soutien de tous les jours.



« I was asked by Stichting Museumnacht to make an illustration inspired by the Van Gogh Museum to be placed in front of Amsterdam Central Station. I made a depiction of van Gogh's troubled life in contrast to the present and a brief invented history of the making of his Sunflowers. Let's party like it's 1888! » Stefan Glérum

Photographie prise à Amsterdam à l'occasion du congrès FENS 2010.

Communications affichées

A. GIESE, S. WARMING, R. RACHEL, R. ERWIN-COHEN, EM. RICHARD, L. TESSAROLLO, NG. COPELAN, NA. JENKINS, N. SANS, M. MONTCOUQUIOL. Intracellular Trafficking of the Core Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in Sensory Cells of the Mammalian Cochlea. **FENS 2010, Amsterdam (The Netherlands)**.

A. GIESE, S. WARMING, R. RACHEL, R. ERWIN-COHEN, EM. RICHARD, L. TESSAROLLO, NG. COPELAN, NA. JENKINS, N. SANS, M. MONTCOUQUIOL. Intracellular Trafficking of the Core Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in Sensory Cells of the Mammalian Cochlea . **2nd Joint Meeting of the french and Japanese Societies for Developmental Biology 2010, Institut Pasteur, Paris (France)**.

A. GIESE, S. WARMING, R. RACHEL, R. ERWIN-COHEN, EM. RICHARD, L. TESSAROLLO, NG. COPELAN, NA. JENKINS, N. SANS, M. MONTCOUQUIOL. Intracellular Trafficking of the Core Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in Sensory Cells of the Mammalian Cochlea. **ENINET Meeting 2010, Coimbra (Portugal)**.

A. GIESE, S. WARMING, R. RACHEL, R. ERWIN-COHEN, EM. RICHARD, L. TESSAROLLO, NG. COPELAN, NA. JENKINS, N. SANS, M. MONTCOUQUIOL. Intracellular Trafficking of the Core Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in Sensory Cells of the Mammalian Cochlea. **Journée de l'Ecole Doctorale 2010, Arcachon (France)**.

A. GIESE, C. MAZZOCCO, EM. RICHARD, D. SCHEFFER, N. SANS, M. E. MONTCOUQUIOL. GIPC1, a key regulator of hair bundle integrity and Vangl2 trafficking. **9e colloque des Neurosciences 2009, 26-29 May, Bordeaux (France)**.

A. GIESE, C. MAZZOCCO, EM. RICHARD, D. SCHEFFER, C. SAGE, N. SANS, M. E. MONTCOUQUIOL. Identification of novel interactors for Vangl2. **Journée de l'Ecole Doctorale 2009, 18 April, Arcachon (France)**.

A. GIESE, C. MAZZOCCO, EM. RICHARD, D. SCHEFFER, C. SAGE, N. SANS, M. E. MONTCOUQUIOL. Identification of novel interactors for Vangl2. **Society for Neuroscience 2008, 15-19 November, Washington (USA)**.

Abréviations

aa	acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	Adenomatous Polyposis Coli
aPKC	atypic Protein Kinase C
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CCE	Cellule Ciliée Externe
CCI	Cellule Ciliée Interne
COS-7	African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell
Crb	Crumbs
CRD	Cystein Rich Domain
C-terminale	Extrémité Carboxy Terminale
DC	Deiter Cell
DEP	Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin
DIV	Day in Vitro / Jours In Vitro
DIX	Dishevelled-Axin
Dsh	Dvl: Dishevelled
E16,5 ; E17,5 ; ...	Embryonnaire
EGF	Epidermal Growth Factor
ENU	N-Ethyl-N-NitrosoUrea
Fz	Frizzled
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 cells
hsFz	heat shock Frizzled
IHC	Inner Hair Cell
IPC	Inner Pillar Cell
JNK	Jun N-terminal Kinase
kb	kilo bases
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor

LGL	Lethal Giant Larvae
MAGUK	Membrane-Associated GUanylate Kinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells
NICD	Notch-1 IntraCellular Domain
NLS	Nuclear localization site
N-terminale	Extremité Amino Terminale
OHC	Outer Hair Cell
OPC	Outer Pillar Cell
P0 ; P1 ; ...	Post embryonnaire
pb	paires de bases
PCP	Planar Cell Polarity
PDZ	PSD-95, DLG, ZO1
PDZ-BD	PDZ - Binding Domain
ROCK	RHO-associated kinase
RT-PCR	Retro Transcription Polymerase Chain Reaction
SC	Supporting Cell / Cellule de Soutien
sFRP:	secreted Frizzled Related Protein
shRNA:	short herpin RiboNucleic Acid
TCF	T-cell Factor
Wnt/Wng	Wingless
WT	Wild Type
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Tables des matières

REMERCIEMENTS	1
ABREVIATIONS	3
TABLES DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLES	12
RESUME	13
AVANT-PROPOS	14
INTRODUCTION	15
LA POLARITE DROITE-GAUCHE.....	17
LA POLARITE APICO-BASALE.....	17
AUTRES TYPES DE POLARITE	18
CHAPITRE 1 : POLARITE PLANAIRE CELLULAIRE (PCP)	21
1.1 DEFINITION ET GENERALITES	21
1.2 POLARITE PLANAIRE CELLULAIRE CHEZ LA DROSOPHILE	23
1.2.1 <i>La PCP contrôle l'orientation des trichomes de l'aile de drosophile</i>	23
1.2.2 <i>La PCP contrôle la rotation des ommatidies de l'œil de drosophile</i>	25
1.2.3 <i>Les gènes PCP sont organisés en deux cassettes de signalisation</i>	26
1.2.4 <i>La cassette de signalisation Fat/Dachsous/Four-jointed</i>	28
1.2.5 <i>La cassette de signalisation Frizzled/Flamingo ou gènes centraux de la PCP</i>	30
1.2.5.1 Les gènes centraux de la PCP	30
1.2.5.2 Le « swirling pattern » des mutants de la cassette <i>Frizzled/Flamingo</i>	30
1.2.5.3 Origine des noms des gènes centraux de la PCP	31
1.2.5.4 Les protéines centrales de la PCP	32
1.2.5.5 Gain et perte de fonction des gènes centraux entraînent un phénotype PCP	35
1.2.5.6 Effet autonome et non autonome	35
1.2.5.6.1 Effet cellule-autonome.....	36
1.2.5.6.2 Effet cellule non autonome.....	37
1.2.6 <i>Asymétrie des protéines centrales de la PCP ou « Core PCP Protein »</i>	38
1.2.6.1 Une asymétrie proximo-distale	38
1.2.6.2 Comment l'asymétrie est-elle établie ?	40
1.2.6.3 Perte d'asymétrie chez les mutants PCP	41
1.2.6.4 L'asymétrie proximo-distale, un gradient d'activité ?.....	42
1.2.7 <i>Un point sur la signalisation PCP</i>	44

1.3	POLARITE PLANAIRE CELLULAIRE CHEZ LES MAMMIFERES	45
1.3.1	<i>Modèles d'étude de la polarité planaire chez les mammifères</i>	45
1.3.1.1	Follicules pileux	46
1.3.1.1.1	Le follicule pileux : une asymétrie morphologique	46
1.3.1.2	L'oreille	48
1.3.1.2.1	L'oreille externe	48
1.3.1.2.2	L'oreille moyenne	49
1.3.1.2.3	L'oreille interne	49
1.3.1.2.3.1	L'organe de Corti	50
1.3.1.2.3.1.1	Cellules ciliées	51
1.3.1.2.3.1.2	Cellules de soutien	52
1.3.1.2.3.1.3	Cellule ciliée et cellule de soutien, une relation étroite	53
1.3.1.2.3.1.3.1	La Différenciation des cellules ciliées et de soutien est interdépendante	53
1.3.1.2.3.1.3.2	Jonctions d'adhérence serrées particulières	57
1.3.1.2.3.2	Système vestibulaire	57
1.3.1.3	Tissus dont la fonction dépend de la polarité planaire	58
1.3.1.4	Mutants PCP chez les mammifères et oreille interne	58
1.3.1.5	Nouveaux gènes régulateurs de la PCP chez les mammifères	60
1.3.2	<i>Asymétrie des protéines centrales de la PCP</i>	63
1.3.3	<i>Relation polarité apico-basale et PCP</i>	64
1.3.3.1	Complexes apico-basaux	64
1.3.3.2	Mise en place des complexes apico-basaux	65
1.3.3.3	Interactions entre les protéines apico-basales et les protéines de la PCP	66
1.3.4	<i>Hypothèses sur l'établissement de l'asymétrie des protéines PCP</i>	68
1.3.5	<i>PCP, extension convergente et défauts de fermeture du tube neural</i>	69
1.3.5.1	L'extension convergente	70
1.3.5.1.1	Généralités	70
1.3.5.1.2	Extension convergente et développement cochléaire	70
1.3.5.1.3	Extension convergente et fermeture du tube neural	71
1.3.5.2	Mutants PCP et défaut d'extension convergente	71
1.3.6	<i>PCP et signalisation Wnt chez les mammifères</i>	73
1.3.7	<i>PCP et pathologies</i>	73
1.3.7.1	Ciliopathies	73
1.3.7.2	Affections cardiaques	75
2	CHAPITRE 2 : A PROPOS DE VANGL2	76
2.1	DENOMINATION	76
2.2	STRUCTURE DE VANGL2	77
2.3	FAMILLE VANGL	78
2.4	VANGL2 CONTROLE DE NOMBREUX MECANISMES	80
2.5	VANGL2 CONTIENT UN DOMAINE DE LIAISON AUX DOMAINES PDZ	82
2.5.1	<i>Classification des PDZ-BDMs</i>	82

2.5.2	<i>Le PDZ-BDM de Vangl2, signal participant à son trafic intracellulaire ?</i>	84
2.6	ÉTUDE DE LA FONCTION DU PDZ-BDM DE VANGL2	85
2.7	LE PDZ-BDM DE VANGL2 EST UN SITE D'INTERACTION PROTEIQUE IMPORTANT	86
2.7.1	<i>Vangl2 interagit avec Scrib1 via une liaison PDZ/PDZ-BDM</i>	86
2.7.2	<i>Vangl2 interagit avec des effecteurs de la PCP grâce au PDZ-BDM</i>	86
2.8	NECESSITE DE TROUVER DE NOUVEAUX PARTENAIRES POUR VANGL2	88
2.8.1	<i>Crible double hybride dans l'organe de Corti</i>	89
2.8.2	<i>GIPC, nouvel interacteur de Vangl2</i>	89
3	CHAPITRE 3 : A PROPOS DE GIPC1	90
3.1	LA FAMILLE DE GENES <i>GIPC</i>	90
3.1.1	<i>Une famille de gènes conservée au cours de l'évolution</i>	90
3.1.2	<i>Homologies</i>	90
3.2	GIPC1	92
3.2.1	<i>Dénomination</i>	92
3.2.2	<i>GIPC1, une protéine d'échafaudage à multi domaine</i>	93
3.2.3	<i>GIPC1 : une protéine ubiquitaire</i>	93
3.2.4	<i>GIPC1, une protéine à domaine PDZ</i>	94
3.2.4.1	Les différentes classes de domaines PDZ	94
3.2.4.2	Poche de liaison aux domaines de type PDZ-BD	95
3.3	LES PARTENAIRES DE GIPC1	96
3.4	GIPC1, UNE PROTEINE CYTOSOLIQUE RECRUTEE AU NIVEAU DES MEMBRANES	97
3.4.1	<i>Stabilisation de récepteurs à la membrane plasmique</i>	98
3.4.2	<i>Endocytose</i>	100
3.5	GIPC1 EST UN BON CANDIDAT POUR REGULER LA PCP	101
3.5.1	<i>GIPC et angiogenèse</i>	101
3.5.2	<i>GIPC et extension convergente</i>	102
3.5.3	<i>GIPC et surdité</i>	102
3.5.4	<i>GIPC et PCP</i>	103
4	MATERIELS ET METHODES	104
4.1	EXPERIMENTATION ANIMALE	105
4.1.1	<i>Animaux</i>	105
4.1.2	<i>Mise en accouplement et datation des embryons</i>	105
4.1.3	<i>Euthanasie</i>	105
4.1.4	<i>Prélèvement des embryons</i>	105
4.2	ELECTROPORATIONS	106
4.2.1	<i>Electroporation in vitro de l'épithélium cochléaire</i>	106
4.2.1.1	Isolement de l'organe de Corti	106
4.2.1.2	Electroporation	108

4.2.1.3	Culture d'explant cochléaire	108
4.2.2	<i>Electroporation in utero dans l'oreille interne d'embryon de souris</i>	108
4.2.2.1	Anesthésie et laparotomie ventrale	109
4.2.2.2	Microinjection	109
4.2.2.3	Électroporation <i>in vivo</i>	110
4.3	CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES UTILISEES EN ELECTROPORATION	110
4.3.1	<i>Vecteurs de surexpression</i>	110
4.3.2	<i>Vecteurs de sous-expression</i>	111
4.4	ANTICORPS	112
4.4.1	<i>Anticorps primaires</i>	112
4.4.2	<i>Anticorps secondaires</i>	113
4.4.3	<i>Marquages à la phalloïdine</i>	113
4.5	MICROSCOPIE CONFOCALE STED	114
4.5.1	<i>Diffraction et pouvoir de résolution d'un microscope</i>	114
4.5.2	<i>L'émission stimulée</i>	115
4.5.3	<i>Caractéristiques du microscope confocal STED</i>	115
4.5.3.1	Laser et diodes laser	115
4.5.3.2	Objectifs	116
4.5.3.3	Résolution du microscope confocal STED	116
4.5.3.3.1	Mode confocal	116
4.5.3.3.2	Mode STED (à 635 nm)	116
5	RESULTATS EXPERIMENTAUX	117
5.1	UN NOUVEAU ROLE DES CELLULES DE SOUTIEN DANS L'ETABLISSEMENT DE LA PCP AU SEIN DE L'ORGANE DE CORTI	118
5.1.1	<i>Objectifs</i>	118
5.1.2	<i>Résultats</i>	119
5.1.2.1	Analyse de l'asymétrie proximo-distale de Vangl2 dans l'organe de Corti	119
5.1.2.2	La délétion de Scrib1 dans la cellule sensorielle n'affecte pas l'asymétrie de Vangl2, mais entraîne une perturbation de la polarité planaire	120
	<i>Publication n°1 : High resolution imaging of Vangl2 and conditional Scrib1 mutants reveal an important role for non sensory cells in Mammalian Planar Cell Polarity</i>	121
	Abstract	123
	Introduction	124
	Materials and methods	125
	Results	127
	Vangl2 accumulates asymmetrically at distal edges of supporting cells and hair cells	127
	A mutation in the first extracellular loop of Vangl2 does not affect its asymmetrical localization but affects its stability	129
	Scrib1 is required for PCP signaling in hair cells and for convergent extension	130
	Scrib1 is required for cellular patterning and Vangl2 asymmetry	131

The PDZ-BM of Vangl2 is required for its basolateral localization in cochlear hair cells	132
Vangl2 overexpression disrupts PCP, and the PDZ-BM is essential for PCP function	133
Discussion	134
The distribution of Vangl2 is asymmetric in supporting cells and hair cells	134
Dual role of Scrib1 in the cochlear epithelium.....	135
Structure/function analysis of Vangl2 protein.....	136
References	138
Supplemental Experimental Procedures.....	143
Figure legends.....	145
5.2 ANALYSE DU ROLE DE GIPC1 DANS LA REGULATION, DANS L'ORGANE DE CORTI, DE LA POLARITE	
PLANAIRE ET DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE VANGL2	162
5.2.1 <i>Objectifs</i>	162
5.2.2 <i>Résultats</i>	162
5.2.2.1 Identification de GIPC1 comme nouvel interacteur	162
5.2.2.2 Vangl2 et GIPC1 interagissent.....	163
5.2.2.3 GIPC1 est impliqué dans la régulation de Vangl2 et forme des complexes	163
5.2.2.4 Analyse du rôle fonctionnel de GIPC1 dans l'organe de Corti.....	165
<i>Publication n°2 : GIPC1 has a dual role in Vangl2 trafficking and hair bundle integrity</i>	167
Abstract.....	168
Introduction	169
Results	170
Vangl2 and GIPC1 interact.....	170
GIPC1/synectin mutant have no phenotype	171
GIPC1 and Vangl2 are present in endocytic vesicles	171
GIPC1 and myosin VI form a protein complex with Vangl2.....	172
Myosin VI participate in Vangl2 trafficking	173
Vangl2 accumulates asymmetrically at distal edges of supporting cells and hair cells.....	174
GIPC downregulation leads to hair bundle phenotypes <i>in vitro</i>	175
GIPC downregulation leads to hair bundle phenotypes <i>in vivo</i>	176
Discussion	178
GIPC are regulators of Vangl2 trafficking and PCP.....	178
GIPC is a major regulator of hair bundle formation/maintenance.....	180
Experimental Procedures.....	182
References	187
6 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	202
REFERENCES	222
ANNEXES	232

Liste des Figures

Figure 1 : Axes de développement et polarité apico-basale.....	19
Figure 2 : Polarité apico-basale et Polarité Planaire Cellulaire au sein d'un épithélium.....	21
Figure 3 : Voies Wnt/Wng/Frizzled canoniques et non canoniques.....	22
Figure 4 : Polarité Planaire Cellulaire dans l'épithélium de l'aile de drosophile.....	24
Figure 5 : Polymérisation d'actine et de tubuline dans les cellules épithéliales de l'aile de drosophile.....	25
Figure 6 : Polarité Planaire Cellulaire dans l'oeil de drosophile.....	26
Figure 7 : Polarité Planaire cellulaire dans l'aile de drosophile d'un mutant pour un gène de la cassette <i>Frizzled/Flamingo</i>	27
Figure 8 : Polarité Planaire cellulaire dans l'aile de drosophile d'un mutant de la cassette <i>Frizzled/Flamingo</i> et surexprimant un gène de la cassette <i>Fat/Dachsous</i>	29
Figure 9 : Tableau de Vincent Van Gogh prêtant leurs noms aux gènes de la polarité planaire.....	31
Figure 10 : Localisations subcellulaires asymétriques des protéines centrales de la PCP selon l'axe proximo-distal.....	39
Figure 11 : Complexes des protéines centrales de la PCP à la jonction entre deux cellules....	41
Figure 12 : Polarité Planaire cellulaire dans l'aile de drosophiles mosaïques pour le gène <i>Frizzled</i>	43
Figure 13 : Résumé de la signalisation PCP chez la drosophile.....	44
Figure 14 : Pelage d'une souris mutante pour le gène <i>Frizzled 6</i>	47
Figure 15 : Organisation de l'oreille externe, moyenne et interne chez l'homme.....	48
Figure 16 : Coupe transversale d'une cochlée.....	50
Figure 17 : Coupe transversale de l'organe de Corti.....	51
Figure 18 : Anomalie de l'orientation des touffes ciliaires des cellules ciliées de l'organe de Corti chez des mutants PCP.....	59
Figure 19 : Anomalies référencées chez les mutants PCP homozygotes.....	60
Figure 20 : Asymétrie proximo-distale des protéines centrales de la PCP dans l'organe de Corti.....	64
Figure 21 : Interactions entre les protéines apico-basales et les protéines de la PCP.....	67

Figure 22 : Ouverture du tube neural chez des mutants pour des gènes de la PCP.....	72
Figure 23 : Structure secondaire de Vangl2.	78
Figure 24 : Structure secondaire de GIPC1 et profil d'expression génique.....	94
Figure 25 : Modélisation de la structure tridimensionnelle d'un domaine PDZ.	95
Figure 26: Modélisation tridimensionnelle du domaine PDZ de GIPC1.....	98
Figure 27 : Rôle du complexe GIPC1/myosine VI dans l'endocytose.	100
Figure 28: Isolement de l'épithélium cochléaire d'embryon de rat par microdissection.....	107
Figure 29 : Principe de la microscopie STED.	116
Figure 30 : Crible double hybride.....	164
Figure 31 : Comparaison entre la localisation asymétrique de Vangl2 communément admise par la littérature et la localisation proposée dans notre modèle.	204
Figure 32 : Nouveau modèle de la PCP dans l'oreille interne de mammifère.....	206
Figure 33 : Mécanismes pouvant réguler l'asymétrie de Vangl2 à la jonction entre cellule ciliée et cellule de soutien.....	208
Figure 34 : Rôles potentiels de Scrib1 et GIPC1 sur la régulation de l'asymétrie de Vangl2.....	209
Figure 35 : Effet non autonome de Strabismus dans l'aile de drosophile.....	219
Figure 36 : Effet autonome et non autonome de Vangl2 dans l'organe de Corti.....	220
Figure 37 : Rôle de scrib1 sur la localisation de Vangl2 dans l'organe de Corti.	211
Figure 38 : Phénotypes observés chez des souris WT, Scrib1 ^{CKO} et Scrib1 ^{Crc/Crc}	212
Figure 39 : Signaux de l'extension convergente et de la PCP régulé par Scrib1.....	213

Liste des Tables

Table 1 : Gènes et protéines des cassettes de signalisation <i>Frizzled/Flamingo</i> et <i>Fat/Daschous</i>	34
Table 2 : Marqueurs de différenciation des cellules ciliées et de soutien.....	56
Table 3 : Gènes centraux de la PCP chez les mammifères	61
Table 4 : Nouveaux gènes PCP mis en évidence chez les mammifères.	62
Table 5 : Les différentes dénominations de <i>Vangl2</i> dans la littérature.....	76
Table 6 : Exemples d'interactions génétiques avec <i>Vangl2</i>	81
Table 7 : Séquences consensus de PDZ-Binding Domain	83
Table 8 : PDZ-Binding Domain impliqués dans la distribution polarisée apico-basale de protéines dans des cellules épithéliales. Adapté de Milewsky et al, 2004	84
Table 9 : Etudes portant sur la délétion de domaines protéiques de <i>Vangl2</i> chez différentes espèces	87
Table 10 : Homologies intra-espèces et inter-espèces au sein de la famille <i>GIPC</i>	91
Table 11 : Dénomination GIPC1 dans la littérature.....	92
Table 12 : PDZ-BDM des partenaires de GIPC1	96
Table 13 : Vecteur de surexpression.....	111
Table 14 : Vecteurs de sous-expression.	111
Table 15 : Anticorps primaires.	112
Table 16 : Anticorps secondaires.....	113
Table 17 : Phallotoxines.....	113

Résumé

Outre leur polarité apico-basale, certaines cellules épithéliales développent une seconde polarité, appelée **Polarité Planaire Cellulaire (PCP)**. L'axe de la PCP est orienté perpendiculairement à l'axe de polarité apico-basale et régit l'orientation uniforme de certaines structures, comme les poils ou cils, non seulement à l'échelle de la cellule mais également au sein du tissu. L'épithélium cochléaire est l'un des meilleurs modèles d'étude de PCP chez les mammifères. En effet, les cellules neuro-épithéliales qui le composent, soutenues par des cellules de soutien, présentent à leur apex, des touffes ciliaires dont l'orientation est parfaitement coordonnée par la voie de la polarité planaire. Les deux premiers gènes impliqués dans la PCP chez les mammifères, *Vangl2* et *Scrib1*, ont été identifiés sur la base du phénotype de la cochlée chez les mutants. L'analyse de la localisation de *Vangl2* dans l'organe de Corti a également révélé une localisation asymétrique proximo-distale et transitoire de la protéine, perpendiculaire à l'axe apico-basal classique. Cette asymétrie apparaît à la jonction entre deux types cellulaires : une cellule sensorielle ciliée et une cellule de soutien. J'ai pu montrer au cours de mes travaux de thèse que cette asymétrie était majoritairement due à une accumulation de *Vangl2* du côté distal des cellules de soutien, et que dans une moindre mesure, *Vangl2* pouvait ségréger du côté distal des cellules ciliées. Cette localisation subcellulaire très précise et limitée dans l'espace semble être indépendante de l'expression du gène *Scrib1* dans les cellules ciliées. La délétion du gène *Scrib1* dans les cellules ciliées m'a toutefois permis de mettre en évidence que ce gène avait un rôle autonome dans la régulation de la PCP, et que les cellules de soutien de l'organe de Corti pouvaient jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de la PCP. Mes travaux ont également permis de mettre en évidence que *GIPC1* avait un rôle dans la régulation de la PCP et le maintien de l'intégrité des touffes ciliaires des cellules sensorielles, et que le complexe *GIPC1/Myosine VI* pouvait réguler l'établissement de l'asymétrie de *Vangl2* dans l'organe de Corti.

Avant-propos

Ce travail de thèse porte sur l'étude de la régulation de la protéine centrale de la polarité planaire cellulaire (PCP) *Vangl2* dans l'oreille interne de mammifère. L'introduction de ce manuscrit est bâtie autour de trois grands chapitres. Les mécanismes contrôlant la PCP ayant d'abord été découverts et décrits chez la drosophile, je vous présenterai dans un premier temps, et de façon brève, les rudiments de la PCP mis en jeu chez cet invertébré. Après un bref historique des premières références suggérant l'existence d'un mécanisme contrôlant l'orientation des poils recouvrant les épithéliums chez la drosophile, je vous parlerai des différents gènes PCP ayant été mis en évidence. Vous verrez notamment qu'ils s'organisent en différentes classes. Vous découvrirez également que ces gènes contrôlent de façon cellule autonome et non autonome les signaux de la polarité planaire, et qu'ils codent pour des protéines qui ont la particularité de ségréger asymétriquement dans les cellules présentant une polarisation de leurs poils. Vous verrez par la suite que la plupart des mécanismes établis chez la drosophile est conservée chez les mammifères. Je vous montrerai également que les gènes de la PCP chez les mammifères contrôlent l'architecture de nombreux tissus et qu'ils régissent de nombreux mécanismes comme l'extension convergente. Je consacrerai une grande partie de cette introduction à vous présenter notre modèle d'étude de la PCP chez le mammifère : l'organe de Corti, organe sensoriel situé dans l'oreille interne. Dans un deuxième temps, je m'attacherai à vous présenter de manière la plus approfondie ce que nous savons de la protéine *Vangl2*, ainsi que son rôle dans la régulation de la PCP chez les vertébrés. Dans une troisième partie, je vous parlerai de la protéine *GIPC1*, ayant été mise en évidence par notre laboratoire, comme pouvant interagir avec *Vangl2*. Vous découvrirez à cette occasion que *GIPC1* contrôle des mécanismes semblables à ceux qui sont contrôlés par les gènes de la PCP. À la suite de cette introduction, je vous présenterai les techniques les plus originales que j'ai utilisé afin de mieux appréhender le rôle de *Vangl2* dans la régulation de la PCP dans l'organe de Corti. Mes travaux sont organisés autour de deux manuscrits qui seront discutés de façon plus globale en dernier chapitre.

Introduction

Les vertébrés, comme tous les organismes pluricellulaires, sont des êtres polarisés. Le développement de leur embryon dépend de l'établissement de différentes polarités, qui définissent les axes de cet embryon et le long desquels s'organisent les différentes structures du futur individu. Le développement s'opère ainsi dans un espace tridimensionnel défini selon trois axes qui sont représentés chez un organisme par :

- L'axe antéro-postérieur (A/P)
- L'axe dorso-ventral (D/V)
- L'axe droite-gauche (D/G)

Le développement ne peut ni avoir lieu ni aboutir sans ce système de coordonnées spatiales. Le futur individu acquiert ainsi un avant et un arrière, un ventre et un dos, un côté droit et un côté gauche (Figure 1).

Par le terme « polarisé », il faut aussi comprendre « asymétrique ». En effet, un axe de polarité peut être perçu comme un manque ou une absence de symétrie. Ainsi, l'avant d'un individu n'est pas équivalent à son arrière et il en est de même pour ses différents pôles. Si cette polarité externe est la plus visible, il existe d'autres polarités qui le sont moins. Ce sont des polarités internes. En effet, la polarisation d'un organisme s'opère à différentes échelles. Ainsi, les **organes** ou **tissus** se localisent de part et d'autre des différents axes de développement, de façon différentielle et non symétrique. On peut également observer une polarisation à l'échelle d'une **cellule** ou bien d'une **organelle**.

Les différentes polarités que nous pouvons rencontrer sont les suivantes :

- la polarité droite-gauche
- la polarité apico-basale
- la polarité planaire cellulaire

La polarité droite-gauche

L'une des polarités peu évidentes chez un individu est sa polarité droite-gauche. Les organes ne sont pas tous repartis de façon symétrique par rapport à son axe médian. À titre d'exemple, le cœur se situe à gauche, l'intestin s'enroule de façon non symétrique, le foie et l'estomac sont à droite, le poumon droit à trois lobes alors que le gauche n'en a que deux. De la même façon, l'hémisphère droit du cerveau diffère de l'hémisphère gauche. Ces asymétries ont pour but d'optimiser la place que prennent les organes, ainsi que de faciliter l'homéostasie. Cette répartition a également une répercussion sur la fonction des organes polarisés. Ainsi, nous pouvons songer à la latéralisation droite-gauche du cerveau, durant laquelle certaines fonctions du cerveau vont être préférentiellement prises en charge au cours du développement, par l'un ou l'autre des hémisphères.

La polarité apico-basale

La polarité apico-basale est une polarité typique des tissus épithéliaux. Les épithéliums sont également des structures non symétriques, polarisées. Ainsi, si nous prenons l'exemple de la muqueuse intestinale, celui-ci peut être assimilé à un tissu présentant différentes couches organisées selon un axe apico-basal. En effet, la muqueuse intestinale est composée d'un épithélium intérieur, d'une lame moyenne ainsi que d'une muqueuse musculaire extérieure (muscularis mucosae). Cette organisation assure la fonctionnalité du tissu, c'est-à-dire, l'absorption intestinale. L'épithélium intérieur présente également une polarité apico-basale qui lui est propre. En effet l'analyse d'une coupe transversale de cet épithélium, révèle qu'il joue le rôle d'une interface entre la lumière de l'intestin et la circulation sanguine. Il assure ainsi une absorption optimale aux vues de son organisation en nombreuses villosités. Plus généralement, la polarité apico-basale permet d'établir une **directionnalité** à la fonction de l'épithélium. Chaque cellule, composant l'épithélium, est également polarisée. Comme le montre la Figure 1, les cellules de l'épithélium sont pourvues dans leur partie apicale de microvillosités, formant une bordure en brosse. Ce type de structure assure également une optimisation de la surface d'échanges impliqués dans le processus d'absorption intestinale.

De nombreux types de jonctions réparties sur les membranes plasmiques des cellules épithéliales participent à la polarisation de la cellule. L'espace apical est séparé des membranes baso-latérales par le biais de jonctions serrées (ou tight junctions). Elles limitent la diffusion des protéines membranaires baso-latérales vers le pôle apical de la cellule. Les jonctions serrées assurent également un rôle d'étanchéité, empêchant toute communication entre l'espace luminal et l'espace intercellulaire. La cohésion du tissu est assurée par de nombreux types de jonctions distribuées dans un ordre bien précis le long de l'axe apico-basal. On trouve ainsi du pôle basal vers le pôle apical (Figure 1):

- des hemidesmosomes : ils permettent d'ancrer solidement les cellules épithéliales à la lame basale sous-jacente, grâce à des filaments intermédiaires ainsi que des intégrines.
- des jonctions de communication ou « GAP junctions » : formées de connexines associées en hexamère sous la forme d'un canal, elles assurent la communication de la cellule épithéliale avec la cellule voisine. La fermeture du canal peut être régulée.
- des desmosomes : ils forment la **Macula Adherens** et assurent l'adhésion entre cellule, grâce à des cadherines, la desmoplakine, la plakoglobine ainsi que des filaments intermédiaires.
- des jonctions d'adhérence ou **Zonula Adherens** : composées notamment de cadherines, et de β -caténine.
- des jonctions serrées ou **Zonula Occludens** composées des protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3.

Autres types de polarité

Les cellules non épithéliales présentent également d'autre forme de polarité. Nous pouvons prendre comme exemple, le neurone, qui est une cellule extrêmement polarisée. Un neurone, afin d'assurer la transmission d'un influx, possède deux pôles. Le premier pôle est composé de dendrites, unités permettant la réception de l'influx nerveux, alors que le deuxième pôle, composé d'un axone, est chargé de transmettre l'influx nerveux vers un autre neurone ou vers un organe selon le type de neurone. Le centrosome constitue le site de polymérisation des microtubules donnant naissance à l'axone, et est également l'un des premiers signes de **chiralité intrinsèque** et donc de polarisation de la cellule nerveuse.

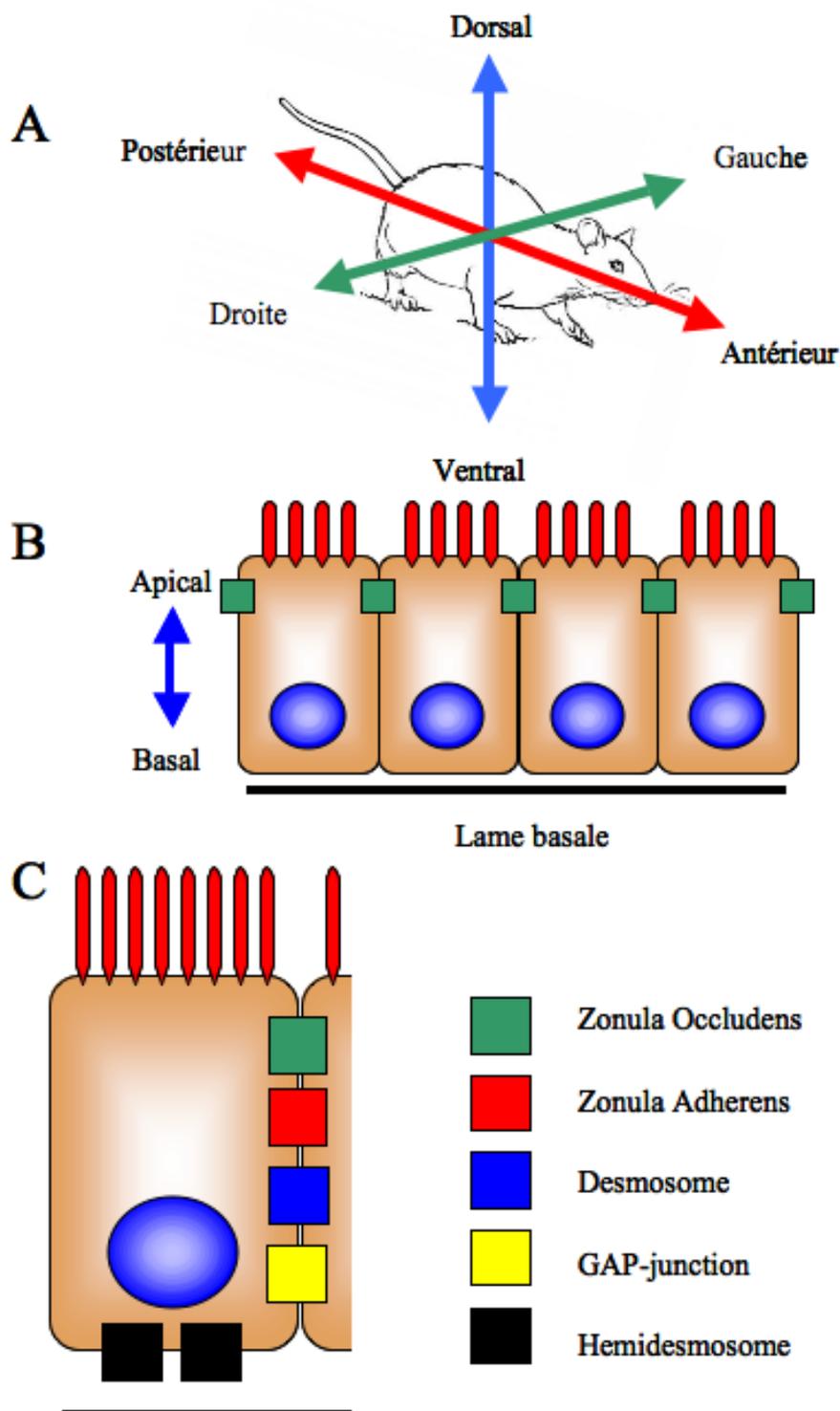


Figure 1 : Axes de développement et polarité apico-basale.

Le laboratoire étudie plus particulièrement les mécanismes moléculaires régissant la **polarité planaire cellulaire (PCP)** chez les mammifères, une autre forme de polarité épithéliale qui permet de définir une nouvelle directionnalité à un épithélium. Cette polarité est en effet perpendiculaire à la polarité apico-basale, et permet l'organisation de structures comme des cils ou des poils, dans le plan de l'épithélium. Je vais, au fil des divers chapitres de ma thèse, présenter les mécanismes contrôlant la PCP.

L'ensemble de ces polarités est donc essentiel au développement d'un organisme et révèle toute la complexité de ce processus. Ces polarités permettent d'apporter une directionnalité ainsi qu'une coordination au développement. Nous verrons également au cours de cette thèse qu'il existe une certaine **coopération** entre les molécules régissant la polarité apico-basale et celle de la polarité planaire. Pour comprendre la façon dont un organisme devient polarisé, asymétrique au cours du développement, il est donc nécessaire de comprendre la façon dont ces polarités s'établissent et donc d'identifier les molécules et les gènes contrôlant ces mécanismes. L'identification de ces molécules permettrait entre autres, de mieux diagnostiquer et traiter les malformations, ainsi que les anomalies découlant d'un défaut d'asymétrie.

Chapitre 1 : Polarité Planaire Cellulaire (PCP)

1.1 Définition et généralités

Outre leur polarité apico-basale, certaines cellules épithéliales développent une seconde polarité appelée Polarité Planaire Cellulaire (PCP). L'axe de la polarité planaire est orienté perpendiculairement à l'axe de polarité apico-basale et régit l'orientation uniforme de certaines structures, comme des poils ou des cils, non seulement à l'échelle de la cellule mais également au sein d'un tissu (Figure 2).

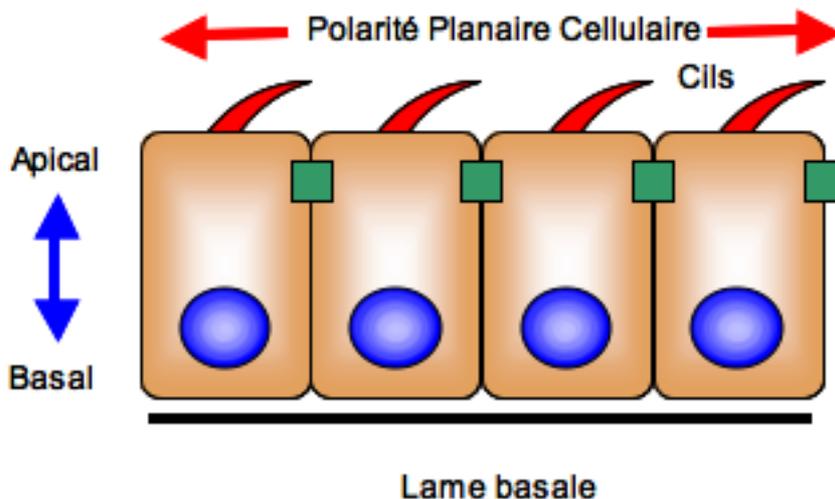


Figure 2 : Polarité apico-basale et Polarité Planaire Cellulaire au sein d'un épithélium.

La notion de PCP fut décrite pour la première fois chez la punaise *Rhodnius* par Wigglesworth en 1940. Wigglesworth avait alors observé que les soies de cette punaise s'alignaient de façon uniforme, au cours du développement le long de l'axe antéro-postérieur de l'individu (Wigglesworth, 1940). Le concept fut repris en 1966 par Lawrence, où un mécanisme semblait contrôler l'orientation des poils situés sur la cuticule du « milkweed bug », petit insecte ressemblant au « gendarme » (Lawrence et al, 1966). Il ne fait aucun doute que la PCP contrôle également l'agencement des écailles des poissons ou encore celle des

plumes des oiseaux. Bien que la voie PCP soit encore mal connue, les molécules mises en jeu dans ses mécanismes sont conservées au cours de l'évolution. Des études chez la drosophile et chez les vertébrés ont révélé que les protéines ainsi que les mécanismes qui régulent la PCP étaient relativement bien conservés, en faisant appel notamment aux récepteurs Frizzled (Fzd). La voie PCP appartient en effet aux voies Wnt/Wng/Frizzled non canoniques (Figure 3).

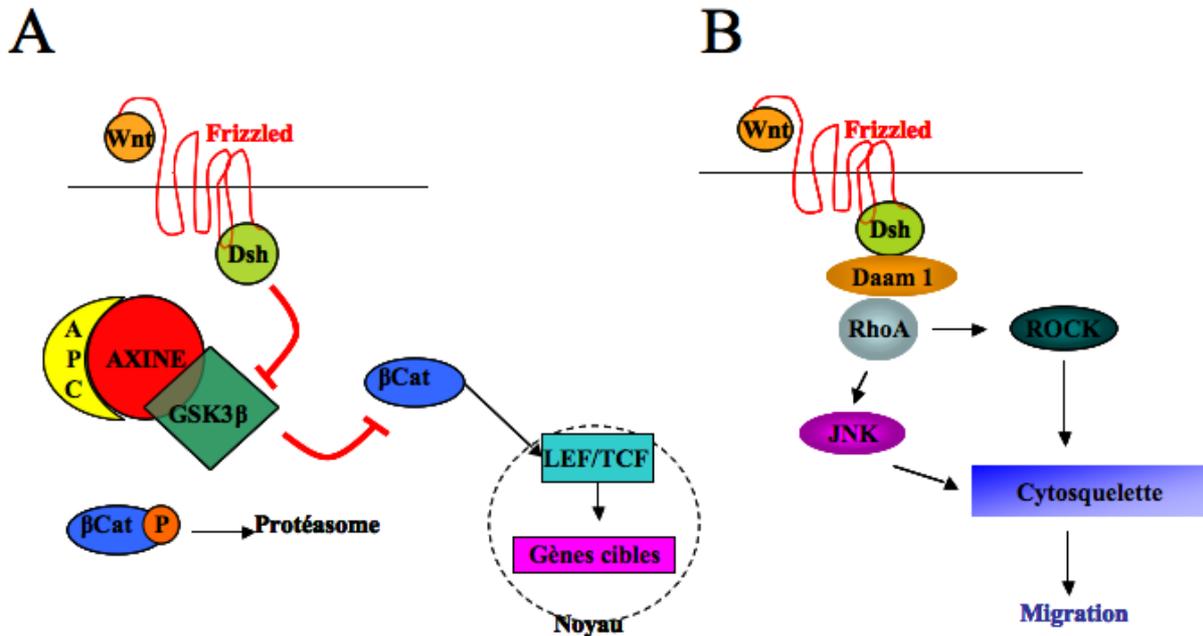


Figure 3 : Voies Wnt/Wng/Frizzled canoniques et non canoniques.

A : Voie canonique β-Caténine dépendante ; B : Voie non canonique ; La voie canonique calcium dépendante n'est pas représentée.

Si les molécules régulant la PCP ne sont certainement pas toutes identifiées, nous savons que la finalité d'action de ces molécules est la régulation du cytosquelette d'actine et de tubuline. Dès 1957, Piepho et Marcus avaient émis l'hypothèse selon laquelle l'orientation des écailles de la cuticule du papillon *Galleria Mellonella* dépendait du remodelage du cytosquelette (Piepho et Marcus, 1957). Des études plus tardives ont montré que les molécules contrôlant la PCP sont des molécules polarisées et localisées au niveau du pôle apical des cellules épithéliales. Ces molécules, situées au niveau des jonctions adhérentes, co-localisent d'ailleurs avec les protéines régulant la polarité apico-basale. Ainsi, une polarité planaire correcte ne saurait s'établir sans la présence, au préalable, d'une polarité apico-

basale. Il est difficile de ne pas envisager une **coopération** entre les molécules de la polarité planaire et celles de la polarité apico-basale.

1.2 Polarité Planaire Cellulaire chez la drosophile

La drosophile, *Drosophila Melanogaster*, est un excellent modèle pour étudier les mécanismes fondamentaux de la polarité planaire cellulaire.

La PCP a été largement étudiée chez cet insecte où elle se manifeste dans tous les épithéliums dérivants des différents disques imaginaux (Adler, 2002, Strutt, 2003, Klein and Mlodzik, 2005, Axelrod, 2009). Elle intervient notamment :

- dans l'orientation distale des poils situés au niveau de **l'épithélium de l'aile**
- dans l'orientation postérieure des poils cellulaires et des soies sensorielles situées sur **l'abdomen**, le thorax et les pattes de la drosophile
- dans l'arrangement très ordonné des facettes oculaires, ou **ommatidies**, de l'œil de drosophile
- La PCP régit également la division asymétrique des neuroblastes ou des organes sensoriels de l'animal.

Pour chaque fonction, un remodelage et une polarisation du cytosquelette sont des critères primordiaux pour l'établissement d'une polarité planaire correcte. Je vais m'attacher à décrire la PCP au niveau de l'aile, ainsi qu'au niveau de l'œil de drosophile. L'aile de drosophile permet de présenter un système ne présentant qu'un seul type de cellules épithéliales, alors que l'œil de drosophile est constitué de plusieurs types cellulaires.

1.2.1 La PCP contrôle l'orientation des trichomes de l'aile de drosophile

L'aile de drosophile possède un épithélium couvert de trichomes, extensions cytoplasmiques, équivalentes à des poils (Figure 4). Toutes les cellules appartenant à cet épithélium sont équivalentes, hexagonales, et portent dans leur partie apicale, un trichome qui est formé à partir de polymérisation d'actine globulaire en filaments d'actine ainsi que de

tubuline en microtubules. Ces trichomes sont orientés de manière uniforme vers le pôle distal. Les mécanismes contrôlant cette orientation est régie par la polarité planaire (Strutt, 2002).

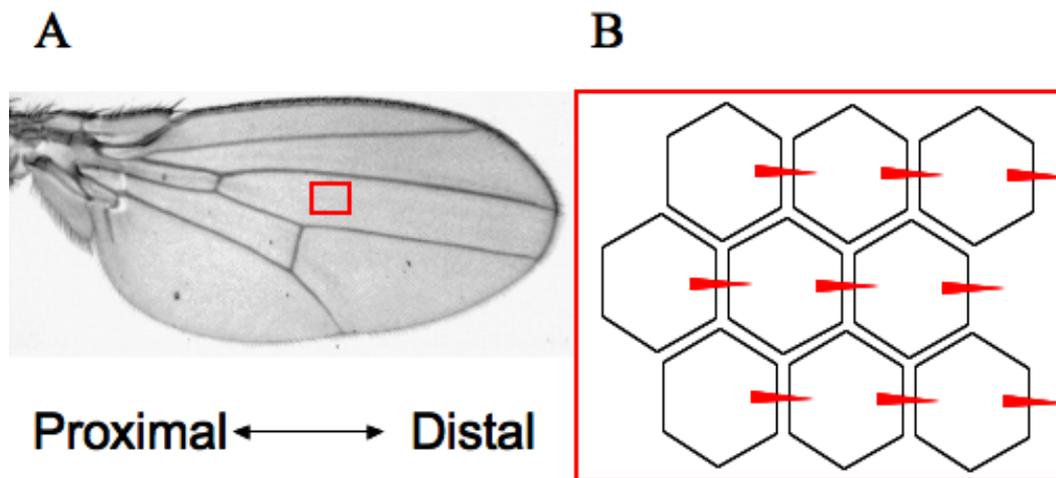


Figure 4 : Polarité Planaire Cellulaire dans l'épithélium de l'aile de drosophile.

A : Vue de surface d'une aile de drosophile ; B : Les trichomes sont représentés par des triangles rouges placés du côté distal des cellules épithéliales hexagonales.

12 à 30h après la formation de la puppe, période durant laquelle la drosophile passe de l'état de larve à l'état d'imago, en réponse à la voie PCP, toutes les cellules épithéliales de l'aile se polarisent le long de l'axe proximo-distal (Klein and Mlodzik, 2005) (Figure 5). Cette polarisation se traduit alors par :

- un déplacement du centre de polymérisation d'actine en position distale lui conférant une localisation asymétrique
- une augmentation du nombre de microtubules organisés entre le centre de la cellule et le vertex distal,
- une élongation des filaments d'actine et des microtubules en position distale donnant naissance à un trichome (Eaton, 1997)
- une orientation uniforme des poils résultant de cette polymérisation.
-

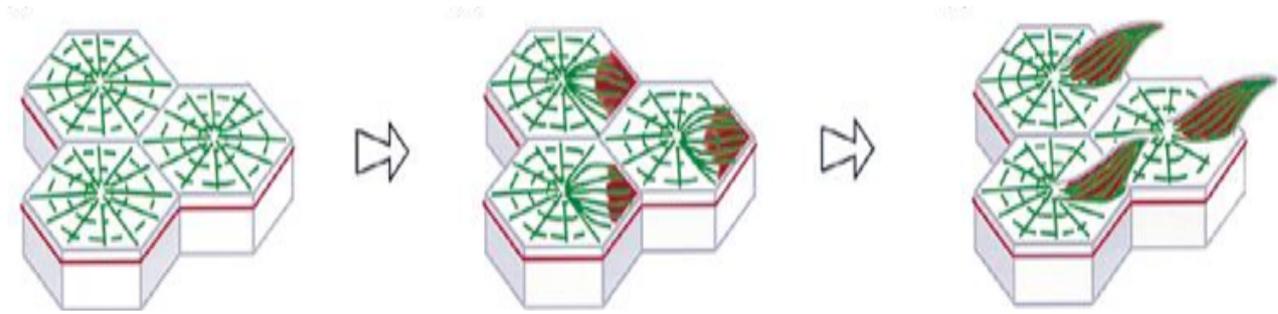


Figure 5 : Polymérisation d'actine et de tubuline dans les cellules épithéliales de l'aile de drosophile.

La tubuline est représentée en vert et l'actine en rouge (Eaton, 1997).

L'apparition de ces mutants spontanés chez la drosophile, présentant une orientation non uniforme des poils de l'aile, a permis d'identifier les premières molécules participant à la signalisation PCP. Ces mutants présentent également une anomalie dans tous les organes précédemment cités.

1.2.2 La PCP contrôle la rotation des ommatidies de l'œil de drosophile

La polarité planaire dans l'œil de drosophile est plus complexe car elle fait intervenir plusieurs types cellulaires. L'œil de drosophile est un œil à multifacettes, composé d'ommatidies. Les ommatidies sont des unités composées de huit photorécepteurs et de cellules accessoires possédant une forme trapézoïdale. Dans l'œil de drosophile, la polarité planaire est reflétée par l'arrangement en miroir des ommatidies, résultant d'un mouvement de rotation de part et d'autre de la ligne dorso-ventrale. Cette ligne dorso-ventrale est également connue sous le nom d'équateur (Figure 6). Dans la partie dorsale de l'œil, les ommatidies pointent vers le pôle dorsal alors que, dans la partie ventrale, elles pointent vers le pôle ventral. Les ommatidies sont donc polarisées selon un axe dorso-ventral de part et d'autre de l'équateur (Fanto and Mlodzik, 1999). Les photorécepteurs R3 et R4 semblent essentiels à l'établissement de la polarité des ommatidies. Le photorécepteur R3 recevrait un signal de polarisation, tandis que le photorécepteur R4 générerait un biais au niveau des cellules voisines des récepteurs R3 et R4. Ce mécanisme permettrait de générer la polarisation

des ommatidies. Chez les mêmes mutants de la polarité planaire présentant un défaut de polarisation des poils de l'aile, les ommatidies, d'un point de vue de leur sens ou leur vitesse de rotation, est perturbée et ceci se traduit par la perte de leur arrangement en miroir.

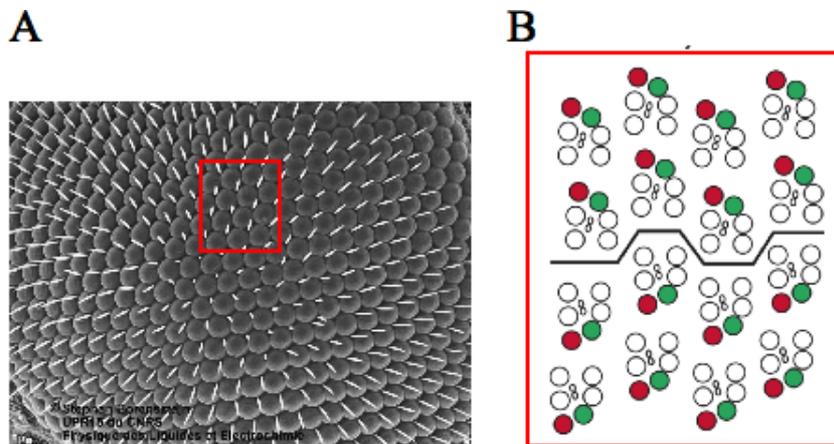


Figure 6 : Polarité Planaire Cellulaire dans l'œil de drosophile.

A : Vue de surface d'un œil de drosophile ; B : Les photorécepteurs R3 et R4 sont représentés par des disques rouges et verts. La ligne équatoriale est représentée par une ligne brisée.

1.2.3 Les gènes PCP sont organisés en deux cassettes de signalisation

La plupart des gènes régissant la PCP a donc été identifiée sur la base du phénotype observé dans l'aile et dans l'œil de drosophile. Les gènes de la polarité planaire ont été classés en deux cassettes de signalisation selon le phénotype engendré par leur mutation. Les cassettes sont les suivantes :

- la cassette *Frizzled/Flamingo* ou gènes centraux de la PCP

Les gènes centraux de la PCP sont caractérisés par trois critères. (1) Les mutations de ces gènes entraînent des problèmes de polarité cellulaire, à savoir une mauvaise orientation des trichomes, mais elles ont peu d'effet sur la forme des cellules de l'aile de drosophile (Lawrence et al., 2007) (Figure 7). Le gain de fonction pour l'un de ces gènes se traduit également par un problème de polarité cellulaire. (2) Les protéines codées par ces gènes, les

protéines centrales de la PCP, ségrègent de façon asymétrique dans les cellules polarisées. (3) Les mutants pour l'un de ces gènes se voient perdre la localisation asymétrique de toutes les protéines centrales de la PCP.

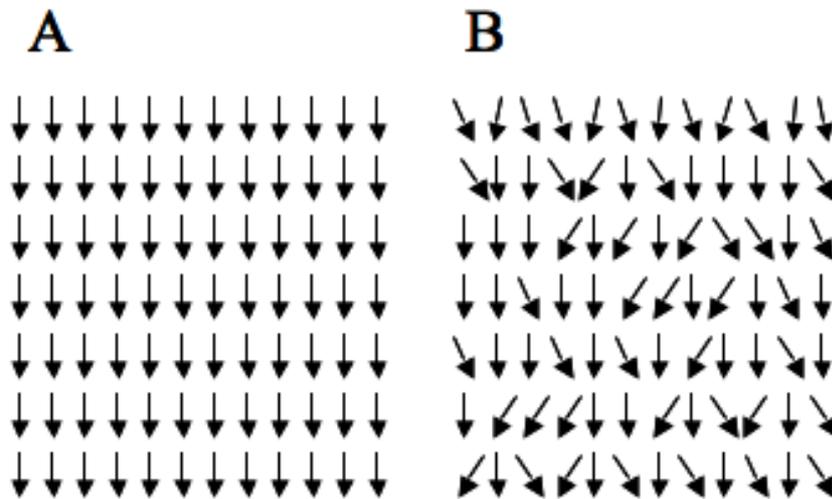


Figure 7 : Polarité Planaire cellulaire dans l'aile de drosophile d'un mutant pour un gène de la cassette *Frizzled/Flamingo*.

Les flèches noires symbolisent l'orientation des trichomes dans l'aile de drosophile. Les trichomes pointent vers le pôle distal de l'aile chez la drosophile sauvage. A : aile de drosophile sauvage ; B : aile de drosophile mutante.

- la cassette *Fat/Dachsous/Four-jointed*

Les mutations des gènes *fat* (*ft*), *dachsous* (*ds*) ou *four-jointed* (*ff*) entraînent des problèmes de polarité mais également des problèmes de forme ainsi que de croissance de l'aile et des pattes de la drosophile (Lawrence et al., 2007).

Lors de la découverte de la cassette *Fat/Dachsous/Four-jointed*, il avait été supposé que cette cassette agissait en amont de la cassette *Frizzled/Flamingo* (Théorie d'Axelrod). L'hypothèse actuelle (Lawrence et al., 2007) veut que les deux cassettes agissent en parallèle. Les éléments confortant cette hypothèse, seront détaillés dans les chapitres suivants.

1.2.4 La cassette de signalisation *Fat/Dachsous/Four-jointed*

Un groupe de gènes, récemment découvert, appelé également cassette *Fat/Dachsous*, a été montré comme étant impliqué dans la régulation de la polarité planaire (Voir pour revues (Strutt, 2002, Lawrence et al., 2007, Wu and Mlodzik, 2009) (Table 1). Ces gènes régulent la PCP dans tous les épithéliums de la drosophile, et agissent en parallèle de la cassette *Frizzled/Flamingo*. Ils sont au nombre de trois et nous pouvons compter :

- Le gène *Four-jointed (Fj)* codant une protéine transmembranaire de type II (Zeidler et al., 1999)
- Le gène *Fat (Ft)* codant une cadherine (Rawls et al., 2002)
- Le gène *Dachsous (Ds)* codant également une cadherine (Casal et al. 2002)

À titre d'exemple, l'expression ectopique ou la perte de fonction du gène *four-jointed*, au cours du développement de l'œil de drosophile, entraîne une anomalie dans l'orientation des ommatidies, et ce de façon non autonome (Zeidler et al., 1999).

Les protéines codées par ces gènes, contrairement aux protéines centrales de la PCP, ne sont pas localisées asymétriquement au sein des cellules de l'aile ou des ommatidies de la drosophile. Ainsi, dans l'aile de drosophile, *Dachsous* est exprimé très fortement du côté proximal de l'aile, puis son expression diminue quand on se rapproche du pôle distal, formant ainsi un gradient d'expression au sein du tissu. *Four-jointed* est, quant à lui, exprimé selon un gradient inverse, tandis que *Fat* est exprimé de façon uniforme au sein du tissu. À l'origine, il a été supposé que la cassette *Fat/Dachsous* se trouvait en amont de la cassette *Frizzled/Flamingo*. Le gradient d'expression de la cassette *Fat/Dachsous* aurait alors réguler la localisation asymétrique des protéines centrales de la PCP. Plus récemment, l'équipe de Lawrence a montré en 2006 que la cassette *Fat/Dachsous* agissait en parallèle de la cassette *Frizzled/Flamingo* (Casal et al. 2006). L'un des exemple le plus convaincant, accreditant cette hypothèse, est résumé dans la revue de l'équipe de Lawrence (Lawrence et al, 2007). En effet, la surexpression ectopique des gènes *Fat*, *Dachsous*, ou *Four-jointed* dans l'abdomen, est capable de rétablir l'orientation des poils de drosophiles mutantes pour les gènes de la cassette *Frizzled/Flamingo* (Figure 8).

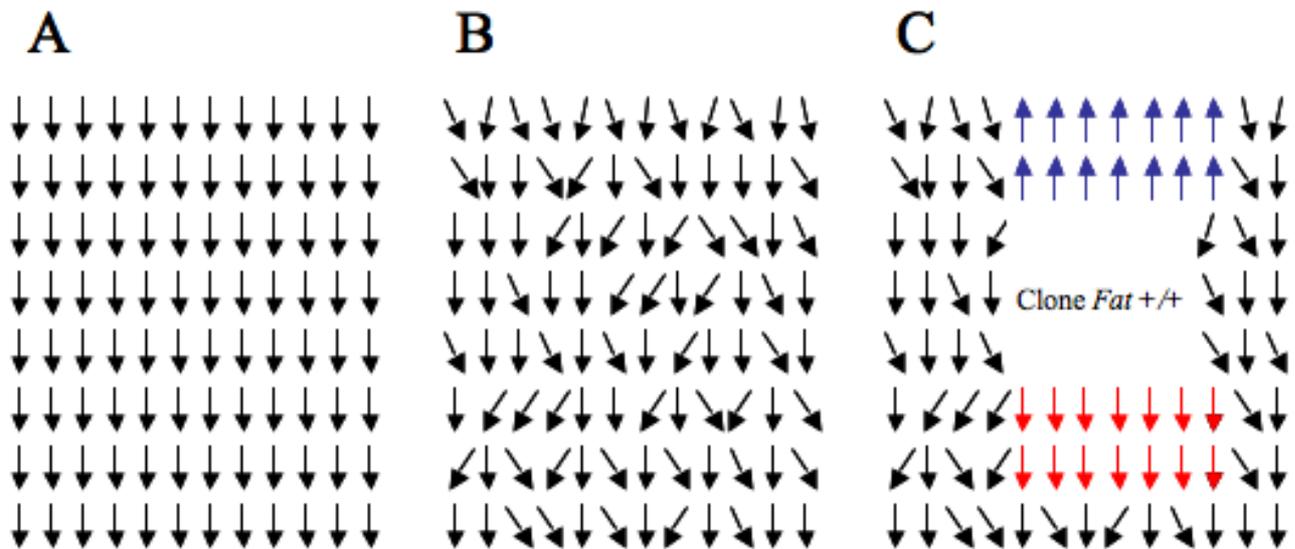


Figure 8 : Polarité Planaire cellulaire dans l'aile de drosophile d'un mutant de la cassette *Frizzled/Flamingo* et surexprimant un gène de la cassette *Fat/Dachsous*.

Les flèches symbolisent l'orientation des trichomes dans l'aile de drosophile. Les trichomes pointent vers le pôle distal de l'aile chez la drosophile sauvage. A : aile de drosophile sauvage ; B : aile de drosophile mutante pour la cassette *Frizzled/Flamingo* ; C : aile de drosophile mutante pour la cassette *Frizzled/Flamingo*. Clone *Fat +/+* : Cellules surexprimant le gène *Fat*. Les flèches rouges et bleues symbolisent la réorientation des poils engendrée par le clone *fat+/+*

1.2.5 La cassette de signalisation *Frizzled/Flamingo* ou gènes centraux de la PCP

1.2.5.1 Les gènes centraux de la PCP

L'analyse de nombreux mutants PCP existant chez la drosophile a permis d'identifier un groupe de gènes appelés **gènes centraux** ou « core genes », essentiels au maintien de la polarité planaire. Les **gènes centraux** de la PCP sont au nombre de six, et nous pouvons compter : *Frizzled* (Krasnow and Adler, 1994) , *Dishevelled*, *Flamingo* (Chae et al., 1999, Usui et al., 1999), *Strabismus/Vang* (Wolff and Rubin, 1998) , *Diego* et *Prickle*. Chez ces mutants PCP, l'orientation des trichomes se traduit par un motif en « swirling ».

1.2.5.2 Le « swirling pattern » des mutants de la cassette *Frizzled/Flamingo*

Ces gènes centraux de la PCP semblent contrôler la polarité du poil en régulant la localisation sub-cellulaire du centre de polymérisation d'actine, et donc la position du trichome dans l'aile de drosophile. L'implantation des poils observée chez des drosophiles mutantes pour l'un de ces gènes, bien qu'atypique, n'est cependant pas une organisation anarchique. En effet, dans la région postérieure des ailes de drosophiles mutantes pour les gènes *Frizzled* (*fz*) (Krasnow and Adler, 1994), *Dishevelled* (*dsh*), *Strabismus/Vang* (Wolff and Rubin, 1998), *Flamingo/Starry night* (Chae et al., 1999, Usui et al., 1999), les poils semblent pointer préférentiellement vers le pôle postérieur de l'aile, alors qu'ils pointent vers le pôle distal chez les drosophiles sauvages. Cette implantation particulière se caractérise par la formation de tourbillons de poils et est définie sous le nom de « swirling pattern ». Tous les mutants présentant cette caractéristique ont une grande probabilité de porter une mutation d'un gène participant à la voie de polarité planaire *Frizzled* dépendante. Le « swirling pattern » est également connu sous le nom de « *fz*/in polarity pattern ». Cette implantation non aléatoire des poils chez les mutants PCP suggère qu'il existe un autre mécanisme, agissant en parallèle de la cassette *Frizzled/Flamingo*, capable de réguler la polarité planaire.

1.2.5.3 Origine des noms des gènes centraux de la PCP

Nous avons vu que les diverses mutations touchant les gènes centraux de la PCP (core PCP gene) se traduisent par une désorganisation en surface de l'orientation des poils. Ce phénotype étant le plus visible, les équipes de recherche ayant mis en évidence l'importance de ces gènes leur ont donné des noms évoquant cette désorganisation. Ainsi, le nom du gène *Dishevelled* peut se traduire par « ébouriffé », celui du récepteur *Frizzled* est à rapprocher de « frisé ». Certains scientifiques ont vu le coup de pinceau de Vincent Van Gogh dans les tourbillons de poils qui semblent se former chez les mutants PCP. Ainsi, le gène *Vangl2*, *Van Gogh like-2*, porte le nom du peintre (Taylor et al., 1998). Par analogie, le gène *Flamingo/Starry night* (Chae et al., 1999) porte également le nom de l'une des toiles du peintre : Nuit étoilée (Figure 9).

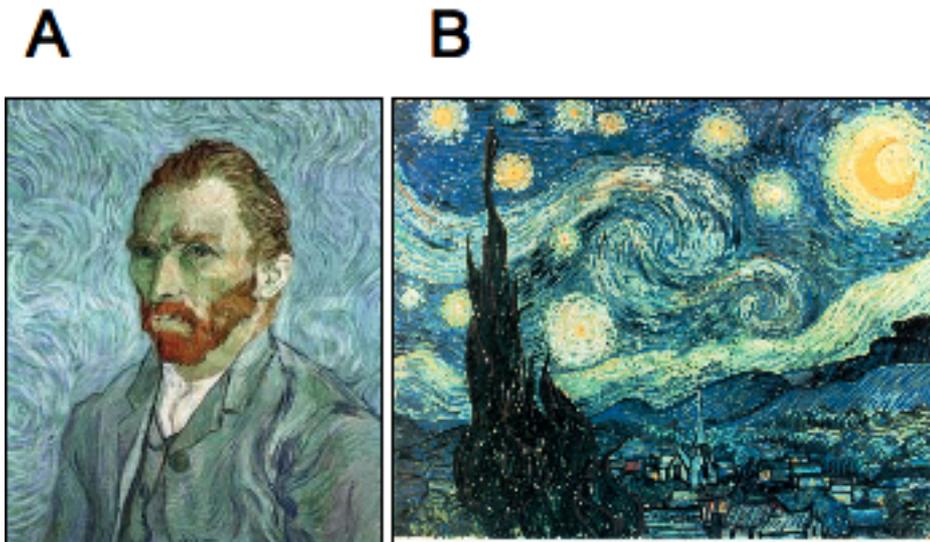


Figure 9 : Tableau de Vincent Van Gogh prêtant leurs noms aux gènes de la polarité planaire.

A : Autoportrait de Vincent Van Gogh (1889) © Musée d'Orsay, Paris ; B : Starry Night de Vincent Van Gogh (1889) © MOMA, New York

1.2.5.4 Les protéines centrales de la PCP

Les gènes centraux codent pour les protéines centrales de la PCP. Ces protéines sont aussi bien membranaires que cytosoliques (Table 1).

- Frizzled 1,2

Les gènes *Frizzled 1,2* codent une protéine à sept domaines transmembranaires, couplée aux protéines G, servant de récepteur aux glycoprotéines Wnt/Wng, participant ainsi directement à la signalisation des Wnts. La partie N-terminale extracellulaire des récepteurs Frizzled comporte une région riche en cystéine (CRD), ayant une forte affinité pour la région CRD des ligands Wnt/Wng, ainsi que pour les inhibiteurs de type sFRP (secreted Frizzled Related Protein). Quand les récepteurs Frizzled sont activés, ils recrutent la protéine cytosolique Dishevelled (Schulte and Bryja, 2007).

- Dishevelled :

La protéine Dishevelled est une protéine contenant trois domaines de liaisons aux protéines : un domaine PDZ central, ainsi qu'un domaine DIX et un domaine DEP. Dishevelled est connu pour activer deux voies : (1) la **voie canonique** β -caténine dépendante, via les domaines DIX et PDZ ; (2) les **voies non canoniques** de la polarité planaire et calcium dépendante, via les domaines PDZ et DEP.

(1) La voie canonique débute par la fixation du facteur soluble Wnt/Wng au récepteur membranaire Frizzled. Cet événement aboutit à une absence de recrutement de la β -caténine dans un complexe inhibiteur formé par les protéines Axine, APC (Adenomatous Polyposis Coli), et GSK3 β . Le recrutement de la protéine Dishevelled à la membrane par Frizzled inhibe alors la sérine /thréonine kinase GSK3 β qui ne peut plus phosphoryler la β -caténine. La β -caténine non phosphorylée est ainsi transloquée dans le noyau où elle active des gènes cibles par son association avec les facteurs de transcription LEF/ TCF.

(2) Les voies non canoniques sont indépendantes de l'activation de la β -caténine. En ce qui concerne la voie de la polarité planaire, Dishevelled activé, activerait à son tour deux voies indépendantes et parallèles : (1') la voie des Rho GTPases et (2') la voie Rac. En activant les Rho GTPases, Dishevelled permet l'activation des ROCKs (Rho-associated kinase) induisant

une réorganisation du cytosquelette. En activant les Rac GTPases, Dishevelled permet l'activation des protéines JNK (Jun N-terminal Kinase).

- Strabismus, également connu sous le nom de Vang

Strabismus/Vang code une protéine contenant quatre domaines transmembranaires, ainsi que quatre acides aminés à son extrémité C-terminale correspondant à un domaine de liaison aux protéines à domaines PDZ. Ce gène est conservé au cours de l'évolution et de nombreux homologues sont trouvés dans le règne animal, incluant les vers, les poissons, la grenouille, la souris et l'homme (Wolff and Rubin, 1998, Kibar et al., 2001, Darken et al., 2002, Goto and Keller, 2002).

- Flamingo (fmi),

Le gène *Flamingo* est également connu sous le nom de *starry night* : il code pour une protéine contenant plusieurs domaines. Les vingt-neuf premiers acides aminés de la protéine correspondent à un peptide signal. Cette protéine contient également sept domaines transmembranaires dans la partie C-terminale. La majeure partie de la protéine se situe dans l'espace extracellulaire. Elle contient neuf domaines de type cadherine, deux motifs de type Laminine G ainsi que quatre motifs de type EGF.

- Diego :

- Prickle :

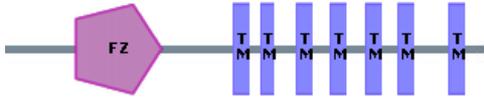
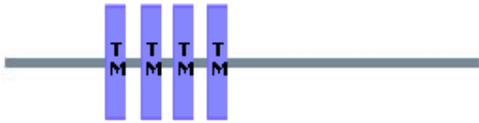
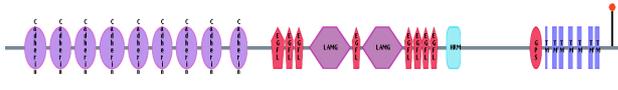
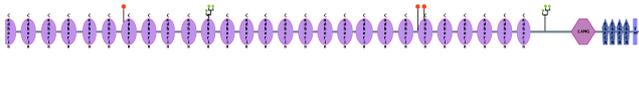
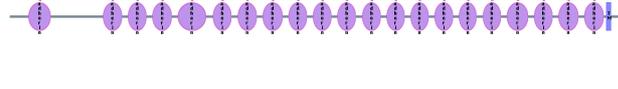
Gènes centraux	Protéines centrales de la PCP	Domaines protéiques
<i>Frizzled1, 2</i>		PDZ-BD CRD TM
<i>Dishevelled</i>		DIX PDZ DEP
<i>Strabismus</i> <i>Vang</i>		PDZ-BD TM
<i>Prickle</i>		LIM
<i>Flamingo</i> <i>Starry night</i>		Cadherine TM
<i>Diego.</i>		Ankyrine
<i>Fat</i>		Cadherine TM
<i>Daschsous</i>		Cadherine TM
<i>Four-jointed</i>		

Table 1 : Gènes et protéines des cassettes de signalisation *Frizzled/Flamingo* et *Fat/Daschsous*

TM : Transmembranaire

1.2.5.5 Gain et perte de fonction des gènes centraux entraînent un phénotype PCP

Il est facile de générer des individus mutants PCP chez la drosophile. Ainsi, il est possible de créer des individus invalidés pour l'expression d'un gène mais également, d'insérer un transgène au niveau de son génome et donc de le surexprimer. L'utilisation de ces deux stratégies dans l'étude des gènes impliqués dans la polarité planaire a donc permis de créer des mutants PCP « perte de fonction », où l'expression d'un gène PCP est invalidée (mutants *Fz*, *Dsh*, *Pk*, *Vang* et *Fmi*), ainsi que des mutants PCP transgéniques « gain de fonction », où un gène PCP est surexprimé. Cette surexpression peut être tissu spécifique et/ou activable par choc thermique (heat shock).

En 1994, Krasnow et Adler ont surexprimé le gène *Frizzled* sous la dépendance d'un promoteur thermo-activable (*heat shock Frizzled* : *hsfz*). Ils ont alors remarqué que le phénotype obtenu était variable selon que la surexpression de *Frizzled* soit précoce ou tardive dans le développement (Krasnow and Adler, 1994). En effet, un choc thermique donné 6 heures ou plus avant le début de la mise en place de l'orientation des poils de l'aile de drosophile se traduit par un défaut de polarité de ces poils, phénotype ressemblant très fortement à celui observé chez le mutant invalidé pour l'expression de ce même gène (Mutant *fz*). Dans la même logique, une surexpression du gène *Frizzled* dans les cellules R3 et R4 des facettes oculaires de l'œil de drosophile se traduit par une perte de polarisation des ommatidies et une perte de leur arrangement en miroir de part et d'autre de l'équateur. Le gène *Diego* a également été mis en évidence lors d'un crible de gène en surexpression (Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S 2001).

Le gain ou la perte de fonction d'un gène PCP du moins pour les gènes *Frizzled* et *Strabismus/Vang* se traduit par une dérégulation de la voie PCP. Le dosage des protéines codées par ces gènes semble donc être primordial.

1.2.5.6 Effet autonome et non autonome

Certains gènes de la PCP sont connus pour leur dualité dans la régulation de la polarité planaire. Cette dualité a été mise en évidence par génération de drosophiles mutantes

mosaïques. Ainsi, chez un même individu, il est possible de générer des groupes de cellules (ou clones) invalidées pour l'expression d'un gène PCP ou surexprimant un gène PCP. Ces groupes de cellules mutantes sont alors en contact dans leur environnement avec des cellules non mutées. L'analyse de ces mutants mosaïques a ainsi permis de mettre en évidence deux catégories pour les gènes de la cassette *Frizzled/Flamingo* :

- les gènes agissant de manière autonome (voir pour revue : Strutt and Strutt 2007). Ces gènes mutés ou surexprimés n'affectent que la PCP des cellules mutantes du clone chez un individu mosaïque. Les gènes agissant de manière autonome sont les suivants :

- *Dishevelled*
- *Prickle*
- *Flamingo*
- *Diego*

- les gènes agissant de manière autonome et non-autonome (Strutt and Strutt, 2007). Ces gènes mutés affectent à la fois la polarité planaire des cellules des clones mutés, mais aussi celle des cellules non mutées entourant le clone. Les gènes agissant de manière non autonome sont les suivants :

- *Frizzled*
- *Strabismus/Vang*

Seuls les effets autonomes et non autonomes des gènes *Frizzled* et *Strabismus/Vang* seront discutés ci-dessous de façon plus approfondie, afin d'illustrer mes propos.

1.2.5.6.1 Effet cellule-autonome

L'effet cellule autonome est commun à tous les gènes PCP. À titre d'exemple, dans l'aile de la drosophile, l'invalidation de l'expression du gène *Frizzled* a pour conséquence un défaut de polarité des cellules épithéliales. De même, dans l'œil de la drosophile, cette même

invalidation conduit à une mauvaise orientation des ommatidies. Ces anomalies dans l'orientation de ces structures sont directement liées à l'absence intrinsèque de *Frizzled* dans une cellule donnée. On parle alors d'effet autonome. L'effet cellule autonome de *Frizzled* est connu pour être dépendant de *Dishevelled*, comme démontré par Krasnow et Adler en 1995, par l'utilisation d'une drosophile transgénique (*dsh*^{-/-} ; *hsfz*) sur-exprimant le gène *Frizzled* sous le contrôle d'un promoteur thermosensible (*hsfz*, heat shock *Frizzled*,) et mutante homozygote pour *Dishevelled* (*dsh*^{-/-}). En effet, Krasnow et Adler ont montré qu'une expression tardive de *Frizzled* (*hsfz*-late) conduisait à un phénotype plus dramatique que le phénotype observé chez les mutants *Frizzled*, *Dishevelled* ou *Prickle*, c'est-à-dire une fréquence de défaut de polarité des trichomes plus importante. L'effet de la surexpression tardive de *Frizzled* est complètement aboli chez la drosophile (*dsh*; *hsfz*), prouvant donc que l'effet cellule autonome de *Frizzled* est *Dishevelled* dépendant (Krasnow and Adler, 1994, Krasnow et al., 1995).

1.2.5.6.2 Effet cellule non autonome

L'effet non autonome ne concerne qu'un nombre réduit de gènes PCP. Cet effet n'est appréhendable que chez des drosophiles « mosaïques ». En effet, chez des drosophiles mosaïques, des clones de cellules *fz*^{-/-} ou *Vang*^{-/-}, portant respectivement des mutations dans le gène *Frizzled* ou *Strabismus/Vang*, entraînent une altération de la PCP chez les cellules sauvages les entourant (Taylor et al., 1998). Cet effet à distance est appelé **effet non autonome**. L'étude de ces individus a notamment permis de mettre en évidence que *Strabismus/Vang* et *Frizzled* avaient un rôle important dans la communication intercellulaire de la polarité planaire de l'aile de drosophile mais aussi au niveau de l'abdomen et de l'œil.

L'effet non autonome semble, de plus, directionnel. En effet, si l'on regarde attentivement les trichomes des cellules WT placées distalement par rapport aux cellules *Frizzled* mutées, nous pouvons remarquer qu'ils ont tendance à pointer vers le clone. Inversement, les poils des cellules WT placées en proximal par rapport aux clones *Strabismus/Vang* mutés, ont tendance à pointer à l'opposé du clone. Le « pattern » des mutants *Frizzled* et *Strabismus/Vang*, ainsi que la complémentarité de leur effet non autonome respectif, suggèrent que ces deux gènes exercent l'un sur l'autre un **effet**

antagoniste dans la régulation de la voie de la polarité planaire. Ainsi, chez un mutant *Frizzled*, l'effet non autonome de *Strabismus/Vang* est perdu. De même, chez un mutant *Strabismus/Vang*, l'effet non autonome de *Frizzled* est perdu (Taylor et al., 1998, Adler and Lee, 2001). Enfin, l'effet non autonome de *Frizzled* et de *Strabismus/Vang* est dépendant du gène *Flamingo*, puisque cet effet est perdu chez un mutant *Flamingo* (Chae et al., 1999).

En conclusion de ces effets autonomes et non autonomes, il a été suggéré que *Dishevelled*, *Prickle* et *Diego* étaient impliqués dans la réception d'un signal afin d'établir la polarité planaire au sein d'une cellule, mais ne participaient pas à l'émission d'un signal vers des cellules voisines. *Frizzled*, *Strabismus/Vang* et *Flamingo* participeraient alors dans la communication entre cellules et la propagation du signal PCP à l'échelle du tissu.

1.2.6 Asymétrie des protéines centrales de la PCP ou « Core PCP Protein »

Un des critères important pour caractériser un gène PCP est la distribution asymétrique proximo-distale de la protéine pour laquelle il code.

1.2.6.1 Une asymétrie proximo-distale

Les protéines centrales de la PCP semblent ségréger au niveau des jonctions serrées et leur asymétrie est transitoire et antérieure à l'établissement de l'orientation des structures dans le plan de l'épithélium (Figure 10). Chez la drosophile, dans les cellules épithéliales de l'aile, tout comme à la jonction des cellules R3/R4 dans l'œil, cette asymétrie peut-être soit distale, soit proximale selon les protéines PCP concernées. Les protéines PCP appartiennent ainsi à deux classes :

- Protéines distribuées du côté proximal de la cellule épithéliale : *Strabismus/Vang* et *Prickle* (Bastock et al., 2003).

- Protéines distribuées du côté distal de la cellule épithéliale : Frizzled, Dishevelled et Diego (Axelrod, 2001). Ces protéines se localisent à l'endroit où nous retrouvons la polymérisation d'actine et donc à l'endroit où un poil va émerger.

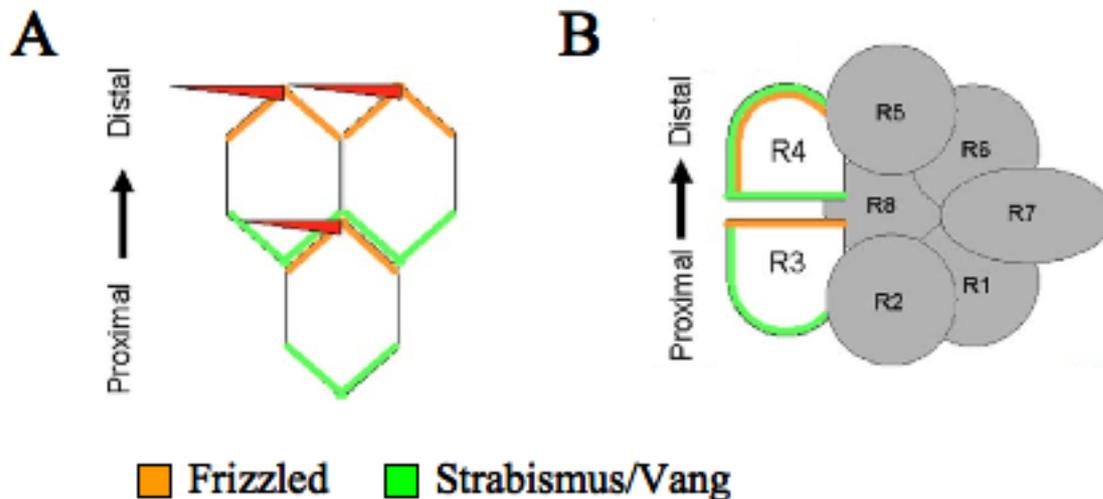


Figure 10 : Localisations subcellulaires asymétriques des protéines centrales de la PCP selon l'axe proximo-distal.

A : aile de drosophile ; B : œil de drosophile ; R : photorécepteurs ; tiré de (Montcouquiol et al., 2006).

La protéine Flamingo n'est toutefois pas localisée de façon asymétrique, puisque nous pouvons la retrouver du côté proximal ainsi que du côté distal de la cellule épithéliale (Usui et al., 1999).

En raison du caractère transitoire et discret de cette asymétrie, associé au fait que peu d'anticorps corrects aient été développés, la mise en évidence de l'asymétrie des protéines PCP s'est faite par l'utilisation de gène rapporteur. Ainsi, en 2001, Strutt a montré, par l'utilisation d'une construction portant une étiquette GFP, que le récepteur Frizzled était asymétriquement localisé au niveau apical et au niveau du pôle distal des cellules épithéliales de l'aile de drosophile (Strutt, 2001). De même, Bastock a montré en 2003, cette fois par l'utilisation de mutant d'une construction portant une étiquette YFP, que Strabismus/Vang était asymétriquement localisé au niveau du pôle proximal de ces cellules épithéliales

(Bastock et al., 2003). Ces asymétries sont présentes avant et pendant la formation du trichome.

1.2.6.2 Comment l'asymétrie est-elle établie ?

La littérature regorge d'études prouvant l'interaction physique entre plusieurs membres des protéines centrales de la polarité planaire. Celles-ci peuvent donc former des complexes permettant peut-être d'établir cette asymétrie (Figure 11). Nous pouvons ainsi trouver les interactions suivantes :

- Flamingo peut interagir avec Frizzled et Strabismus/Vang et dans un individu mutant pour le gène *Flamingo*, Frizzled et Strabismus/Vang ne sont plus recrutés au niveau des membranes (Chen et al., 2008, Wu et al., 2008).
- Strabismus/Vang se lie à Prickle ainsi qu'à Dishevelled (Park and Moon, 2002, Bastock et al., 2003).
- Frizzled interagit également avec Dishevelled (Wong et al., 2003) permettant son recrutement au niveau des membranes (Axelrod et al., 1998).
- Diego et Prickle peuvent également interagir avec Dishevelled (Tree et al., 2002, Jenny et al., 2003).

Toutes ces interactions suggèrent que les protéines centrales de la PCP forment un complexe et s'autorégulent. D'autant plus que la perte d'un gène central de la PCP entraîne la perte de l'asymétrie de toutes les autres protéines centrales de la PCP. À l'heure actuelle, nous ne savons toujours pas comment l'asymétrie est établie moléculairement. Lawrence a cependant formulé une hypothèse selon laquelle une **boucle de rétrocontrôle** permettrait d'établir cette asymétrie. Le récepteur Frizzled inhiberait l'activité de Flamingo au sein d'une cellule, et un signal serait transmis à la cellule voisine grâce à une communication Flamingo/Flamingo. Ce signal permettrait d'activer dans la cellule voisine la protéine Vang, qui à son tour inhiberait le récepteur Frizzled (Lawrence et al., 2004).

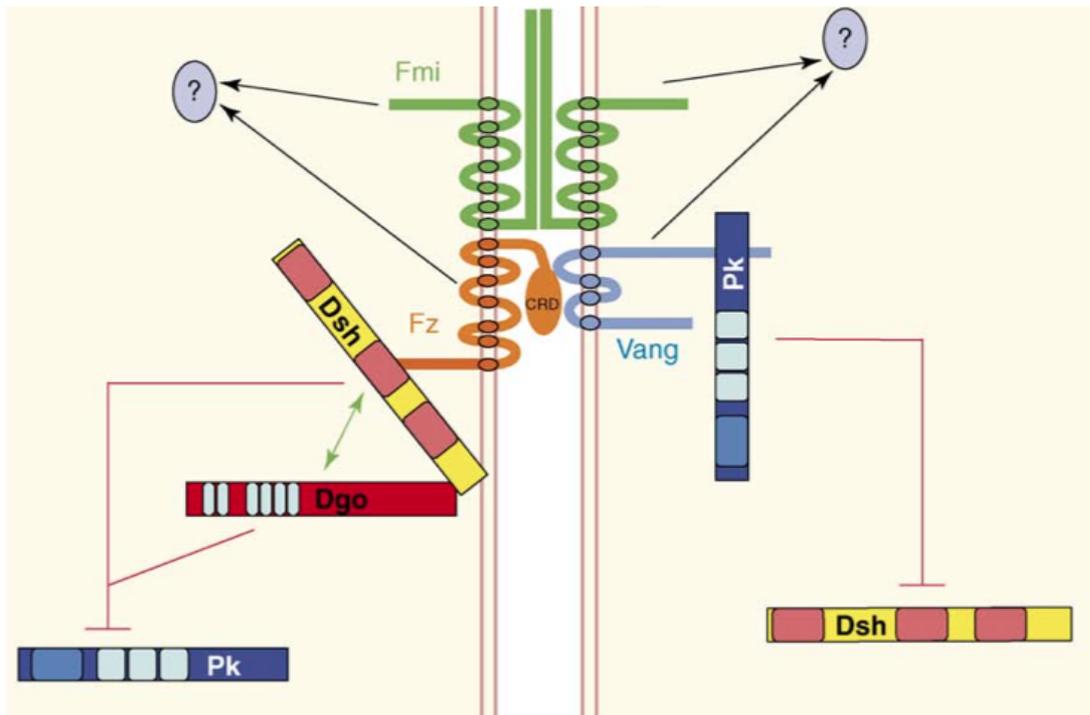


Figure 11 : Complexes des protéines centrales de la PCP à la jonction entre deux cellules

Fz : frizzled ; Dsh : Dishevelled ; Dgo : Diego ; Pk : Prickle ; Vang : Strabismus/Vang ; Fmi : Flamingo ; tiré de(Wu and Mlodzik, 2009).

1.2.6.3 Perte d'asymétrie chez les mutants PCP

L'asymétrie proximo-distale semble être un pré requis à l'établissement de la polarité planaire. Le premier indice réside dans le fait que tous les mutants pour un gène central de la PCP présentent une perte d'asymétrie de la protéine pour laquelle ce gène muté code. Les protéines centrales non concernées par la mutation sont également affectées par une perte d'asymétrie. Les protéines centrales de la PCP sont donc interdépendantes. Le deuxième indice selon lequel l'asymétrie des protéines centrales est nécessaire réside dans les expériences de Gubb et Strutt. Il est ainsi possible d'affecter l'asymétrie d'une protéine de la polarité planaire en surexprimant le gène codant pour cette protéine (Gubb et al., 1999). En 2001, Strutt a montré que la surexpression par l'utilisation d'une construction Frizzled-GFP entraîne une perte d'asymétrie et une perte de polarisation du trichome (Strutt, 2001). Par ailleurs, cette protéine fusion est également capable de rétablir la polarisation des trichomes

chez une drosophile *Frizzled* mutée par rétablissement de l'asymétrie proximo-distale de *Frizzled* (Strutt, 2001).

1.2.6.4 L'asymétrie proximo-distale, un gradient d'activité ?

L'un des modèle proposé par l'équipe d'Adler est la présence d'un gradient d'activité du récepteur *Frizzled* (Krasnow and Adler, 1994, Wong et al., 2003). Ce gradient d'activité serait plus important que l'asymétrie de la protéine elle-même. En effet, il est possible qu'une protéine ne soit pas localisée asymétriquement, mais que son activité soit asymétrique. La présence d'un gradient d'activité peut être apprécié dans les expérimentations faisant encore une fois appel à des drosophiles mutantes mosaïques (Wu and Mlodzik, 2009). En effet, dans l'aile de drosophile, comme l'illustre la Figure 12, un clone de cellules *Frizzled* mutées (*Fz*^{-/-}) entraîne l'inversion de l'orientation des poils des cellules WT placées distalement aux clones. À l'opposé, un clone de cellule surexpimant *Frizzled* (*Fz*⁺⁺) entraîne l'inversion de la polarisation des poils des cellules placées de façon proximale au clone. Les poils de l'aile de drosophile semblent donc s'orienter des cellules présentant une forte activité *Frizzled*, vers les cellules présentant une faible activité *Frizzled*, confortant ainsi la notion de gradient d'activité.

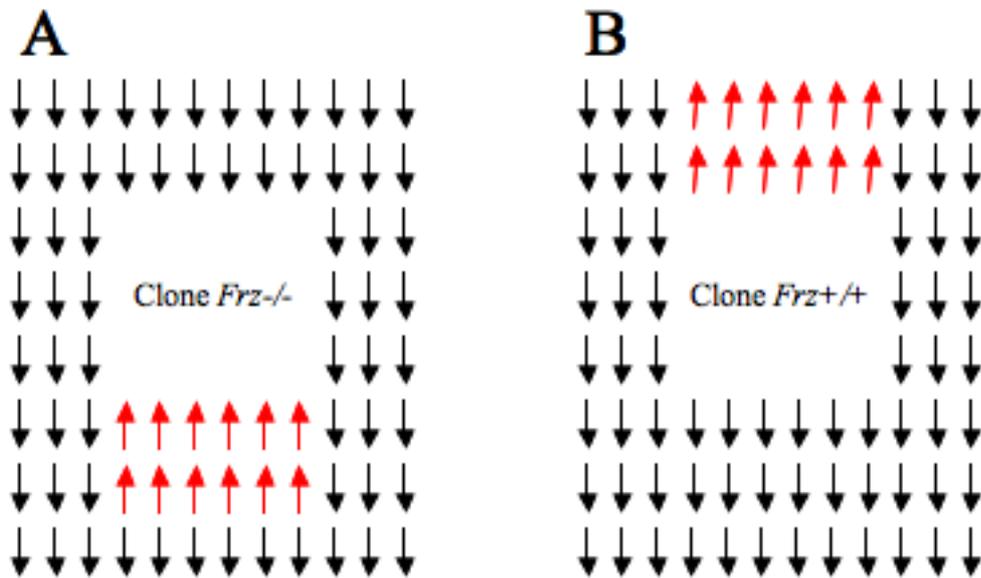


Figure 12 : Polarité Planaire cellulaire dans l'aile de drosophiles mosaïques pour le gène *Frizzled*.

Les flèches noires symbolisent l'orientation des trichomes dans l'aile de drosophile. Les trichomes pointent vers le pôle distal de l'aile chez la drosophile. A : Clone *Frz*^{-/-} : Cellules mutantes pour le gène *Frizzled*. B : Clone *Frz*^{+/+} : Cellules mutantes surexprimant le gène *Frizzled*. Les flèches rouges symbolisent la réorientation des poils engendrée par les clones *Frz*^{-/-} ou *Frz*^{+/+}.

1.2.7 Un point sur la signalisation PCP

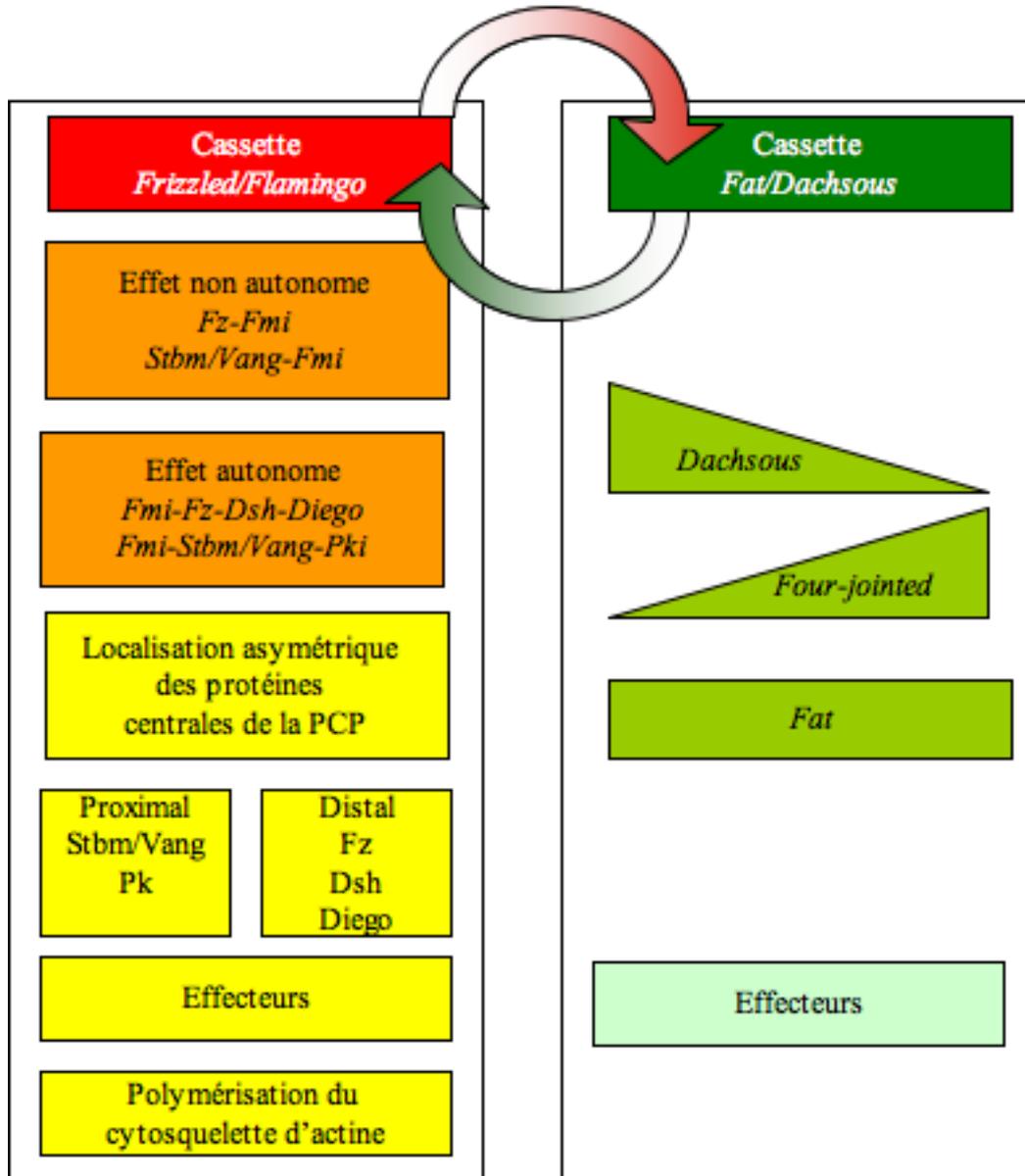


Figure 13 : Résumé de la signalisation PCP chez la drosophile

Rouge/jaune : cassette de signalisation *Frizzled/Flamingo* ; Vert : cassette de signalisation *Fat/Dachsous* ; Les triangles représentent la distribution en gradient des protéines. Les deux cassettes de signalisation constituent deux voies parallèles.

1.3 Polarité planaire cellulaire chez les mammifères

Chez les mammifères, l'identification de gènes homologues à ceux de la Drosophile et leur mutation a également permis d'identifier des fonctions/mécanismes, dont la perturbation peut conduire pour certains à des pathologies. Les mécanismes affectés sont les suivants :

- la polarisation des cellules épithéliales, l'orientation des poils (peau), touffes de stéréocils d'actine dans la cochlée (p50).
- l'extension convergente (p70)
- un défaut de fermeture du tube neural ou « Neural Tube Defects » (NTDs) qui sous sa forme la plus sévère, se traduit par un craniorachichisis. Cette anomalie est décrite en page 71.
- les pathologies liées aux cils comme les syndromes de Bardet Biedl et des syndromes rénaux (Polycystic Kidney Disease) (Ross et al., 2005) (p73)
- la division asymétrique par contrôle de l'orientation des fuseaux mitotiques
- des malformations cardiaques (Phillips et al., 2007, Phillips et al., 2008) (p75)
- la migration neuronale et le guidage axonal

Malgré leur diversité, il est important de souligner que, tout comme chez la Drosophile, un remodelage et une polarisation du cytosquelette, contrôlé par les gènes de la PCP, semblent être un critère commun à ces mécanismes.

1.3.1 Modèles d'étude de la polarité planaire chez les mammifères

Bien qu'il existe, ces dernières années, une explosion d'études portant sur des tissus perturbés par la mutation des gènes de la PCP, deux modèles sont classiquement utilisés afin de valider et d'étudier ces gènes ainsi que leurs fonctions chez les mammifères.

Ces modèles sont les suivants :

- l'oreille interne
- le follicule pileux

Ces organes présentent des cellules sensorielles portant des touffes ciliaires dont l'orientation est contrôlée par la polarité planaire. En 2003, les deux premiers gènes impliqués dans la polarité planaire cellulaire chez les mammifères, *Van Gogh like-2 (Vangl2)*, un orthologue du gène *Strabismus/Vang* ainsi que *Scribble1* ont été identifiés sur la base du phénotype observé dans l'oreille interne des mutants (Montcouquiol et al., 2003). L'analyse de la localisation de Vangl2 dans l'organe sensoriel de l'audition a également révélé une localisation asymétrique de la protéine selon l'axe de la polarité planaire, à la jonction entre une cellule ciliée et une cellule de soutien (Montcouquiol et al., 2006). La cochlée permet donc d'identifier un gène PCP et d'analyser l'impact de la perturbation de ce gène ou de sa protéine. Certains mutants PCP présentent également des anomalies au niveau de leurs follicules pileux et donc au niveau de l'orientation de leur pelage (Guo et al., 2004, Wang et al., 2006b).

Afin de bien comprendre les mécanismes de la PCP dans ces organes, je vais donc décrire de façon brève, leur structure ainsi que leur développement.

1.3.1.1 Follicules pileux

Il a été suggéré que la voie PCP, tout comme elle contrôlerait l'orientation des poils de l'aile de drosophile, pourrait contrôler l'orientation des poils situés sur l'épiderme des mammifères. En effet, cette orientation est perturbée notamment chez le mutant *Frizzled 6* (Figure 14) (Guo et al., 2004). Ce phénotype n'est cependant pas observé chez tous les mutants PCP car, le plus souvent, ces mutants sont létaux au stade embryonnaire, et donc avant l'apparition du pelage.

1.3.1.1.1 Le follicule pileux : une asymétrie morphologique

La morphogenèse du follicule pileux est initiée au stade E14,5 chez la souris, et elle débute par le bourgeonnement de l'épithélium en réponse à des signaux provenant du derme

sous-jacent, provoquant ainsi son invagination (Devenport and Fuchs, 2008). Les premiers Follicules pileux apparaissent au stade E16,5, et sont présents sous 3 formes plus ou moins matures. On peut citer de la forme la plus immature, à la forme la plus mature, la présence de : (1) placodes, (2) germes, (3) germes tardifs. Au fur et à mesure, l'épithélium s'invagine dans le derme et le bourgeon ainsi créé, et acquiert une asymétrie structurale le long de l'axe antéro-postérieur (A-P). En effet, les cellules présentes au niveau de l'apex du germe en développement adoptent des morphologies différentes, lui conférant ainsi cet aspect asymétrique. Cette asymétrie morphologique est contrôlée par les gènes de la PCP.

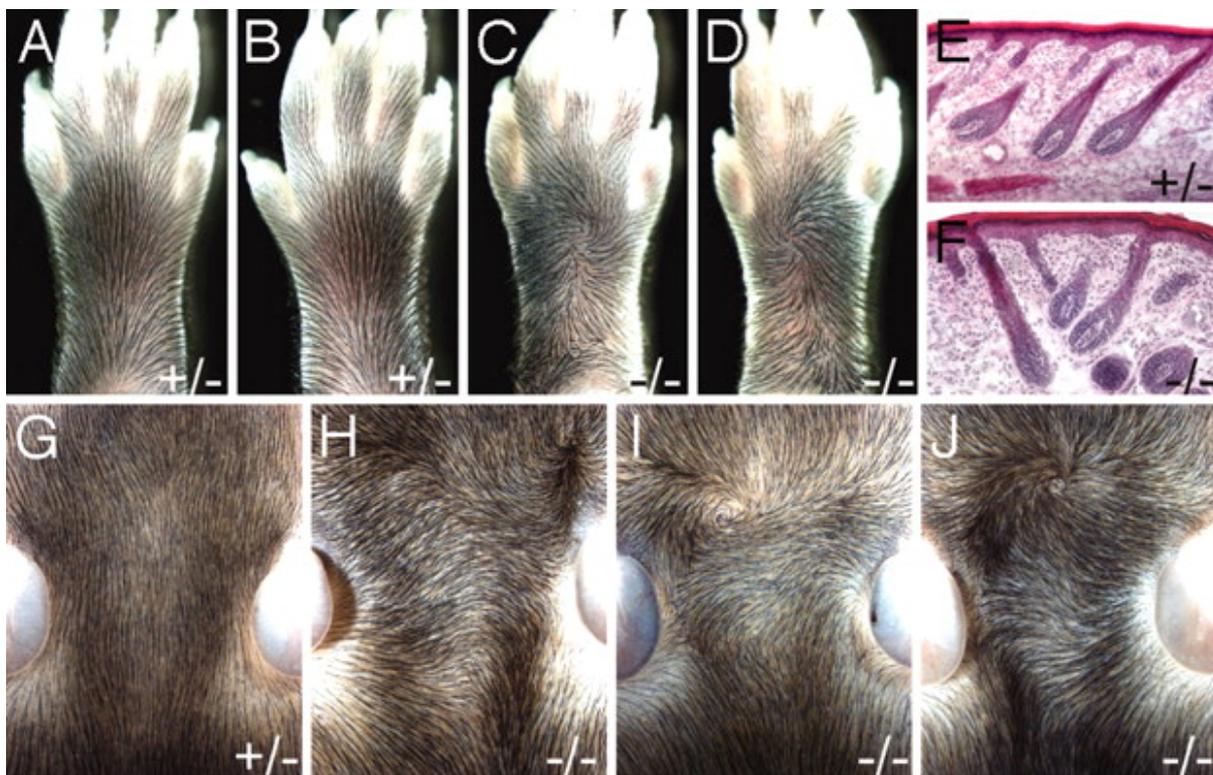


Figure 14 : Pelage d'une souris mutante pour le gène *Frizzled 6*.

A–D : Pattes de souris WT et de souris *Fz6*^{-/-} au stade P11 ; E, F : marquage à l'hématoxyline/eosine de sections de peau au stade P3 ; G–J : poils situés sur la tête de souris Wt ou *Frz6*^{-/-} au stade P9.

1.3.1.2 L'oreille

L'oreille peut être définie comme étant l'organe de l'audition et de l'équilibre. Chez les mammifères, l'oreille est organisée autour de trois composantes : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (Figure 15).

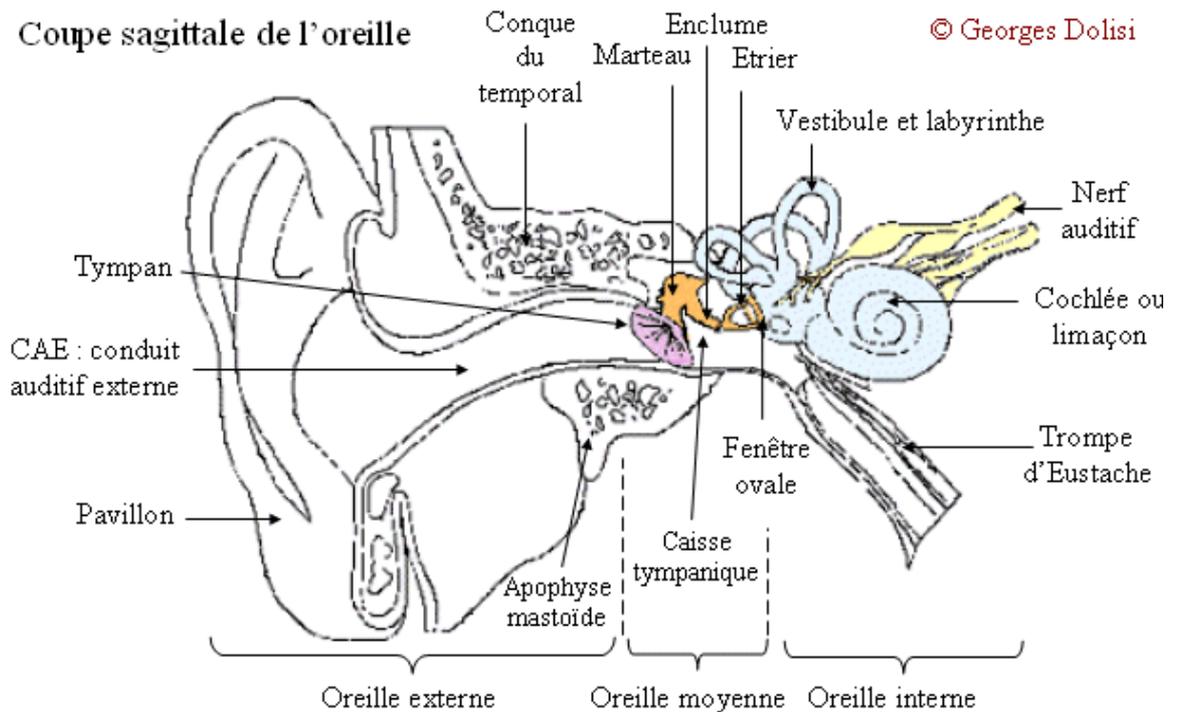


Figure 15 : Organisation de l'oreille externe, moyenne et interne chez l'homme.

Tiré de <http://www.medicopedia.net/term/21543,1,xhtml>

1.3.1.2.1 L'oreille externe

L'oreille externe joue le rôle d'un cornet acoustique grâce à sa forme en entonnoir. Elle est composée par :

- Le pavillon, qui est une structure cartilagineuse élastique permettant de diffracter les ondes sonores et qui débouche sur

- Un conduit auditif, possédant un squelette cartilagineux enchâssé dans une cavité creusée dans l'os temporal. Cette partie temporale est revêtue d'un épithélium composé de nombreuses glandes sébacées, ainsi que des glandes sudoripares apocrines cérumineuses fabriquant le cérumen, un liquide protéique et glucolipidique visqueux.

L'oreille externe permet ainsi de capter les ondes sonores et d'assurer leur transfert vers l'oreille moyenne.

1.3.1.2.2 L'oreille moyenne

L'oreille moyenne est située au niveau d'une cavité remplie d'air creusée dans l'os temporal. Elle assure le transfert du son de l'oreille externe vers l'oreille interne. Elle est constituée par :

- La membrane tympanique, structure semi-rigide formée de tissu conjonctif fibreux.
- La chaîne ossiculaire constituée de trois petites structures osseuses appelées également osselets. Ces trois osselets, articulés entre eux, sont appelés : marteau, enclume et étrier. Ils assurent une liaison entre la membrane tympanique et la fenêtre ovale de l'oreille interne.

Les vibrations de l'air dans le conduit auditif, engendrées par l'émission d'un son, ont pour conséquences de faire entrer en vibration la membrane tympanique. Ces vibrations sont ensuite transmises par la chaîne ossiculaire, jusqu'à l'oreille interne.

1.3.1.2.3 L'oreille interne

L'oreille interne possède une forme complexe (Figure 15), et elle est composée d'une cavité rigide appelée le labyrinthe osseux. Le labyrinthe membraneux flotte dans cette cavité. Il s'agit d'un organe creux contenant deux liquides :

- La périlymphe
- L'endolymphe

L'endolymphe est contenue dans une cavité interne du labyrinthe membraneux, appelé canal cochléaire. La cochlée est délimitée et isolée de l'oreille moyenne par deux membranes que sont : (1) la fenêtre ovale et (2) la fenêtre ronde. La périlymphe sépare cet organe du

labyrinthe osseux. Le canal cochléaire, situé entre la rampe vestibulaire et la rampe tympanique, renferme de l'endolymphe. L'organe de Corti baignant dans l'endolymphe est porté par une lame épaisse, la membrane basilaire, qui sépare le canal cochléaire de la rampe tympanique (Figure 16).

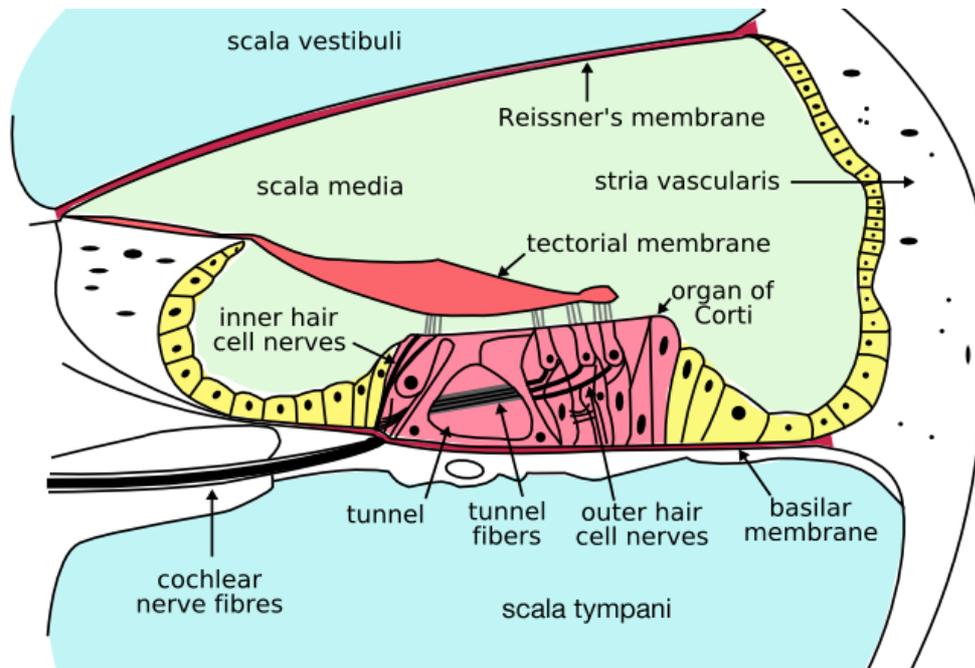


Figure 16 : Coupe transversale d'une cochlée.

Tiré de http://fr.wikipedia.org/wiki/Organe_de_Corti

1.3.1.2.3.1 L'organe de Corti

L'organe sensoriel de la cochlée de mammifère est l'épithélium cochléaire ou organe de Corti. L'organe de Corti court tout le long du limaçon. Chez l'homme, la cochlée s'enroule sur deux tours et demi, chez le cochon d'inde sur trois tours, alors que chez la souris sur un tour trois quarts.

Il est composé de trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) (Outer Hair Cells, OHCs), situées dans la partie externe, ou distale de la cochlée ainsi que d'une rangée de cellules ciliées internes (CCI) (Inner Hair Cells, IHCs), située dans la partie interne, ou proximale

(Figure 17). L'ensemble de ces cellules est soutenu par des cellules non-sensorielles de soutien.

L'organe de Corti peut être considéré comme l'un des meilleurs modèles d'étude de la polarité planaire cellulaire chez les mammifères. En effet, dans cet organe, les cellules neuro-épithéliales ciliées, ainsi que les cellules de soutien qui les entourent présentent une polarité apico-basale mais également une polarité planaire cellulaire. Les différents types cellulaires constituant l'organe de Corti, associés aux différents gradients de différenciation qui leur sont associés, rend l'étude de ce modèle complexe.

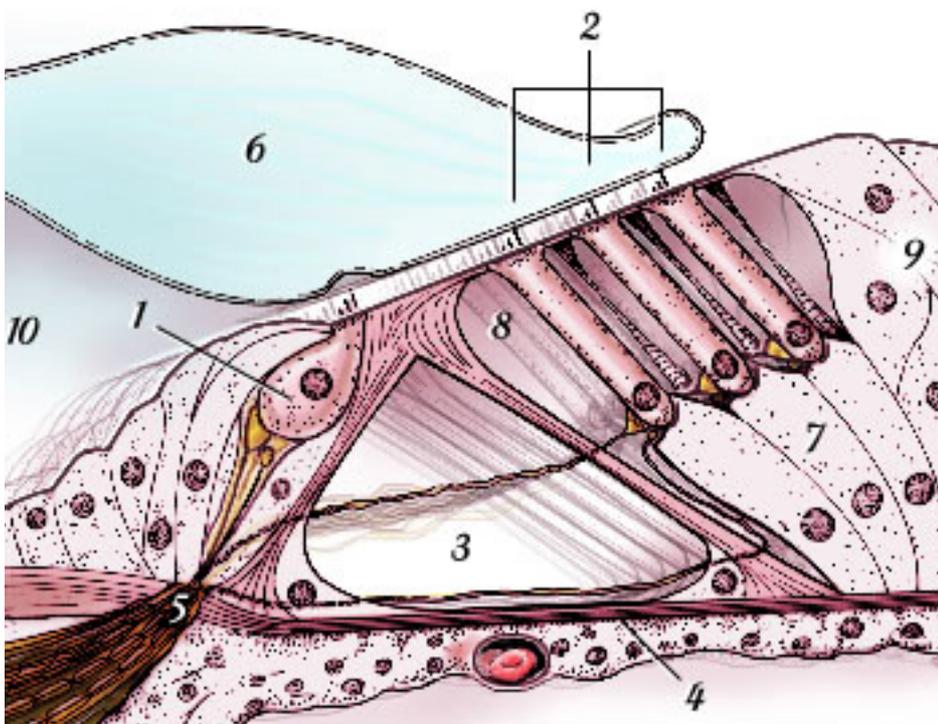


Figure 17 : Coupe transversale de l'organe de Corti.

1-Cellule ciliée interne (CCI) ; 2-Cellules ciliées externes (CCEs) ; 3-Tunnel de Corti ; 4-Membrane basilaire ; 5-Habenula perforata ; 6-Membrane tectoriale ; 7-Cellules de Deiters ; 8-Espaces de Nuel ; 9-Cellules de Hensen ; 10-Sillon spiral interne ; Tiré de <http://www.cochlee.org/>

1.3.1.2.3.1.1 Cellules ciliées

Les cellules ciliées sont des cellules mécano-sensorielles de l'organe de Corti. Elles possèdent à la fois les caractéristiques de cellules épithéliales, avec une polarisation selon l'axe apico-basal, ainsi que les propriétés de cellules neuronales, puisqu'elles sont chargées de convertir le mouvement de la **membrane tectoriale**, engendré par un son, en signaux interprétables par le cerveau (Figure 17).

Les cellules ciliées externes possèdent une forme cylindrique, alors que les cellules internes possèdent une forme de poire. Les cellules ciliées présentent à leur apex, des stéréocils d'actine formant des touffes ciliaires, dont l'orientation est parfaitement alignée dans le plan de l'épithélium. L'orientation uniforme de ces touffes ciliaires, selon l'axe proximo-distal, est régulée par les gènes de la PCP.

Les touffes ciliaires sont les structures, qui, par leur déflexion, permettent de traduire le signal mécanique, c'est-à-dire le mouvement de la membrane tectoriale engendré par un son, en signal électrique. Elles sont composées de trois rangées de stéréocils, de hauteur différentes, maintenues entre eux par des ponts protéiques ou **tip-link**. Cette structure est organisée en escalier, et possède la forme d'un « V », et elle possède au niveau de son vertex, un cil primaire ou **kinocil**. Le kinocil est une structure transitoire qui disparaît au stade P6-P20. Le kinocil, formé à partir de polymérisation de tubuline et soutenu par un **corps basal**, est également une structure qui se polarise selon l'axe proximo-distal. Les stéréocils d'actine sont enchâssés dans une plaque riche en actine située à l'apex de la cellule ciliée et appelé plaque cuticulaire.

Les cellules ciliées sont des **cellules neuro-épithéliales**. En effet, les cellules ciliées possèdent des innervations afférentes et efférentes. Les cellules ciliées internes se dépolarisent à la suite de la déflexion des touffes ciliaires, qu'elles portent à leur apex et engendré par le mouvement de la membrane tectoriale, et émettent un signal au cerveau par l'intermédiaire de **fibres nerveuses afférentes**. Le système nerveux central exerce à son tour un rétrocontrôle sur les cellules ciliées externes par l'intermédiaire de **fibres nerveuses efférentes**. Les cellules ciliées externes ont par leur propriété de contraction, un rôle d'amplification du son capté. Les synapses des cellules ciliées sont particulières puisqu'elles possèdent dans leurs éléments présynaptiques des synapses de type « ribbon ».

1.3.1.2.3.1.2 Cellules de soutien

Le rôle majeur des cellules de soutien est de séparer les cellules ciliées les unes des autres, de les soutenir physiquement et ainsi de donner une structure à l'organe de Corti. Il

Il existe six différents types de cellules interdigitales de soutien. Les différents types de cellules de soutien, distribués selon l'axe proximo-distal, sont les suivants (Figure 17) :

- Les cellules phalangéales internes (Inner phalangeal)

Les cellules phalangéales permettent de séparer et soutenir les cellules ciliées internes

- Les cellules piliers internes (Inner Pillar Cells, IPC)
- Les cellules piliers externes (Outer Pillar Cells, OPC)

Les cellules piliers permettent de former le tunnel de Corti.

- Les cellules de Deiters (Deiters Cells, DC)

Les cellules de Deiters permettent de soutenir les cellules ciliées externes.

- Les cellules de Hensen

Ces cellules délimitent la partie latérale de l'organe de Corti.

Outre leur rôle de soutien, les cellules de soutien participent à la régénération de l'épithélium sensoriel chez le poulet (Marc Warchol, 2006).

1.3.1.2.3.1.3 Cellule ciliée et cellule de soutien, une relation étroite

1.3.1.2.3.1.3.1 La Différenciation des cellules ciliées et de soutien est interdépendante

Les cellules ciliées et les cellules de soutien proviennent du même 'pool' de précurseurs cellulaires, c'est-à-dire les 'patches' sensoriels. La différenciation de ces précurseurs se fait post-mitotiquement. Il existe, en effet, un gradient d'arrêt mitotique, ou de sortie de cycle cellulaire, partant de l'apex et allant jusqu'à la base de l'organe de Corti. Les cellules ciliées de l'organe de Corti se différencient à partir du stade E13,5 chez la souris (Chen and Segil, 1999) (Montcouquiol and Kelley, 2003). Cette différenciation se fait selon deux gradients :

- Un gradient de différenciation commençant à la base de la cochlée et allant vers son apex : Les premières cellules ciliées se différencient donc d'abord à la base. Les cellules de l'apex ne se différencient que 2-3 jours après.
- Un gradient de différenciation proximo-distal (également appelé médio-latéral) : Les cellules ciliées internes commencent d'abord à se différencier, suivies des

cellules ciliées externes de la première rangée, puis de la seconde et enfin de la troisième.

L'inhibition latérale régulée par la voie Delta/Notch, permet de déterminer la mosaïque finale de l'organe de Corti. L'inhibition latérale crée un biais et un déséquilibre d'expression génique parmi les précurseurs des patchs sensoriels, créant ainsi :

- Des cellules exprimant fortement ATOH1/MATH1 et JAG2/DLL1, qui auront une voie Notch inhibée et qui vont se différencier en cellules ciliées.
- Des cellules exprimant fortement HES1/5 et faiblement ATOH1, qui ont une voie Notch très active, et qui vont se différencier en cellule de soutien.

Brièvement, avant le début de la différenciation, tous les précurseurs des patchs sensoriels expriment au niveau des membranes plasmiques, le récepteur Notch ainsi que ses ligands Delta (DLL1) et Jag2 (Adam et al., 1998; Lanford et al., 1999; Morrison et al., 1999). Les cellules des patchs étant en contacts les unes avec les autres, des liaisons Delta/Jag2/Notch s'établissent. DLL1 et JAG2 agissent de façon synergique afin de réguler le développement des cellules ciliées dans l'oreille interne de mammifère (Kiernan et al, 2005). La liaison de Delta et de Jag2 à Notch permet l'activation de Notch, qui est alors clivée au niveau de sa partie intracellulaire, créant ainsi la protéine cytosolique NICD (Notch Intra-Cellular Domain). NICD est alors transloquée au niveau du noyau grâce à la présence de deux domaines de type NLS (Nuclear Localization Site). NICD s'associe alors au niveau du noyau à des complexes de transcription permettant alors la transcription d'HES1 et HES5. À leur tour, HES1 et HES5 sont capables d'inhiber ATOH1/MATH1.

Plusieurs publications ont révélées que la voie de l'inhibition latérale était nécessaire à l'établissement de cette mosaïque cochléaire. Ainsi, une souris mutante présentant une mutation nulle pour Jag2 (Jag2^{tm1Grid}) possède une cochlée présentant un nombre de duplication de cellules ciliées internes anormalement élevé, créant ainsi une seconde rangée de cellules ciliées internes. Ces cochlées présentent également quatre rangées de cellules ciliées externes (Zhang N, Martin GV, Kelley MW, Gridley T.).

De la même façon, l'électroporation d'une construction ATOH1/MATH1 dans l'organe de Corti provoque un nombre de cellules ciliées anormalement élevé.

Au cours de leur différenciation, les cellules ciliées et de soutien expriment différents marqueurs de différenciation. Les marqueurs, caractérisant les cellules ciliées, sont plus nombreux que les marqueurs caractérisant les cellules de soutien.

Ces marqueurs sont indiqués dans la table 2.

Marqueurs	Type cellulaire	Stade de développement	Références
Math1/ATOH1	Cellule ciliée	E13,5	Lanford PJ, Shailam R, Norton CR, Gridley T, Kelley MW.
Jag2	Cellule ciliée	E13,5	(Kiernan et al., 2005)
MyoVI/MyoVIIa	Cellule ciliée	E13,5	(Montcouquiol and Kelley, 2003)
Pou4f3	Cellule ciliée	E13,5	Hertzano et al, 2004 ; Sage et al,2006
DLL1	Cellule ciliée	E13,5	(Kiernan et al., 2005)
Notch	Cellule de soutien	E13,5	(Kiernan et al., 2005)
GFAP	Cellule de soutien	ND	ND
HES1/5	Cellule de soutien	E15	ND
P75	Cellule de soutien	ND	ND

Table 2 : Marqueurs de différenciation des cellules ciliées et de soutien

1.3.1.2.3.1.3.2 Jonctions d'adhérence serrées particulières

Nous avons vu précédemment que l'espace intercellulaire au niveau de cellules épithéliales était défini et régulé par des jonctions serrées et des jonctions d'adhérence. Ces jonctions sont complètement séparées et ne se recouvrent pas. En 2006, le laboratoire de Bechara Kachar a montré que les cellules épithéliales ciliées de la cochlée, en contact avec les cellules de soutien de Deiters, étaient pourvues de jonctions intercellulaires particulières appelées **jonctions d'adhérence serrées** (Nunes et al, 2006). Ces jonctions sont des jonctions hybrides et permettent à la fois d'assurer une fonction d'étanchéité mais aussi d'assurer une cohésion entre les cellules épithéliales. Nous devons l'apparition de ces jonctions intercellulaires hybrides au rôle fonctionnel de la cochlée. En effet, cet organe est soumis à des forces de cisaillement. Ainsi, les jonctions, maintenant l'étanchéité du tissu, doivent être renforcées.

1.3.1.2.3.2 Système vestibulaire

Le système vestibulaire de l'oreille interne constitue l'organe de l'équilibre et de l'orientation dans l'espace. Cet organe est organisé en trois structures :

- Le saccule et l'utricule : Il s'agit de deux organes orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. L'utricule permet de repérer les accélérations linéaires dans le plan horizontal, alors que le saccule permet de repérer les accélérations linéaires dans le plan vertical, et donc gravitationnel.
- Les canaux semi-circulaires : ils sont disposés dans les trois plans de l'espace et ils permettent au corps de repérer les rotations de la tête. Ils sont sensibles aux accélérations angulaires.

Le saccule et l'utricule de l'oreille interne sont composés de cellules sensorielles ciliées dérivant, tout comme les cellules sensorielles de l'organe de Corti, de « patches » sensoriels. Les cellules sensorielles ciliées vestibulaires possèdent des stéréocils d'actine organisés en escalier et adossés à un kinocil de tubuline. Les stéréocils d'actine ont la possibilité d'être déviés selon les accélérations linéaires subies par l'organisme, soit vers le kinocil, créant ainsi une réponse excitatrice, soit à l'opposé du kinocil, créant alors une réponse inhibitrice. La

voie de la polarité planaire dans le système vestibulaire est responsable de l'orientation de la touffe ciliaire des cellules sensorielles. Il existe au sein du vestibule une ligne d'inversion de polarité des touffes ciliaires, semblable à ce qui peut être observé chez l'œil de drosophile.

1.3.1.3 Tissus dont la fonction dépend de la polarité planaire

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que la fonction de nombreux tissus dépendait des gènes de la PCP. En 2010, il a été montré chez la souris que les gènes de la PCP contrôlaient le développement et l'architecture des poumons (Yates et al., 2010). La même année, l'équipe de Nathalie Spassky a montré que les gènes PCP, associée à des forces hydrodynamiques, permettait de contrôler l'orientation des cils des cellules épendymaires. Ces cils permettent de générer un flux liquidien au niveau de l'aqueduc de Sylvius dans les cavités ventriculaires du système nerveux central (Guirao et al., 2010).

1.3.1.4 Mutants PCP chez les mammifères et oreille interne

Chez les mammifères, des gènes homologues aux gènes centraux de voie de la polarité planaire chez la drosophile ont pu être identifiés. Des souris mutantes pour ces gènes présentent un phénotype PCP dans l'oreille interne (Table 3). En effet, ces souris présentent une anomalie dans l'orientation des touffes ciliaires des cellules ciliées de l'organe de Corti selon l'axe proximo-distal (Figure 18). L'identification de ces gènes PCP s'est faite aussi bien chez des mutants spontanés, que chez des animaux knock-out. Nous pouvons ainsi citer les gènes suivants :

- *Vangl1/2*, homologues du gène *Strabismus/Vang* chez la drosophile. *Vangl2* a été identifié grâce à sa mutation spontanée chez le mutant Loop-tail.
- *Frizzled3/6* (Wang et al., 2006)
- *Dishevelled1/2/3* (Wang et al., 2005)
- *Celsr1*, Homologue du gène *Flamingo* chez la drosophile (Murdoch et al, 2003)
- *Prickle2*
- *Diversine*, homologue du gène *Diego* chez la drosophile

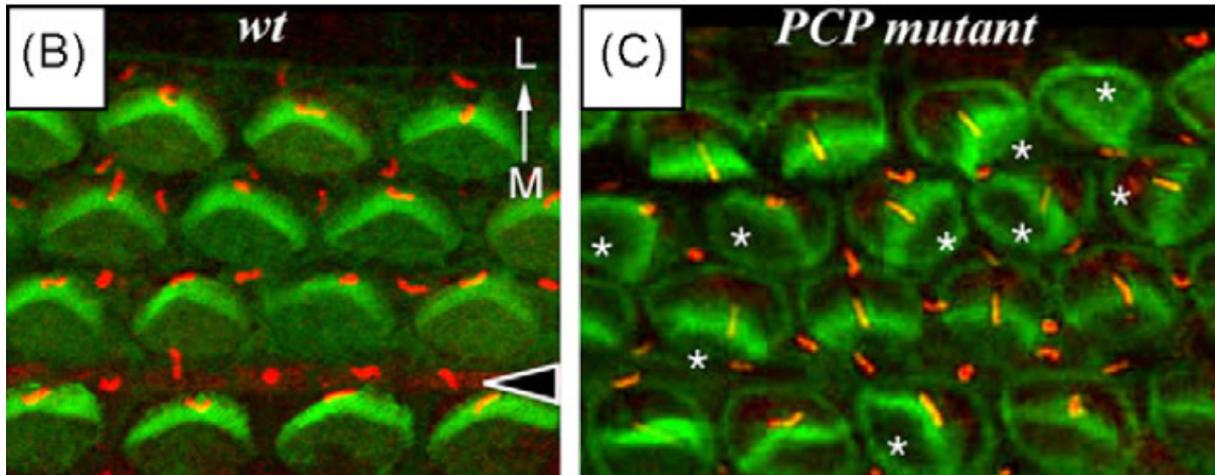


Figure 18 : Anomalie de l'orientation des touffes ciliaires des cellules ciliées de l'organe de Corti chez des mutants PCP.

Il s'agit d'une vue de surface de l'organe de Corti. En vert, nous pouvons voir la structure en V des touffes ciliaires. Le cil primaire est mis en évidence par un marquage de la tubuline acétylée en rouge. Les touffes ciliaires mal orientées sont marquées par un astérisque. Tiré de (Rida and Chen, 2009).

Chez les mammifères, le génome étant plus complexe que chez la drosophile, certains gènes PCP ont été dupliqués et appartiennent ainsi à une famille de gène. Du fait de la redondance de ces gènes chez les mammifères, il est parfois nécessaire de muter plusieurs gènes appartenant à une même famille afin d'observer un phénotype dans l'oreille interne. Ainsi, il est nécessaire de muter les gènes *Dishevelled 1/2* ou *Dishevelled 2/3* (Etheridge et al., 2008; Wang et al., 2005; Wang et al., 2006), mais aussi les gènes *Frizzled 3/6* (Wang et al., 2006).

Outre un défaut de PCP dans l'oreille interne, presque tous les mutants PCP homozygotes ont en commun :

- un défaut de polarisation du follicule pileux (Devenport et al, 2008 ; Guo et al, 2004).
- un défaut de fermeture du tube neural ou craniorachichisis , lié à un défaut dans les mécanismes d'extension convergente
- un défaut de la fermeture des paupières
- une gastrochisis , se traduisant par une localisation externe du système intestinal et gastrique

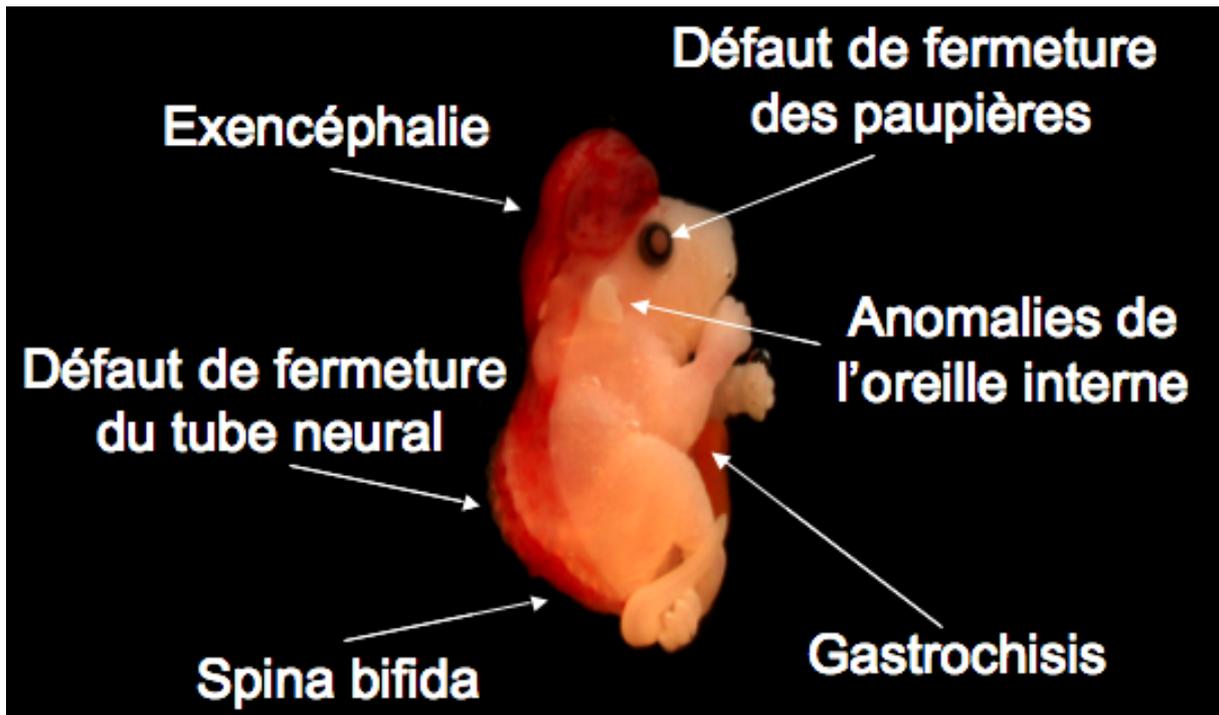


Figure 19 : Anomalies référencées chez les mutants PCP homozygotes.

L'exencephalie, l'ouverture du tube neural et la spina bifida sont les caractéristiques du craniorachisisis.

1.3.1.5 Nouveaux gènes régulateurs de la PCP chez les mammifères

Le génome des mammifères étant plus complexe que celui de la drosophile, de nouveaux gènes régulateurs de la PCP sont apparus au cours de l'évolution. Ces nouveaux gènes ont tous été validés en raison du phénotype PCP que leur mutation engendrée au niveau de l'oreille interne. Ce fut le cas pour le gène *Scribble1* en 2003 (Montcouquiol et al, 2003) Certains gènes ont toutefois d'abord été identifiés sur la base de l'ouverture du tube neural que les animaux mutants présentés, puis validés sur la base du phénotype PCP dans l'oreille. En effet, les scientifiques ont généré en masse des embryons mutants par traitement avec un agent mutagène : l'ENU. Ils ont ensuite sélectionné les embryons présentant un défaut de fermeture neural, caractéristique des mutants PCP, puis ils ont séquencé les mutations portées par le génome de ces embryons, afin d'identifier de nouveaux gènes PCP. Ces cribles par l'ENU ont ainsi participé à l'identification du gène *Sec24b*, mais aussi du gène *chuzhoi*, ainsi

que de nouvelles mutations sur le gène *Scribble1* (Wansleeben et al, 2010). Les nouveaux gènes identifiés chez les mammifères, et qui ne sont pas des gènes centraux, sont présentés en table 4.

Drosophile	Mammifère	Nom du Mutant	Référence
<i>Frizzled</i>	<i>Frizzled3-6</i>	N/A	Wang et al., 2006
<i>Dishevelled</i>	<i>Dishevelled1-2</i> <i>Dishevelled2-3</i> <i>Dishevelled 3</i>	N/A	Etheridge et al., 2008; Wang et al., 2005; Wang et al., 2006
<i>Strabismus/Vangl2</i>	<i>Vangl1</i> <i>Vangl2</i>	Loop-tail (Lp)	Murdoch et al, 2003 Montcouquiol et al., 2003; Montcouquiol et al., 2006 Torban et al, 2008
<i>Flamingo/Starry night</i>	<i>Celsr1.</i>	Spin cycle (Scy) Crasher (Crsh)	Curtin et al, 2003 Shimada et al., 2001 Murdoch et al, 2003
<i>Prickle</i>	<i>Pk1</i> <i>Pk2</i>	N/A	Ueno et al, 2009
<i>Diego</i>	<i>Diversin</i>	N/A	N/A

Table 3 : Gènes centraux de la PCP chez les mammifères

Drosophile	Mammifère	Nom du Mutant	Identification	Référence
<i>Offtrack</i>	<i>Ptk7</i>	N/A	Oreille interne	(Lu et al., 2004)
	<i>Ror2</i>	N/A	Oreille interne	Yamamoto et al, 2008
<i>Scribble</i>	<i>Scribble1</i>	Circle-tail (Crc)	ENU Oreille interne	(Montcouquiol et al., 2003) (Wansleeben et al., 2010)
	<i>Sec24b</i>	Krabbel	ENU Oreille interne	(Merte et al., 2010, Wansleeben et al., 2010)
	<i>Smurf1/2</i>	N/A	Oreille interne	Narimatsu et al, 2009
	<i>Chuzhoi</i>	Chuzhoi (Chz)	ENU Oreille interne	Paudyal et al, 2010
	<i>Wnt5a</i>	N/A	Oreille interne	Qian et al., 2007
<i>Fat</i>	<i>Fat 1-4</i>	N/A	Oreille interne	Saburi et al., 2008
<i>Polaris</i>	<i>Ifi88</i>	N/A	Oreille interne	(Jones et al., 2008)
	<i>Kif3a</i>	N/A	Oreille interne	(Jones et al., 2008)

Table 4 : Nouveaux gènes PCP mis en évidence chez les mammifères.

1.3.2 Asymétrie des protéines centrales de la PCP

Tout comme chez la drosophile, les protéines codées par les gènes centraux de la polarité planaire présentent une localisation asymétrique. Cette localisation asymétrique a pu être démontrée dans certains modèles PCP présentés précédemment, c'est-à-dire, l'organe de Corti, le système vestibulaire ainsi que le follicule pileux (Montcouquiol et al, 2006 ; Wang et al, 2006)

Dans ces différents systèmes, l'asymétrie des protéines centrales de la PCP se trouve à l'interface entre deux types cellulaires. Ainsi, dans l'organe de Corti, ces marquages asymétriques se situent à l'interface entre une cellule ciliée et une cellule de soutien. Il est donc difficile d'attribuer de façon certaine la localisation d'une protéine centrale de la PCP à un type cellulaire. À ce jour, la localisation asymétrique des protéines ci-dessous a pu être déterminée :

- Vangl2

En 2006, l'équipe de M. Kelley a montré par l'utilisation d'un anticorps, que Vangl2 était localisé, dans l'organe de Corti, à la jonction entre une cellule de soutien et une cellule ciliée (Montcouquiol et al, 2006). La génération d'une souris mutante exprimant une protéine fusion GFP-Vangl2 (Jones et al., 2008; Qian et al., 2007), a confirmé que le marquage Vangl2 était polarisé selon l'axe proximo-distal de la cochlée.

- Frizzled3/6

Tout comme Vangl2, Fzd3 et Fzd6 se polarisent le long de l'axe de la PCP dans l'organe de Corti (Wang et al, 2006). Wang et al ont ensuite généré une souris mosaïque pour le gène *Frizzled6*, permettant de déterminer de façon certaine la localisation proximale de Fzd6 dans les cellules ciliées de l'organe de Corti.

- Dishevelled 1/2/3

Des souris transgéniques exprimant une protéine fusion GFP-Dvl2 (Wang et al., 2005) ainsi que YFP-Dvl3 (Etheridge et al., 2008) ont été générées, et ont permis de déterminer une

localisation asymétrique des protéines. Les protéines Dishevelled s'accumulent du côté distal des cellules ciliées.

Distal



Proximal

Figure 20 : Asymétrie proximo-distale des protéines centrales de la PCP dans l'organe de Corti.

Au stade E14-E15, les touffes ciliaires ne sont pas encore présentes. Le kinocil et les corps basaux sont représentés au milieu de chaque cellule (Cercle).

1.3.3 Relation polarité apico-basale et PCP

1.3.3.1 Complexes apico-basaux

Deux complexes protéiques majeurs, régulant l'établissement de la polarité apico-basale, ont été mis en évidence (Margolis and Borg, 2005). Il s'agit des complexes :

- Crumbs, constitué des protéines Crumbs (Crb), PALS1(Stardust (Sdt)) et PATJ
- Par3 (Bazooka), constitué des protéines Par3, Par6 et de la protéine kinase C atypique (aPKC)

Ces complexes sont localisés dans les cellules de mammifères au niveau des jonctions serrées. Il existe également un troisième complexe, impliqué dans la polarité apico-basale chez la drosophile, mais dont le rôle reste incertain chez les mammifères (Bilder, 2004). Il s'agit du complexe :

- Scribble1, constitué de Scribble1, Lethal Giant Larvae (LGL), et de Discs large (Dlg).

Ces complexes sont en général constitués de protéines contenant des domaines PDZ appartenant à la classe des MAGUKs (member of the membrane-associated guanylate kinase). Ceci est le cas pour les protéines PALS1, PATJ, Par3, Scribble et Dlg. Les autres protéines ont des activités de type kinase, et se régulent par phosphorylation.

1.3.3.2 Mise en place des complexes apico-basaux

Les complexes Crumbs et Par3 se trouvent en position apicale, au niveau des jonctions serrées, tandis que le complexe Scribble se situe en dessous des jonctions d'adhérence, en position latérale. Les complexes apicaux auraient un effet antagoniste sur les complexes latéraux. La théorie voudrait que le complexe Crumbs soit d'abord adressé en apical, où il s'associe aux jonctions apicales de type jonctions serrées, grâce à une interaction avec les claudines et les **Zonula Occludens** de type 3 (ZO-3). Le complexe Crumbs recruterait ensuite en apical le complexe Par3. En effet, ces deux complexes peuvent s'associer grâce à une interaction PALS1/Par6/Crumbs. Une fois le complexe Par3 recruté en position apicale, par6 aurait la possibilité de former un complexe avec LGL et aPKC, entraînant alors la phosphorylation de LGL. Cette phosphorylation permet d'exclure LGL du domaine apical. À son tour, LGL stabilisé dans le domaine latéral, exercerait une activité antagoniste sur les complexes apicaux.

Nous avons vu que les protéines de la PCP étaient localisées au niveau des jonctions d'adhérence. Nous pouvons imaginer que cette localisation est également régulée par les protéines des complexes apico-basaux. En effet, la littérature montre que plusieurs interactions entre les protéines de la PCP et ces complexes existent.

1.3.3.3 Interactions entre les protéines apico-basales et les protéines de la PCP

De récentes études ont mis en évidence une relation étroite entre les gènes impliqués dans la PCP et les gènes impliqués dans la polarité apico-basale (Lee et al, 2003, Montcouquiol et al, 2003, Bellaïche et al., 2004, Djiane et al., 2005, Dollar et al., 2005, Courbard et al, 2009). Cette relation a été mise en évidence, soit sous la forme d'interactions génétiques, soit sous la forme d'interactions avec les protéines pour lesquelles ils codent ou bien simplement parce que le gène est impliqué dans la PCP et la polarité apico-basale (*Scribble1*, Montcouquiol et al, 2003).

En 2003, Lee et al, ont montré qu'il y avait une interaction entre la protéine Dlg et la protéine Strabismus/Vang. En effet, il était déjà connu qu'une absence de Strabismus ou de Dlg chez l'embryon de drosophile, entraîne des problèmes de formation de membrane plasmique. Ils ont alors montré qu'une surexpression de Dlg, associée à une surexpression de Strabismus, entraînait une formation excessive de membrane plasmique (Lee et al, 2003).

Une interaction génétique entre *Vangl2* et *Scribble1* chez les mammifères avait déjà été montrée dans la régulation de l'alignement des touffes ciliaires des cellules sensorielles dans l'organe de Corti (Montcouquiol et al, 2003). En 2009, Courbard et al, ont essayé de regarder s'il y avait une interaction génétique entre Strabismus et divers gènes de la polarité apico-basale. Ils ont ainsi mis en évidence une interaction génétique et moléculaire entre

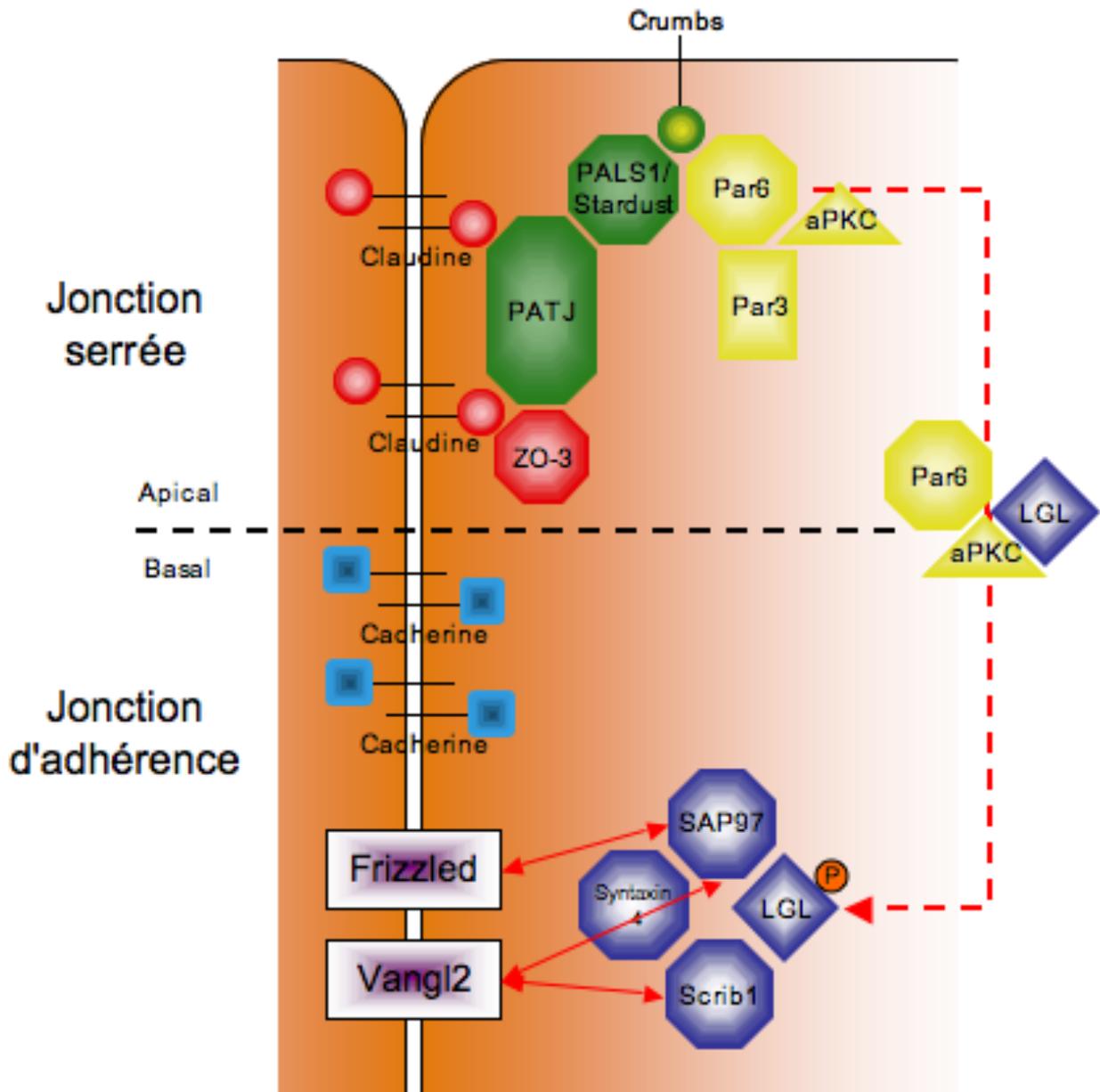


Figure 21 : Interactions entre les protéines apico-basales et les protéines de la PCP.

Ce schéma est adapté de (Margolis and Borg, 2005).

Strabismus et Scribble dans la régulation de la PCP, en se basant sur de mauvaises orientations, d'asymétrie ainsi que de chiralité des ommatidies de l'oeil de drosophile. Les auteurs n'ont toutefois trouvé aucune interaction génétique entre *Strabismus* et *Dlg*, *Lgl*, *Par6*, *Par3/Bazooka* ou *PALS1/Stardust* (Courbard, et al, 2009).

Il a également été montré en 2005 par Djiane que l'activité et la stabilité de Frizzled étaient régulées par une phosphorylation de la part de aPKC, et antagonisée par Par3/Bazooka (Djiane et al., 2005). La même année, Dollar a montré que Dishevelled était capable de réguler la polarité apico-basale en régulant Lgl (Dollar et al., 2005).

L'une des questions que nous pouvons nous poser est de savoir si les protéines des complexes de polarité apico-basale sont responsables du recrutement des protéines de la polarité planaire au niveau des jonctions d'adhérence. Bien que les études à ce sujet soient peu nombreuses, Courbard et al ont montré que, chez une drosophile invalidée pour le gène *Scribble*, la localisation apicale de Strabismus n'étaient pas affectée (Courbard et al, 2009). Djiane et al ont toutefois montré que dPatj un partenaire protéique spécifique de Frizzled, était requis pour restreindre l'activité de Frizzled (Djiane et al., 2005).

1.3.4 Hypothèses sur l'établissement de l'asymétrie des protéines PCP

Plusieurs mécanismes cellulaires peuvent expliquer la raison pour laquelle la localisation d'une protéine devient asymétrique au cours du développement :

- Une protéine peut être polarisée au sein d'une cellule en raison de son adressage dirigé. Nous verrons plus tard que l'adressage membranaire de Vangl2 est en relation étroite avec la protéine du trafic intracellulaire Sec24b.
- La protéine, si elle est membranaire, peut être endocytée et recyclée de manière localisée.
- Sa dégradation peut être polarisée. Récemment les protéines Smurfs, liées à la dégradation des protéines par ubiquitination, ont été impliquées dans la régulation de la PCP (Narimastu et al, 2009).

- Elle peut être stabilisée de manière polarisée. Ainsi, Vangl2 se lie à la protéine d'échafaudage Scribble1 (Montcouquiol et al ,2003).

1.3.5 PCP, extension convergente et défauts de fermeture du tube neural

L'étude du développement de diverses espèces de vertébrés, tels que *Danio rerio* et *Xenopus laevis*, a permis de comprendre l'importance du maintien de la fonction des gènes centraux de la polarité planaire au cours de l'évolution. Ces espèces sont particulièrement intéressantes pour l'étude du mécanisme développemental d'**extension convergente**. L'extension convergente peut être définie comme un mouvement cellulaire durant lequel les cellules, en absence de multiplication, s'intercalent provoquant alors l'extension et l'affinement d'un tissu embryonnaire. Cette intercalation modifie l'agencement cellulaire et la forme du tissu.

Au cours du développement, plusieurs mouvements cellulaires ont lieu, entraînant un changement morphologique de l'embryon. L'un des premiers mouvement est connu sous le nom de **gastrulation**. Pendant la gastrulation, des mouvements cellulaires coordonnés permettent de générer les trois feuilletts que sont : l'ectoderme, le mésoderme ainsi que l'endoderme. La mise en place de ces feuilletts ne peut avoir lieu sans mouvements coordonnés de cellules selon les trois axes du développement ainsi qu'un changement morphologique des cellules mise en jeu. Le deuxième mouvement majeur est la **neurulation**, durant laquelle la fermeture du tube neural s'opère. Les mouvements morphogénétiques ayant lieu pendant cette phase, font appel à des mécanismes communs à l'extension convergente.

Comme déjà mentionnée, une anomalie dans les mécanismes d'extension convergente donne lieu à des problèmes de fermeture du tube neural ainsi qu'à un défaut d'extension du canal cochléaire dans le développement de l'oreille interne chez les mammifères.

La voie PCP, en plus d'établir la polarité planaire au sein d'un épithélium, est essentielle dans la régulation de l'extension convergente. Un certain nombre d'homologues des gènes centraux de la PCP ont été directement impliqués dans ce mécanisme au cours du développement, définissant ainsi une nouvelle fonction pour ces gènes. Les mutations affectant les gènes régulant la polarité planaire cellulaire chez les vertébrés conduisent en général à un défaut du tube neural.

1.3.5.1 L'extension convergente

1.3.5.1.1 Généralités

L'extension convergente peut être définie comme le processus développemental par lequel le tissu d'un embryon converge le long d'un axe développemental, tout en s'étendant perpendiculairement à cet axe. Ce mouvement cellulaire se traduit par l'allongement ainsi qu'un amincissement du tissu, au cours duquel les cellules s'intercalent.

Ainsi, au stade gastrula moyenne, chez *Xenopus laevis*, les cellules du mésoderme et de l'ectoderme neural commencent à s'intercaler selon l'axe médio-latéral, produisant alors un allongement de la gastrula selon l'axe antéro-postérieur et un amincissement selon l'axe medio-latéral.

Les mécanismes de l'extension convergente ne sont pas dépendants des tissus environnants. En effet, la mise en culture d'explant de mésoderme ou de tissu neural de Xénope, montre que le tissu est capable de s'affiner et de s'étendre de façon autonome (Keller et al, 1985). Les cellules mises en jeu émettent alors des protusions cytoplasmiques orientées. Ces protusions permettent alors aux cellules qui les portent de migrer, par le jeu d'un remodelage du cytosquelette d'actine et de microtubule (William-masson, 1998).

1.3.5.1.2 Extension convergente et développement cochléaire

Les mécanismes de l'extension convergente sont également mis en jeu dans le développement cochléaire. En effet, le canal cochléaire s'amincit et s'étire du stade E16 au stade E18 chez la souris (Mckenzy et al, 2004). Il en est de même pour l'organe de Corti. L'extension convergente du tissu se fait post-mitotiquement, sans division cellulaire, ni apoptose. Seuls les mouvements cellulaires, l'intercalation radiale et planaire font que l'épithélium sensoriel s'organise en quatre rangées de cellules ciliées parfaitement alignées. (Chen et al, 2002)(Kelley, 2005).

1.3.5.1.3 Extension convergente et fermeture du tube neural

Le système nerveux primitif des embryons de cordés est appelé tube neural. Il est formé à partir de l'ectoderme situé près de la ligne médiane, qui s'épaissit pour former la plaque neurale. Le tube neural se forme pendant le processus développemental appelé neurulation, par invagination de la plaque neurale, qui forme alors une gouttière neurale. Cette gouttière se referme par convergence et fusion de ses bords, appelés crêtes neurales. À la suite de cette fusion, les crêtes neurales se séparent du tube. L'extrémité antérieure du tube se dilate pour former la vésicule céphalique, alors que le reste du tube neural est à l'origine de la moelle épinière. Comme pour la gastrulation, la fermeture du tube neural fait appel à des mouvements cellulaires d'extension, de contraction, et à des mécanismes d'adhésion, et aux mécanismes d'extension convergente.

1.3.5.2 Mutants PCP et défaut d'extension convergente

Les mutants PCP ont en commun des défauts de fermeture du tube neural ainsi qu'un défaut d'étirement du canal cochléaire.

Le défaut de fermeture du tube neural peut être incomplet et ne concerner que la partie distale du tube. On parle alors de **spina bifida**. Le tube neural peut également être complètement ouvert. Il s'agit alors de la forme la plus sévère, et l'on parle alors de **craniorachichisis**. L'embryon présente alors un exencéphalie. Les mutants PCP présentant un craniorachichisis sont présentés en Figure 22.

Ces embryons présentent également une cochlée plus courte. Ceci se traduit par une forte accumulation de cellules ciliées à l'apex de l'organe de Corti, ainsi qu'un nombre anormalement élevé de rangées de cellules ciliées.

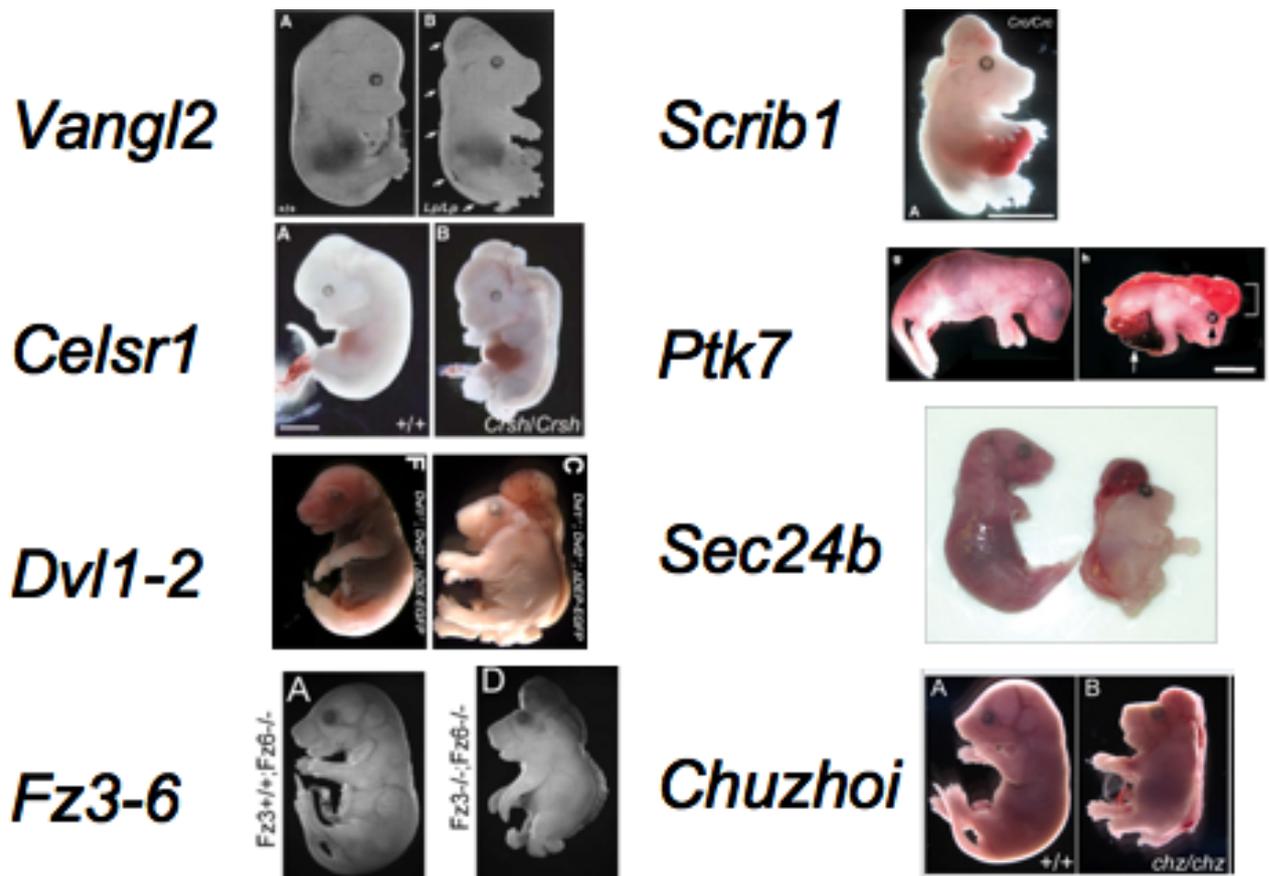


Figure 22 : Ouverture du tube neural chez des mutants pour des gènes de la PCP.

Les références sont citées en Table 3 et Table 4

1.3.6 PCP et signalisation Wnt chez les mammifères

Récemment, les facteurs sécrétés Wnt ont été impliqués dans la régulation de la polarité planaire chez les vertébrés. Ceci constitue une différence majeure avec le modèle de la PCP chez la drosophile. En effet, chez la drosophile, le morphogène Wng/Wnt n'a pas été impliqué dans la régulation de la PCP, puisqu'un mutant Wng ne présente pas d'anomalie dans l'orientation de ses poils.

Chez le xénope et chez le poisson zèbre, plusieurs mutants Wnt ont été associés à des défauts d'extension convergente pendant la gastrulation, et les embryons de ces mutants présentent donc un tube neural plus court. Nous pouvons citer les mutants :

- Mutant *Wnt5* appelé également « Pipetail » chez le poisson zèbre
- Mutant *Wnt11* appelé également « Silberblick » chez le poisson zèbre

Ces études ont poussé l'équipe de Ping Chen, en 2007, à générer une souris mutante pour le gène *Wnt5a* (Qian et al., 2007). Cette souris présente un problème d'extension convergente dans l'oreille interne, se traduisant par une cochlée plus courte et plus épaisse. L'organe de Corti présente quelques anomalies dans l'orientation des touffes ciliaires des cellules ciliées. Ce phénotype est amplifié chez un mutant *Wnt5a^{+/-} Vangl2^{Lp/+}*, prouvant une interaction génétique entre *Vangl2* et *Wnt5a*.

1.3.7 PCP et pathologies

1.3.7.1 Ciliopathies

En 2005, Ross et al ont montré que des souris présentant des mutations dans des gènes impliqués dans le syndrome de Bardet-Biedl (gènes BBS) partageaient les mêmes phénotypes que les mutants PCP (Ross et al., 2005), à savoir :

- Une perturbation de l'orientation des touffes ciliaires dans l'oreille interne chez le mutant *BBS4* et le mutant *BBS1^{+/-} ; Vangl2^{Lp/+}*
- Un défaut de fermeture du tube neural : le mutant *Bbs4* présente une exencéphalie
- Un défaut de fermeture des paupières

Chez l'Homme, le syndrome de Bardet-Biedl, ciliopathie génétique autosomique récessive, se traduit par une obésité, une rétinite pigmentaire, une hexadactylie post-axiale, un hypogénitalisme, une atteinte rénale et un retard mental. Les gènes mutés dans ce syndrome encodent des protéines BBS qui seraient impliquées dans l'assemblage des cils et des corps basaux situées à leurs bases.

Ross et al ont montré chez le poisson zèbre une interaction génétique entre le gène *Bbs4* et le gène *Tri*, homologue du gène *Vangl2*. Un mutant *Tri ; Bbs4^{Mo}* présente une anomalie dans les mécanismes d'extension convergente, se traduisant par un embryon plus court et enroulé sur lui-même (Ross et al., 2005). Enfin, les auteurs ont montré que *Vangl2* était localisé, tout comme les protéines BBS (*BBS*, *BBS1*, *BBS2*, *BBS3*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS7*, *BBS8*), au niveau du corps basal de cils de cellules épithéliales nasales humaines. En 2010, une interaction génétique entre les gènes *BBS8* et *Vangl2* chez le poisson zèbre a également été montré dans l'établissement de l'asymétrie droite-gauche (May-Simera et al., 2010a) (Table 4). L'ensemble de ces données suggère que les cils soient potentiellement impliqués dans l'établissement de la polarité planaire.

En 2008, l'équipe de Ping Chen a montré que des mutants pour les gènes *Ift88* et *Kif3a* présentaient des anomalies dans l'orientation des touffes ciliaires dans l'organe de Corti, ainsi qu'une anomalie dans la formation du cil primaire situé au niveau du vertex des touffes ciliaires. *Ift88* et *Kif3a* codent des protéines impliquées dans le transport intra-flagellaire, et donc dans la formation du cil. Cette équipe a notamment formulé l'hypothèse selon laquelle ces protéines agissaient en aval des protéines de la PCP (Jones et al., 2008).

1.3.7.2 Affections cardiaques

De nombreuses protéines centrales de la PCP sont exprimées dans les tissus cardiaques. Ainsi les mutants PCP présentent des affections cardiaques au cours du développement embryonnaire (Phillips et al., 2008). Les mutants Loop-Tail ($Vangl2^{Lp/Lp}$) et Circle-Tail ($Scrib1^{Crc/Crc}$) présentent notamment :

- un cœur de taille réduite
- des ventricules réduits
- un mauvais cloisonnement du cœur et anomalie au niveau du septum
- une anomalie dans le positionnement de l'artère sous-clavière

En 2007, Philips a suggéré que ces anomalies étaient dues à une désorganisation précoce, au cours du développement cardiaque, des cardiomyocytes (Phillips et al., 2007).

2 Chapitre 2 : À propos de Vangl2

Comme nous l'avons vu au cours de ce premier chapitre, le gène *Strabismus/Vang* ou *Vangl2*, son homologue chez le mammifère, est impliqué dans de nombreux mécanismes de la PCP. Nous avons vu que *Strabismus/Vang* avait un rôle autonome et non autonome dans la régulation de la PCP dans l'aile et l'oeil chez la drosophile, et que la protéine était certainement impliquée dans la transmission d'un signal entre cellule, et essentiel à l'établissement de la polarité planaire. Chez le mammifère, de nombreuses études ont montré que Vangl2 était impliquée dans de nombreuses pathologies que sont le craniorachisis et les ciliopathies et de nombreux mécanismes que sont, l'extension convergente, le développement cardiaque, le développement pulmonaire, et la régulation de la PCP dans l'oreille interne. Les nombreux tissus affectés par la mutation du gène *Vangl2* suggèrent que le gène est essentiel au développement. Toutefois, les mécanismes moléculaires liés à la protéine Vangl2 sont très mal connus

2.1 Dénomination

Dans la littérature, Vangl2 porte diverses appellations. Nous pouvons ainsi citer :

Nom	Abréviation	Référence
Vangl2	N/A	
Van gogh like protein 2	N/A	
Vang like protein 2	N/A	
Loop tail associated protein	LTAP	
Loop tail protein 1	LPP1	
Loop-tail protein 1 homolog	N/A	
Strabismus, Drosophila, Homolog Of, 1	STBM1; STB1	

Table 5 : Les différentes dénominations de Vangl2 dans la littérature

2.2 Structure de Vangl2

Vangl2 (*Van Gogh like-2*) homologue du gène *Strabismus/Vang* chez *Drosophila Melanogaster*, encode une protéine de type tetraspanine. La protéine est composée de quatre domaines transmembranaires, ainsi que d'extrémités N-ter et C-ter cytosoliques (Kibar et al., 2001) (Figure 23).

Vangl2 est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution. Nous pouvons retrouver des protéines homologues chez diverses espèces, et couvrant tout le règne animal. La séquence en acides aminés de la protéine a, de plus, très peu divergé comme indiqué par les alignements ClustalW.

Vangl2 est une protéine de 521 acides aminés, et a donc un poids moléculaire théorique de 60 kDa. L'analyse de séquence protéique de Vangl2 a permis de mettre en évidence plusieurs domaines putatifs (Kibar et al., 2001) (Figure 23). Parmi ces domaines, Nous pouvons citer :

- Un domaine PDZ-BDM de liaison aux protéines à domaines PDZ situé à la fin de l'extrémité C-terminale.
- Des sites de phosphorylation multiples par la PKC et la CK2 situés sur l'extrémité N-terminale
- Des séquences d'adressage membranaire de type YSGY, YHDF, NPAL et LL situées respectivement en position 7–10, 280–283, 287–290 et 290–291

Nous avons vu précédemment qu'une mutation homozygote dans le gène Vangl2 entraînait, chez la souris Loop-tail (Lp), une ouverture complète du tube neural. Une mutation hétérozygote se traduit quant à elle, par une queue en tire-bouchon (Loop-tail). En 2001, l'équipe de Philippe Gros (Kibar et al., 2001) a montré qu'il existait deux allèles pour la mutation Loop-tail. Ces allèles Loop-tail sont appelés Lpm1Jus et Lp.

Les mutations affectant ces allèles entraînent les substitutions d'acides aminés suivantes :

- D255E (Lpm1Jus), substitution d'un aspartate par un acide glutamique
- S464N (Lp), site potentiel de phosphorylation, substitution d'une sérine par une

Asparagine

Ces mutations S464N et D255E sont **semi-dominantes** et n'entraînent pas une baisse de l'expression de l'ARNm. Ces mutations entraînent cependant une dégradation de la protéine produite, comme l'a indiqué Mireille Montcouquiol en 2003, dans l'oreille interne (S464N) (Montcouquiol et al., 2003).

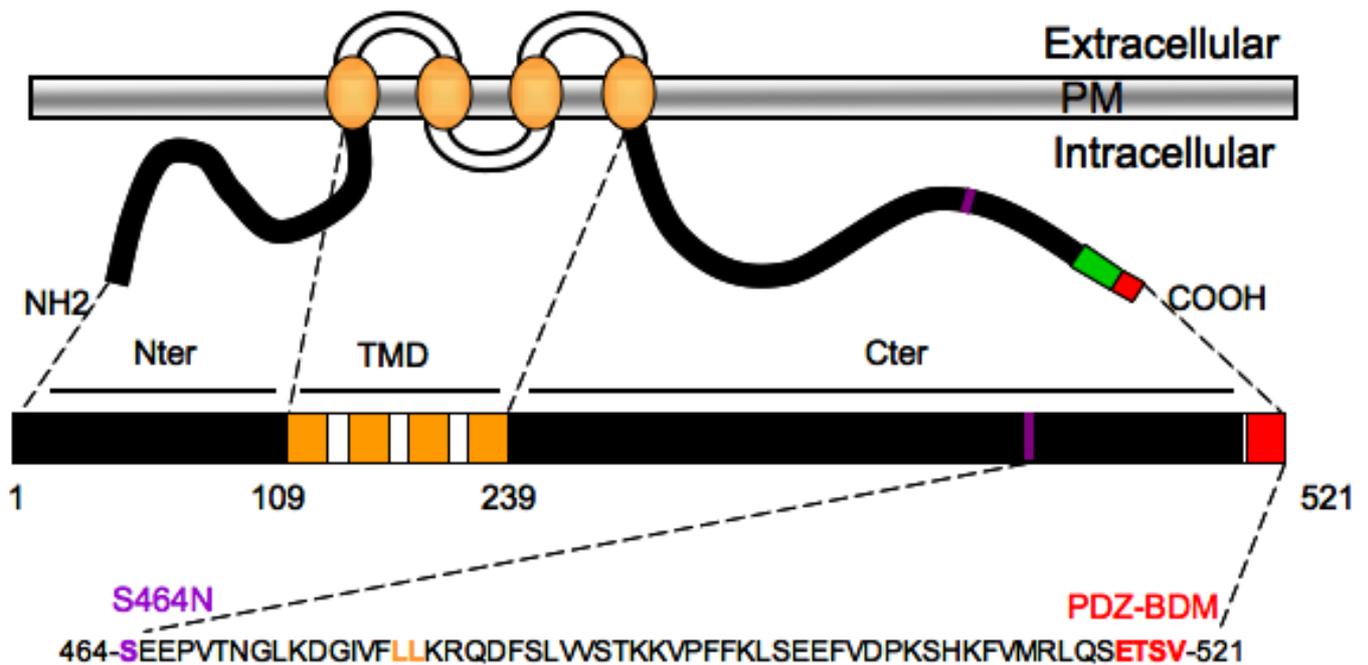


Figure 23 : Structure secondaire de Vangl2.

TMD : domaine transmembranaire ; PM : Membrane plasmique

2.3 Famille Vangl

Chez les mammifères, la famille Vangl est composée de deux membres : Vangl1 et Vangl2. L'alignement de la séquence en acides aminés des deux protéines montre que Vangl1 et Vangl2 sont des protéines proches et qu'elles possèdent toutes deux un PDZ-BDM. Cette forte homologie peut indiquer une éventuelle redondance dans la fonction des protéines.

En 2008, l'équipe de Philippe Gros a montré une interaction génétique chez la souris entre Vangl1 et Vangl2. La mutation d'un allèle pour chacun des gènes a, pour conséquences, une ouverture du tube neural, ainsi qu'une mauvaise orientation des touffes ciliaires dans la cochlée (Torban et al., 2008).

Récemment, chez l'homme, Vangl1 et Vangl2 ont été impliqués, tous deux, dans des défauts de fermeture du tube neural. En effet, l'analyse d'embryon humain présentant des formes sévères de fermeture du tube neural a révélé que ceux-ci portaient au niveau de leur génome une mutation affectant le gène Vangl1 ou Vangl2 (Kibar et al., 2007, Kibar et al., 2009, Kibar et al., 2010).

L'ensemble de ces données suggère que Vangl1 et Vangl2 puissent fonctionner de manière redondante dans la régulation de la PCP.

2.4 *Vangl2* contrôle de nombreux mécanismes

De nombreuses études ont tenté de mettre en évidence des interactions génétiques avec le gène *Vangl2*. La démonstration de ces interactions a pu être réalisée grâce à l'utilisation de la souris Loop-tail et elles avaient pour but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la PCP, mais également de découvrir de nouvelles fonctions pour notre gène d'intérêt.

Les gènes non centraux à la PCP, mis en évidence sur la base de ces interactions, sont les suivants :

- *Sec24b* : La mutation de ce gène a permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle de la protéine du manteau COPII Sec24b dans l'adressage membranaire d'une protéine centrale de la PCP. Sec24b serait impliqué dans l'empaquetage de Vangl2 dans des vésicules COPII allant du réticulum endoplasmique vers le Golgi. La mutation du gène *Sec24b* se traduit donc par l'accumulation de la protéine Vangl2 dans le réticulum endoplasmique (Merte et al., 2010, Wansleben et al., 2010).

- *Fat1-4* : La mutation de ces gènes semble indiquer que, tout comme chez la drosophile, la cassette *Fat/Dachsous* est impliquée dans la régulation de la PCP. Cette interaction génétique suggère également que Vangl2 soit impliqué dans des syndrome rénaux.

- *Wnt5a* : il s'agit de l'interaction génétique qui a permis d'impliquer pour la première fois chez le mammifère, un morphogène susceptible de contrôler la PCP dans l'organe de Corti (Qian et al., 2007).

- *Ift88* : cette interaction génétique a permis d'impliquer les mécanismes de la ciliogenèse dans ceux de la PCP (Jones et al., 2008).

- *BBS8* : La encore, cette interaction génétique implique les protéines du cils dans la régulation de la PCP. Cette interaction génétique suggère également un rôle de Vangl2 dans les retards mentaux (May-Simera et al., 2010b).

Une liste plus exhaustive des interactions génétiques avec Vangl2 est présentée en table 6. Les phénotypes, ainsi que les génotypes des animaux générés sont également présentés.

Interaction génétique	Organisme	Génotype	Phénotype	Référence
<i>Bbs8</i>	Poisson Zèbre	<i>Bbs8</i> ^{MO} ; <i>Tri</i> ^{-/-}	Défaut asymétrie droite-gauche, ciliopathie	(May-Simera et al., 2010a)
<i>Cthrc1</i>	Souris	<i>Cthrc1</i> ^{LacZ/LacZ} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Exencéphalie	(Yamamoto et al., 2008)
<i>Fat4</i>	Souris	<i>Fat4</i> ^{-/-} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Syndromes rénaux polycystiques	(Saburi et al., 2008)
<i>Ift88</i>	Souris	<i>Ift88</i> ^{CKO/CKO} <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Craniorachisis (-)PCP oreille interne	(Jones et al., 2008)
<i>Ptk7</i>	Souris	<i>Ptk7</i> ^{+/-} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Craniorachisis (-)PCP oreille interne	(Lu et al, 2004)
<i>Scribble1</i>	Souris Drosophile	<i>Scribble1</i> ^{Crc/+} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+} <i>Scrib</i> ^{+/-} ; <i>Strabismus</i> ^{+/-}	Craniorachisis (-)PCP oreille interne	(Montcouquiol et al., 2003)
<i>Sec24b</i>	Souris	<i>Sec24b</i> ^{Krabbel/+} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Craniorachisis (-)PCP oreille interne	(Merte et al., 2010, Wansleben et al., 2010)
<i>Vangl1</i>	Souris	<i>Vangl1</i> ^{+/-} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Craniorachisis (-)PCP oreille interne	
<i>Wnt5a</i>	Souris	<i>Wnt5a</i> ^{+/-} ; <i>Vangl2</i> ^{LP/+}	Craniorachisis (-)PCP oreille interne	(Qian et al., 2007)

Table 6 : Exemples d'interactions génétiques avec *Vangl2*

(-)PCP oreille interne = Mauvaise orientation des touffes ciliaires dans l'oreille interne

2.5 Vangl2 contient un domaine de liaison aux domaines PDZ

L'extrémité C-terminale de Vangl2 est caractérisée par la présence d'une séquence de quatre acides aminés (Glu, Tyr, Ser, Val) pouvant correspondre à un domaine de liaison aux domaines PDZ appelé PDZ-Binding Domain Motif (PDZ-BDM) (Wolff and Rubin, 1998). Ce PDZ-BDM étant essentiel à la fonction de la Vangl2, je vous propose donc d'aborder brièvement comment ils sont organisés et quelles sont leurs fonctions. Les PDZ-BDM sont organisés en différentes classes.

2.5.1 Classification des PDZ-BDMs

Les PDZ-BDM sont organisés en différentes classes (Beuming et al, 2004). Ces classes sont au nombre de deux et correspondent au type de domaine PDZ auquel les PDZ-BDM se lient. La spécificité des interactions PDZ/PDZ-BDM est déterminée en fonction de la séquence C-terminale de la protéine portant le PDZ-BDM.

Un PDZ-BDM est caractérisé par les quatre derniers acides aminés de la protéine. Ces acides aminés sont dénommés en fonction de leur position dans la séquence consensus. Le dernier acide aminé est appelé P-0, l'avant-dernier P-1 et l'avant avant-dernier P-2, le 4e en partant de la fin P-4. Songyang, en 1997, a ainsi défini les classes de PDZ-BDM suivantes (Songyang et al., 1997):

- Classe I : Cette classe correspond aux PDZ-BDM ayant une séquence consensus de type X-S/T-X- Φ .
- Classe II : Cette classe correspond aux PDZ-BDM ayant une séquence consensus de type X- Φ -X- Φ .

Ces classes de PDZ-BDM de type I et II se lient à des domaines PDZ bien distincts, et dénommés respectivement classe I et II. La séquence consensus E-T-S-V (Glu, Thréonine,

Serine, Valine) des derniers acides aminés de Vangl2 correspond donc à un PDZ-BDM de classe I de type X-S/T-X- Φ (Table 7).

Récemment, des PDZ-BDM se situant en partie N-terminale de la protéine ont été identifiés (Eldstrom et al., 2002). Des séquences internes de liaison aux domaines PDZ ont également été mises en évidence. Celles-ci sont du type -D-X-X-C, et sont présentées en table 7 (Maximov et al., 1999).

Classe	Séquence Consensus	Exemple	Référence
I	X-S/T-X- Φ	E-T-S-V	Songyang et al., 1997
II	X- Φ -X- Φ		Songyang et al., 1997
Interne	D-X-X-C	D-H-W-C	Maximov et al., 1999
N-terminale	N/A	N/A	Eldstrom et al., 2002

Table 7 : Séquences consensus de PDZ-Binding Domain

Φ désigne un acide aminé hydrophobe (Leucine, Valine, Isoleucine, Alanine). S/T/D correspondent respectivement

2.5.2 Le PDZ-BDM de Vangl2, signal participant à son trafic intracellulaire ?

Les PDZ-BDM ont été décrits dans la littérature comme régissant divers mécanismes. Les fonctions qui leur sont attribuées sont les suivantes :

- Les PDZ-BDM permettent de contrôler l'adressage membranaire de nombreuses protéines et de les stabiliser au niveau des membranes apicales et baso-latérales (Milewski et al., 2005, Maday et al., 2008). Le PDZ-BDM de Vangl2 pourrait donc éventuellement servir d'adressage apico-latéral dans l'organe de Corti. À titre d'exemple, des séquences consensus de type PDZ-BDM et servant à la localisation basolatérale ou apicale, sont présentées en table 8.

Protéine	Séquence consensus	Protéine PDZ interagissant	Localisation membranaire
SYN2	EFYA	LIN2	Basolatérale
GLUT1	DSQV	GLUT1CBP	Basolatérale
GLR1	NTAV	LIN10	Basolatérale
MCP	FTSL	N/A	Basolatérale
LET23	ETCL	LIN7	Basolatérale
BGT1	ETHL	LIN7	Basolatérale
GAT3	ETHF	N/A	Apicale
CFTR	DTRL	NHERF	Apicale

Table 8 : PDZ-Binding Domain impliqués dans la distribution polarisée apico-basale de protéines dans des cellules épithéliales. Adapté de Milewsky et al, 2004

- Les PDZ-BDM permettent également de réguler l'endocytose et le recyclage de nombreux récepteurs. Il a été montré par exemple, que le PDZ-BDM du récepteur β 2-adrenergique participait à son recyclage. En effet, la mutation des trois derniers acides aminés de la protéine inhibe le couplage du récepteur aux protéines Gi ainsi que son

recyclage après endocytose. Encore une fois, le PDZ-BDM de Vangl2 pourrait servir à son endocytose ou à son recyclage.

2.6 Étude de la fonction du PDZ-BDM de Vangl2

Le domaine protéique de Vangl2 ayant été le plus étudié dans la littérature, et pouvant potentiellement être nécessaire à sa fonction, est le PDZ-BDM. Le rôle de ce domaine est encore mal connu, mais plusieurs laboratoires ont tenté, dans différents systèmes et dans différentes espèces, d'établir une relation entre ce motif et la fonction de protéine (Darken et al., 2002, Goto and Keller, 2002, Jessen et al., 2002, Park and Moon, 2002).

Comme déjà mentionnée, l'analyse par alignement de la partie C-terminale de Vangl2 a montré que le PDZ-BDM était systématiquement conservé entre les espèces, soulignant l'importance de ce domaine. Les laboratoires ont, dans leurs études, opté pour une stratégie de surexpression d'une forme tronquée de Vangl2, présentant une délétion du PDZ-BDM.

Comme nous l'avons déjà indiqué auparavant, la surexpression du gène Vangl2 (gain de fonction) chez le Xénope ou chez le poisson zèbre, entraîne des problèmes d'extension convergente, se traduisant par un embryon plus court et enroulé sur lui-même (Goto and Keller, 2002, Jessen et al., 2002). En 2002, Darken et al ont injecté chez un œuf de Xénope un ARNm codant pour une protéine Strabismus sans PDZ-BDM (Δ PBS-Xstbm). Les embryons injectés avec cette construction présentaient tous une anomalie dans leurs extensions convergentes. Les auteurs en avaient déduit que le PDZ-BDM de Strabismus n'était pas nécessaire à sa fonction (Darken et al., 2002).

La même année, Goto et Keller, ont repris ce type d'expériences, et ils ont remarqué qu'il fallait injecté une dose cinq fois plus élevé d'ARNm codant pour la protéine Δ PBS-Xstbm que d'ARNm Xstbm, et ceci afin d'observer un défaut d'extension convergente chez l'embryon. Les auteurs ont également mis en évidence que l'ARNm codant pour Δ PBS-Xstbm était capable de restaurer une extension convergente normale chez un embryon injecté avec un ARNm Xstbm. Cet élément a permis de mettre en évidence un effet dominant négatif de Δ PBS-Xstbm sur Xstbm. Les auteurs ont émis l'hypothèse que Xstbm pouvait se dimériser, et qu'un dimère Δ PBS-Xstbm/Xstbm serait inactif (Goto and Keller, 2002).

Park et Moon ont émis l'hypothèse selon laquelle un signal PCP pouvait transiter via le PDZ-BDM de Strabismus (Park and Moon, 2002). L'ensemble des différentes troncations réalisées sur la protéine Vangl2, afin d'étudier sa fonction, est présenté en table 9.

2.7 Le PDZ-BDM de Vangl2 est un site d'interaction protéique important

2.7.1 Vangl2 interagit avec Scrib1 via une liaison PDZ/PDZ-BDM

En 2003, Mireille Montcouquiol a montré que Vangl2 interagissait avec la protéine Scrib1 par l'intermédiaire du PDZ-BDM.

Scrib1 est une protéine d'échafaudage cytosolique. D'une longueur de 1551 acides aminés, elle est constituée de quatre domaines PDZ ainsi que d'une répétition de leucine (LLR) dans son extrémité en N-terminale. Comme nous l'avons vu auparavant, *Scrib1* est impliqué dans la polarisation des cellules épithéliales chez les invertébrés et les vertèbres, en régulant la polarité apico-basale et la PCP.

2.7.2 Vangl2 interagit avec des effecteurs de la PCP grâce au PDZ-BDM

Très dernièrement, Vangl2 a été impliqué dans la régulation des jonctions d'adhérence par l'intermédiaire de la protéine Rac1 (Lindqvist et al., 2010). Lindqvist et al ont montré que Vangl2 interagissait avec Rac1 et RhoA, et que cette interaction était dépendante du PDZ-BDM. Comme nous l'avons déjà vue, la signalisation PCP aboutit à un remaniement du cytosquelette d'actine et de tubuline. Rac1 et RhoA pourraient donc constituer une voie intéressante dans la transmission d'un PCP régulé par Vangl2.

Animal	Construction	Mutant	Mutation	Interaction?	Sur-expression	Sous-expression	Références
Xenopus laevis	Xstbm	N/A			(-)CE	(-)CE	<i>Darken et al, 2002</i> <i>Goto and Keller</i>
	Δ PBS-Xstbm	N/A			(-)CE	N/A	<i>Darken et al, 2002</i>
	Xstbm(Δ PDZ-B)	N/A	1-499		(-) CE Effet dominant négatif	N/A	<i>Goto and Keller</i>
Mus musculus	Vangl2 ^{Lp}	Loop-Tail	S464N D255E		N/A	(-)CE	<i>Torban et al</i>
	Vangl2 Δ 4	N/A	1-517	Perte d'interaction avec Scrib1, Rac 1, RhoA	N/A	N/A	<i>Montcouquiol et al, 2006</i> <i>(Lindqvist et al., 2010)</i>
	Vangl2	N/A	1-521	Scrib1	N/A	N/A	<i>Montcouquiol et al, 2006</i>
Danio rerio	stbm, tri	Trilobite	Tri ^{C240A} Tri ^{m747} Tri ^{m209}	N/A	(-)CE	N/A	<i>(Jessen et al., 2002)</i>
	stbm	N/A	1-526	Dsh	(-)Wnt canonique (+) c-Jun, JNK (-)CE	(-)CE via stbm-Mo	<i>Park and Moon, 2001</i>
	stbm	N/A	1-526	Dsh	Compense le phénotype du mutant trilobite	N/A	<i>(Jessen et al., 2002)</i>
	stbm Δ PBM	N/A	1-516	Dsh	(-)Wnt canonique	N/A	<i>Park and Moon, 2002</i>
	stbm Δ C	N/A	1-239	Perte d'interaction avec Dsh	(+)CE	N/A	<i>Park and Moon, 2001</i>
	stbm Δ N	N/A	240-526	Dsh	(+)CE	N/A	<i>Park and Moon, 2001</i>

Table 9 : Etudes portant sur la délétion de domaines protéiques de Vangl2 chez différentes espèces

(-)CE = Inhibition de l'extension convergente ; (+)CE = Extension convergente normale ; (-)Wnt canonique = Antagoniste de la voie Wnt/frizzled canonique ; (+) = activation

2.8 Nécessité de trouver de nouveaux partenaires pour Vangl2

Nous avons vu que de nombreuses interactions génétiques pour Vangl2 avaient été mises en évidence. Cependant, les partenaires protéiques sont peu connus. Les partenaires répertoriés à ce jour, et présentés pour la plupart au cours de mon introduction, sont indiqués ci-dessous :

- Scrib1
- Dsh
- Rac1
- RhoA
- MAGI3
- Frz3

Vangl2 étant une protéine transmembranaire, celle-ci pourrait constituer un récepteur ou un corécepteur. Ainsi, en 2008, l'équipe de Marek Mlodzik a montré chez la drosophile que le domaine CRD du récepteur Frizzled était capable de lier les boucles extracellulaires de Vangl2. Cette liaison pourrait constituer un signal d'activation (Wu and Mlodzik, 2008).

L'équipe de Mireille Montcouquiol a décidé de rechercher de nouveaux partenaires pour Vangl2, et ceci afin d'essayer d'identifier les partenaires participant à une voie de signalisation PCP dans l'organe de Corti. La partie C-terminale de Vangl2 étant celle contenant un nombre de domaines putatifs important, elle a été utilisée afin d'effectuer un crible double hybride.

2.8.1 Crible double hybride dans l'organe de Corti

Le crible double hybride a été en utilisant une portion de la partie C-terminale de Vangl2, allant de l'acide aminé 438 à l'acide aminé 521. Cette portion contient notamment la sérine 464 substituée chez le mutant Loop-tail, le motif dileucine, ainsi que le PDZ-BDM. Cette portion (Bait) a permis de cribler une banque d'ADNc provenant de cochlées **embryonnaires murines** allant du stade de développement E13,5 à E18,5 (Prey). L'aspect technique du crible double hybride sera expliqué dans la présentation de mon deuxième article, bien que ce crible ait été réalisé avant mon arrivée au laboratoire.

2.8.2 GIPC, nouvel interacteur de Vangl2

Cette analyse par crible double hybride a permis d'isoler 65 clones dont 13 correspondent à une protéine connue sous le nom de GIPC1. Les alignements des différents clones GIPC1 avec l'ADNc de GIPC1 sont présentés dans la partie résultats. Une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle de cette protéine sur la régulation de Vangl2 dans l'organe de Corti.

3 Chapitre 3 : À propos de GIPC1

3.1 La famille de gènes *GIPC*

3.1.1 Une famille de gènes conservée au cours de l'évolution

Les gènes *GIPC* sont des gènes qui ont été bien conservés au cours de l'évolution (Katoh, 2002). Aussi, les gènes homologues sont représentés chez les invertébrés, notamment *Drosophila Melanogaster*, mais aussi chez les vertébrés comme *Rattus Norvegicus*, *Mus Musculus*, *Danio Rerio*, *Xenopus Laevis* ou bien *Homo Sapiens*.

Chez *Homo Sapiens*, tout comme chez *Mus Musculus*, la famille de gènes *GIPC* est composée de trois membres : *GIPC/GIPC1*, *GIPC2* et *GIPC3*. Chez *Rattus Norvegicus*, cette famille est réduite à deux membres : *GIPC1* et *GIPC2*, le gène *GIPC3* restant putatif. Chez *Drosophila Melanogaster* ainsi que chez *Xenopus Laevis*, la famille des gènes *GIPC* n'est plus représentée que par un seul membre. *GIPC* est dénommé respectivement, chez *Drosophila Melanogaster* et *Xenopus Laevis*, *GIPC/LP09416* et *Kermit*.

Chez l'Homme, les gènes *GIPC2* et *GIPC3* ont été clonés en 2002 (Kirikoshi and Katoh, 2002, Saitoh et al., 2002).

3.1.2 Homologies

Il existe de nombreuses homologies entre les différentes protéines codées par les gènes de la famille *GIPC*. Ceci est valable pour les protéines *GIPCs* appartenant à la même espèce, mais aussi entre protéines homologues. Le pourcentage d'homologie, intra- et inter-espèces, est recensé en table 10. Un alignement des séquences en acides aminés des différents membres de la famille *GIPC* est présenté dans (Katoh, 2002). Il a permis de mettre en évidence d'une part, que le domaine PDZ était un domaine conservé, d'autre part que les

parties N-terminale et C-terminale de la protéine contenaient deux domaines, appelés GH1 (GIPC Homology domain 1) et GH2 (GIPC Homology domain 2), également très conservés.

Espèce	<i>GIPCs</i>	Homologies intra-espèces
<i>Homo Sapiens</i>	<i>hGIPC1</i>	<i>hGIPC1/hGIPC2</i> = 62% <i>hGIPC1/hGIPC3</i> =59,9%
	<i>hGIPC2</i>	<i>hGIPC2/hGIPC1</i> =62% <i>hGIPC2/hGIPC3</i> =55,3%
	<i>hGIPC3</i>	<i>hGIPC3/hGIPC1</i> =59,9% <i>hGIPC3/hGIPC2</i> =55,3%
<i>Mus Musculus</i>	<i>mGIPC1</i>	
	<i>mGIPC2</i>	
	<i>mGIPC3</i>	
<i>Rattus Norvegicus</i>	<i>rGIPC1</i>	
	<i>rGIPC2</i>	
	<i>rGIPC3</i>	
<i>Drosophila Melanogaster</i>	<u><i>dGIPC</i></u>	
<i>Xenopus Laevis</i>	<u><i>xKermi</i></u>	

Table 10 : Homologies intra-espèces au sein de la famille *GIPC*

H : *Human*, Homologies calculées par rapport aux séquences en acides aminés

3.2 GIPC1

3.2.1 Dénomination

La protéine GIPC1 est citée dans la littérature, sous diverses appellations. Ces appellations sont souvent à mettre en relation avec le nom de l'interacteur mis en jeu. Nous pouvons ainsi noter :

Nom	Abréviation	Référence
Chromosome 19 open reading frame 3	C19ORF3	(Von Kap-Herr et al., 2000)
GAIP C-terminus-interacting protein	GIPC	(De Vries et al., 1998)
GLUT1 C-terminal binding protein	GLUT1CBP	(Bunn et al., 1999)
IGF-1 receptor interacting protein 1	IIP 1	(Kiely et al., 2002)
Regulator of G-protein signalling 19 interacting protein 1	RGS19IP1	(Jeanneteau et al., 2004)
RGS-GAIP-interacting protein	N/A	(Wang et al., 2006a)
Synectin	N/A	(Gao et al., 2000)
Tax interaction protein 2	TIP2	(Awan et al., 2002, El Mourabit et al., 2002)

Table 11 : Dénomination GIPC1 dans la littérature.

3.2.2 GIPC1, une protéine d'échafaudage à multi domaine

GIPC1 (Gaip Interacting Protein C-terminus 1) est une protéine d'échafaudage cytosolique de 333 acides aminés avec un poids moléculaire de 36 kDa, régulant l'expression et le trafic de nombreux récepteurs de surface.

GIPC1 possède un domaine PDZ central, ainsi que de multiples sites de phosphorylation par la caséine kinase II, à l'intérieur ainsi qu'à l'extérieur du domaine PDZ.

Une analyse de séquence protéique semble indiquer que GIPC1 possède également un domaine riche en proline (Pro-rich) au sein de son extrémité N-terminale, ainsi qu'un domaine ACP (acyl-carrier protein) au sein de son extrémité C-terminale (Figure 24). La fonction des domaines Pro-rich et ACP est encore mal connue.

3.2.3 GIPC1 : une protéine ubiquitaire

Il s'agit d'une protéine ubiquitaire, exprimée dans divers organes (reins, cœurs, artères, neurones). Une analyse, par la technique du Northern blot, à partir d'un cDNA complet de GIPC1, a permis de mettre en évidence un transcrit unique de 1,6kb dans les divers tissus testés. Cette expression, chez la souris, semble commencer au stade E4.5, avec un pic d'expression au stade E12.5, puis diminue graduellement jusqu'au stade E18.5, taux équivalent à celui de l'age adulte. L'expression de GIPC1 semble être la plus forte au niveau de l'utérus, la peau le rein, le placenta, pancréas, suivi du muscle squelettique, le cerveau, les poumons et le foie. L'expression de GIPC1 semble être plus faible au niveau du cœur (Zhang et al., 2004) (Figure 24).

Une analyse en Western-blot montre que GIPC1 est plus importante au niveau du cerveau et de la rate.

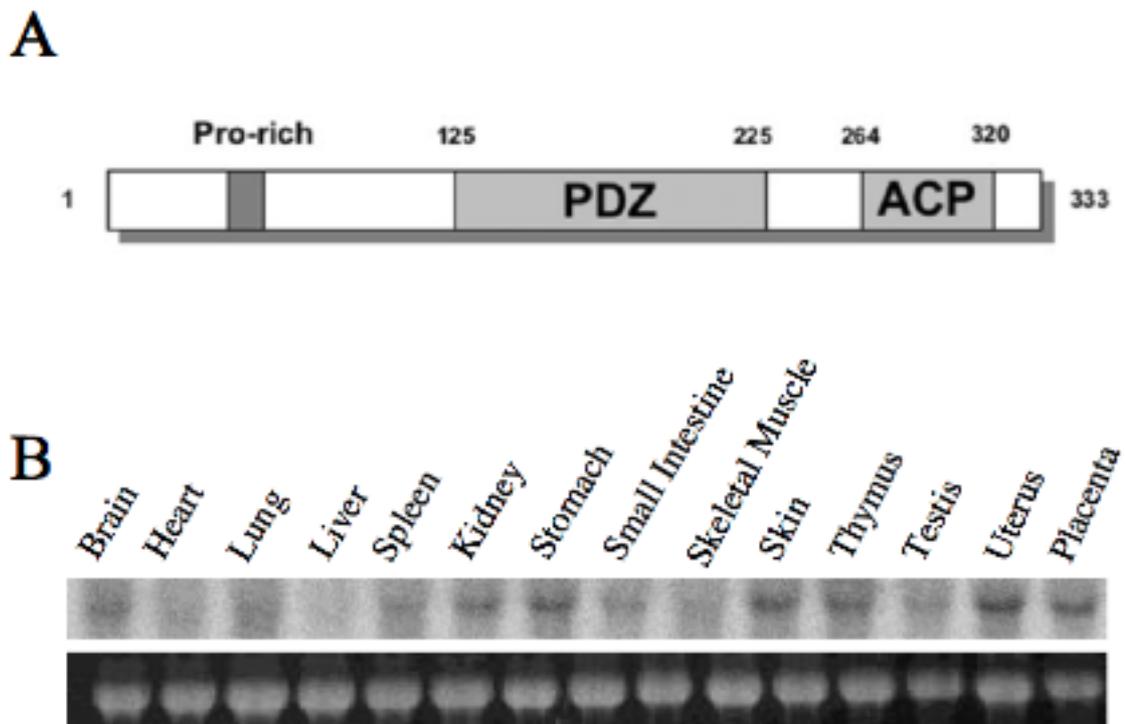


Figure 24 : Structure secondaire de GIPC1 et profil d'expression génique.

ACP : Acyl carrier protein domain ; Pro-rich : domaine riche en proline

3.2.4 GIPC1, une protéine à domaine PDZ

Un domaine de type PDZ correspond à une séquence d'environ 80 à 90 acides aminés. Cette séquence peut être retrouvée dans les protéines de la densité post-synaptique : PSD95/SAP90, mais aussi la protéine suppresseur de tumeurs dlG-A, et la protéine des complexes apico-basaux ZO-1 impliquée dans l'établissement des jonctions serrées. Ainsi les lettres PDZ sont l'abréviation de PSD95/DLG/ZO-1.

3.2.4.1 Les différentes classes de domaines PDZ

L'analyse de la séquence du domaine PDZ de GIPC1 montre une forte homologie avec les domaines PDZ des protéines MAGUK P55, CASK, Lin2, SAP102, AF6 et PSD95,

appartenant tous à la classe des PDZ domaine de type II (Gao et al., 2000). Ceci suggère que le domaine PDZ de GIPC1 est un domaine de type II.

3.2.4.2 Poche de liaison aux domaines de type PDZ-BD

Les domaines PDZ sont capables de se lier à des PDZ-BD. La petite séquence C-terminale s'insère alors dans un repliement du domaine PDZ, qui se présente sous la forme d'une poche (Figure 25). Des études précédentes ont mis en évidence que les interactions de type PDZ avec GIPC, pouvaient être abolies avec une mutation au niveau de cette poche (Lou et al., 2001). Ainsi, une mutation des résidus L143A-G144A-L145A peut abolir l'interaction entre GIPC et la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA (Yi et al, 2007). Ces interactions peuvent également être abolies par l'injection d'un peptide codant pour un PDZ-BDM (Muders et al., 2009).

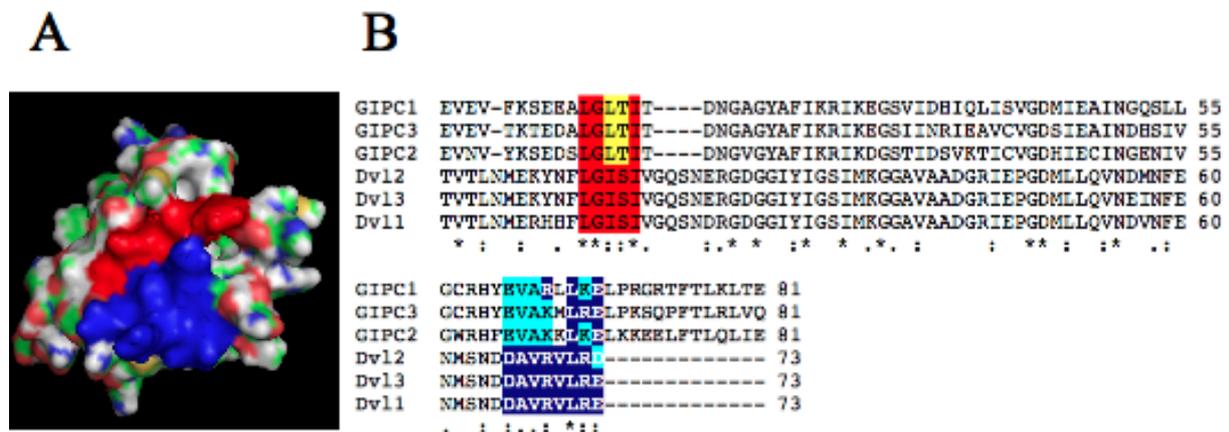


Figure 25 : Modélisation de la structure tridimensionnelle d'un domaine PDZ.

A : Domaine PDZ de Dishevelled 1 (Dvl1). B : Alignement du domaine PDZ de Dvl1,2 et 3 et GIPC1. Les zones rouges et bleues représentent une poche de liaison aux domaines PDZ-BDM. Cette poche est conservée dans tous les domaines PDZ.

3.3 Les partenaires de GIPC1

La plupart des interactions avec GIPC1 se font sur la base d'une interaction entre domaine PDZ et domaine PDZ-BDM. Les partenaires identifiés sont essentiellement des récepteurs transmembranaires, puisque le rôle de GIPC1 est de réguler leur présence au niveau de la membrane plasmique. Les interactions mises en évidence sont nombreuses. Nous pouvons ainsi dénombrer plus de 30 partenaires pour GIPC. Les partenaires les plus connus sont présentés en table 12.

Interacteur	PDZ-BDM de Classe I					Référence
	...	X	S/T	X	Φ	(Songyang et al., 1997)
5T4	S	D	V	(Awan et al., 2002)
GLUT1	...	D	S	G	V	(Bunn et al., 1999)
GP75	...	Q	S	V	V	(Liu et al., 2001)
Integrin α 6A	...	T	S	D	A	(El Mourabit et al., 2002)
Integrin α 6B	...	E	S	T	S	(El Mourabit et al., 2002)
KIF-1B	...	E	T	T	V	(Bunn et al., 1999)
Megalin	...	D	S	E	V	(Lou et al., 2002)
Neuropilin	...	T	S	E	A	
NR2B	...					(Yi et al., 2007)
RGS-GAIP	...	S	S	E	A	(De Vries et al., 1998)
SemC	...	D	S	V	V	
SemF	...	E	S	S	V	
Syndecan-4	...	E	F	Y	A	(Gao et al., 2000)
Tax	...	E	T	E	V	
TGF- β III receptor	...	S	S	T	A	(Lee et al., 2010)
Vangl2	...	E	T	S	V	(Giese et al., En cours de soumission)
α -Actinin	...	E	S	D	L	
β -adrenergic receptor	...	E	S	L	V	(Hu et al., 2003)

Table 12 : PDZ-BDM des partenaires de GIPC1

GIPC1 interagit également avec d'autres protéines sur la base d'une interaction autre que PDZ/PDZ-BDM. Ainsi, GIPC1 est capable de dimériser avec lui-même grâce à son extrémité N-Terminale, mais aussi de se trimériser grâce à son domaine PDZ (Gao et al., 2000, Kedlaya et al., 2006). GIPC1 est également capable de former des dimères avec la syntenin, un autre interacteur de Syndecan-4, mais aussi avec aPKC (Gao et al., 2000).

L'extrémité C-terminale de GIPC1 est capable de se lier à la myosine VI, une myosine atypique impliquée dans l'endocytose de nombreux récepteurs. Ainsi, Naccache et al ont montré, en 2006, que les 29 derniers acides aminés de GIPC1 étaient nécessaires à cette interaction (Naccache et al., 2006).

3.4 GIPC1, une protéine cytosolique recrutée au niveau des membranes

Les protéines RGS (Regulators of G protein signaling), comme leur nom l'indique, sont des protéines permettant de réguler et d'activer les protéines G hétérotrimériques, en se liant à leur sous-unité alpha.

RGS-GAIP, plus connue sous le nom de RGS19 ou de GAIP, est également une protéine activatrice des protéines G (GTPase Activating Protein), impliquée dans le trafic membranaire, et qui est ancrée au niveau des membranes des vésicules d'endocytose possédant un manteau de clathrine.

GIPC1 (GAIP interacting protein, C terminus 1) fait partie des rares protéines ayant été identifiée comme interagissant avec des RGS-GAIP (G alpha interacting protein). Cette interaction fait intervenir le domaine PDZ de GIPC1, ainsi que l'extrémité C-terminale de RGS-GAIP. En effet, cette extrémité C-terminale possède un domaine de liaison aux domaines PDZ : un PDZ-BDM de type SEA (De Vries et al., 1998).

Il a été montré qu'il existait deux « pools » de GIPC1: un « pool » membranaire, ainsi qu'un « pool » cytosolique soluble, et ceci avec un ratio de l'ordre de 30/70% (Kedlaya et al., 2006). Des expériences en microscopie électronique faisant appel à des anticorps couplés à des billes d'or, ont également montré que GIPC1 pouvait former des agrégats, également

appelés « clusters », qui s'associaient à de petites vésicules situées près de la membrane plasmique (De Vries et al., 1998, Kedlaya et al., 2006).

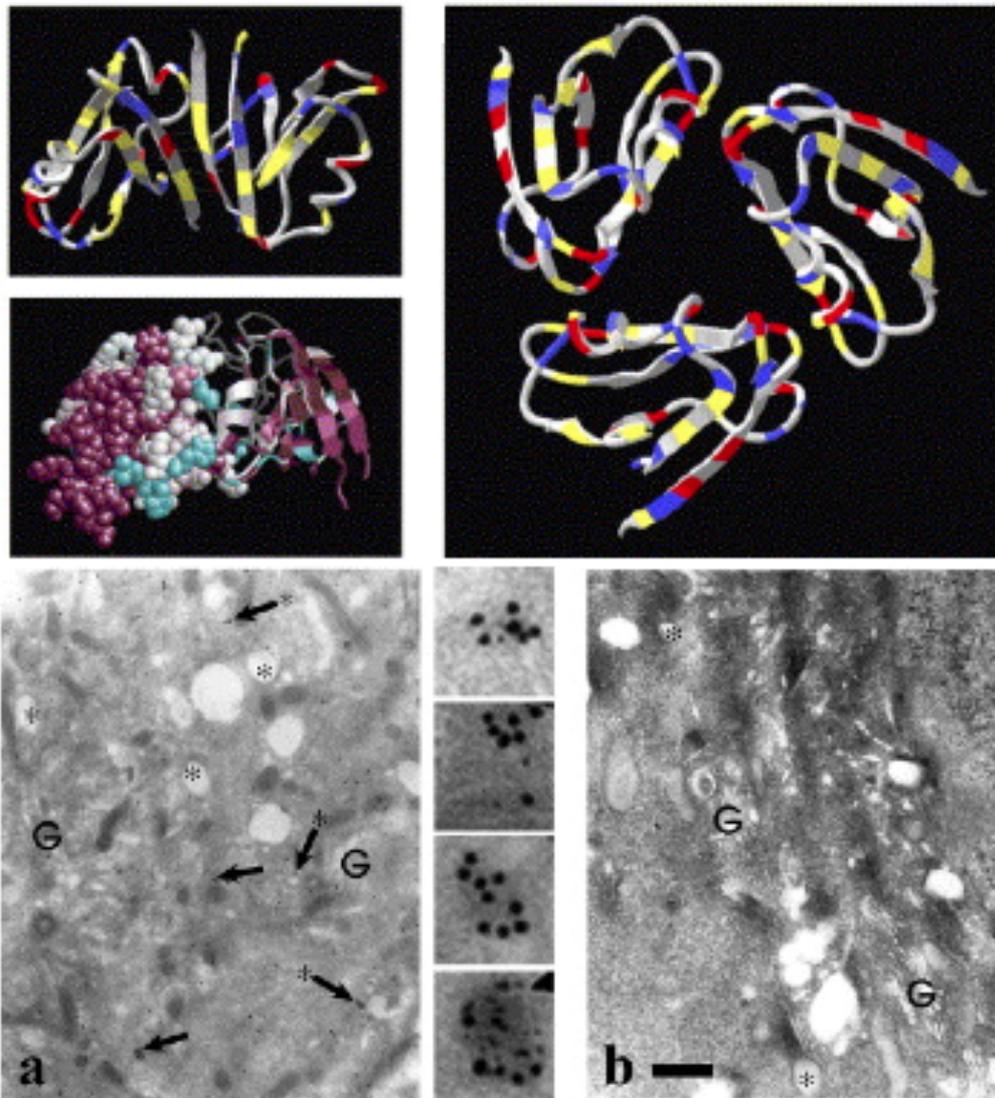


Figure 26: Modélisation tridimensionnelle du domaine PDZ de GIPC1.

Haut : Le domaine PDZ de GIPC1 est capable de former des trimères. Bas : La trimérisation permet à GIPC1 de former des « clusters ». Ces clusters se localisent près de vésicules sous membranaires.

3.4.1 Stabilisation de récepteurs à la membrane plasmique

En 2003, l'équipe de Mario Ascoli a montré que GIPC1 était capable de se lier à l'extrémité C-Terminale du récepteur hLHR. Grâce à des expérimentations faisant appel à la biotinylation de protéine de surface, ainsi qu'une lignée cellulaire exprimant de façon stable un siRNA dirigé contre GIPC1, ils ont montré que GIPC était nécessaire au maintien du récepteur hLHR à la membrane plasmique (Hirakawa et al., 2003). Plusieurs études ont montré les années suivantes que GIPC1 servait à stabiliser certains récepteurs à la surface des cellules.

En 2007, à partir d'un crible double hybride, Yi et al ont montré que GIPC était capable de se lier aux sous-unités NR2B des récepteurs NMDA (Yi et al., 2007). Cette interaction permettrait ainsi de réguler le trafic intracellulaire des récepteurs NMDA. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence, par l'utilisation de construction portant des étiquettes, que GIPC était capable de clustériser les sous unités NR2A et NR2B au niveau de la membrane plasmique de cellules COS-7. Dans un deuxième temps, les auteurs ont montré que la surexpression d'une construction GIPC dans des neurones hippocampaux en culture, permettait d'augmenter la densité de « clusters » de récepteurs NMDA à la surface. Cet effet est aboli par l'utilisation d'une construction portant une mutation au niveau de la poche LGL du domaine PDZ de GIPC. Par l'utilisation de siRNA dirigé contre GIPC, ils ont également démontré que GIPC permettait de diminuer l'internalisation de la sous unité NR2B des récepteurs NMDA en extra-synaptique. Les auteurs proposent ainsi, que GIPC dans les neurones hippocampaux, serait capable de stabiliser les récepteurs NMDA en position extra synaptique, en exerçant une activité antagoniste sur une autre protéine à domaine PDZ, responsable de l'internalisation des récepteurs.

3.4.2 Endocytose

Le rôle de GIPC1, dans la littérature, est essentiellement tourné vers une fonction d'endocytose de récepteurs membranaires à travers une liaison PDZ/PDZ-BDM, régulant ainsi leurs présences au niveau de la membrane plasmique. GIPC1 s'associe alors avec des vésicules d'endocytose juste après qu'elles ont perdu leurs manteaux de clathrine (Aschenbrenner et al., 2003, Naccache et al., 2006). L'équipe d'Horowitz a montré en 2006, que la liaison d'un ligand au niveau du domaine PDZ de GIPC1 permettait de recruter la protéine myosine VI au niveau de vésicules d'endocytose (Naccache et al., 2006). Ce recrutement se fait grâce à une liaison entre les 29 derniers acides aminés de GIPC1 et la queue N-terminale de la myosine VI. Il a été montré que la myosine VI était impliquée dans le transport de vésicules d'endocytose (Hasson, 2003). En effet, la myosine VI est un moteur moléculaire qui se déplace sur les filaments d'actine allant de leurs extrémités (+) vers leurs extrémités (-) (Hasson, 2003). La myosine VI servirait ainsi de moteur d'endocytose, en tractant les vésicules endocytées sur des filaments d'actine (Aschenbrenner et al., 2003) Figure 27.

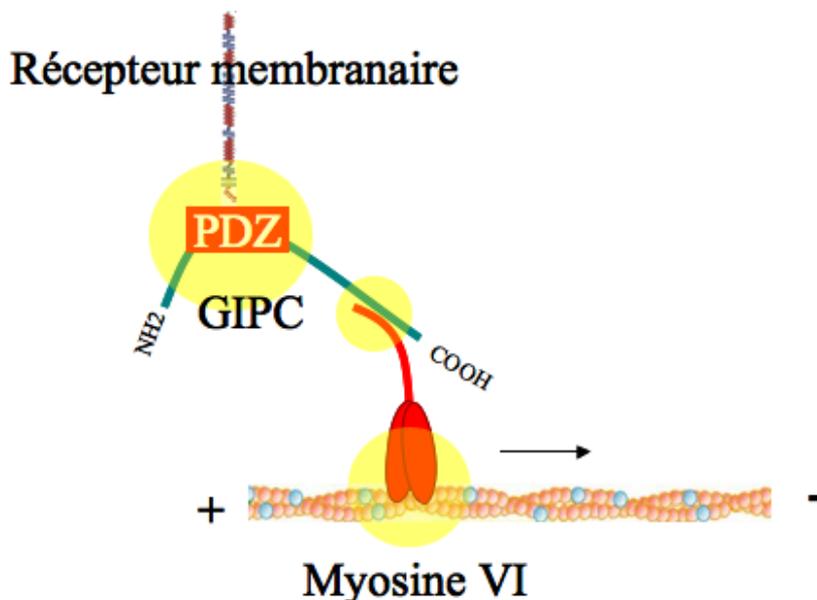


Figure 27 : Rôle du complexe GIPC1/myosine VI dans l'endocytose.

3.5 GIPC1 est un bon candidat pour réguler la PCP

Au cours de ce chapitre, je vais vous présenter plusieurs éléments bibliographiques qui confortent l'idée selon laquelle GIPC1 pourrait constituer un régulateur de la PCP. Les études du rôle fonctionnel de GIPC1, chez différentes espèces, ont révélé que GIPC1 participait à des mécanismes communs à ceux qui sont gouvernés par la voie de la polarité planaire.

Ainsi, GIPC1 a été montré comme pouvant réguler :

- L'extension convergente chez le xénope
- L'orientation des trichomes dans l'aile de drosophile (Djiane and Mlodzik, 2010)

Autres éléments intéressants, GIPC1 est impliqué dans la ramification des réseaux vasculaires, ce qui est à rapprocher du rôle des gènes de la PCP dans la ramification du réseau bronchique. Il a également été montré très récemment chez l'homme que GIPC1 était impliqué dans des surdités congénitales.

L'ensemble de ces fonctions est présenté ci-après.

3.5.1 GIPC et angiogenèse

En 2006, l'équipe de Simmons a montré que le KO du gène GIPC1 chez le poisson zèbre se traduisait par une anomalie dans la migration et la prolifération d'angioblastes et des cellules endothéliales artérielles. Des souris KO pour le gène synectine présentent également une réduction du nombre d'artères ainsi que des anomalies dans l'embranchement de nombreuses artères (Chittenden et al., 2006).

3.5.2 GIPC et extension convergente

Chez le Xénope, l'homologue du gène *GIPC1*, appelé *Kermit* ou *xGIPC* code une protéine capable de se lier à des protéines impliquées dans la PCP. Ainsi, Kermit se lie à l'extrémité C-Terminale de nombreux récepteurs Frizzled, et notamment Frizzled3. Les récepteurs Frizzled ont été montrés comme régulant l'extension convergente, notamment pendant la gastrulation (Djiane et al., 2000). En 2001, Tan et al ont montré que Kermit était impliqué dans le développement de la crête neurale. Ainsi, la surexpression de *Kermit* chez le xénope avait pour conséquence, une inhibition de l'induction de la crête neural contrôlée par *Frizzled3* (Tan et al., 2001).

3.5.3 GIPC et surdité

GIPC1 semble être un gène important dans le développement de l'oreille interne. Récemment, Bonaglia a montré que quatre patients atteints notamment de surdité et d'un retard mental, présentaient une délétion d'une région du chromosome 19 de la taille de 359kb (19p13.12) (Bonaglia et al., 2010). Cette portion du chromosome 19 correspond à six gènes, parmi lesquels nous pouvons trouver le gène *GIPC1*. L'auteur émet l'hypothèse selon laquelle la surdité chez ces patients serait liée à une haplo insuffisance de *GIPC1* et à une altération du complexe *GIPC1/Myosine VI* dans l'organe de Corti. En effet, chez l'homme, de nombreuses mutations dans le gène *Myosine VI* sont liées à des surdités (syndromes DFNA22 et DFNB37) (Ahmed et al., 2003, Sanggaard et al., 2008).

3.5.4 GIPC et PCP

Nous avons vu précédemment que la surexpression d'un gène appartenant aux gènes centraux de la PCP entraînait un phénotype similaire au phénotype observé lors d'une perte de fonction. Ainsi, avoir un signal PCP mal localisé, ou trop « fort », est tout aussi dramatique qu'une absence de signal. Une mauvaise polarisation cellulaire est alors observée. En 2010, Djiane et Mlodzik ont utilisé cette spécificité afin de réaliser un crible « gain de fonction » dans lequel des gènes potentiellement impliqués dans la PCP, sont surexprimés dans l'aile de drosophile. Ce crible a ainsi permis d'identifier le gène *dGIPC*, homologue du gène *GIPC1* chez la souris (Djiane and Mlodzik, 2010). Dans les cellules épithéliales de l'aile de drosophile, *dGIPC* s'accumule autour de vésicules suggérant qu'il pourrait être impliqué dans la régulation du trafic vésiculaire. Dans leur étude, Djiane et Mlodzik ont ainsi montré que la surexpression de *dGIPC* dans l'aile de drosophile altère l'établissement de la polarité planaire, c'est-à-dire :

- Une mauvaise orientation d'un certain nombre de trichome
- Des cellules épithéliales d'ailes de drosophile présentant des poils surnuméraires.
- Un enrichissement en actine dans les cellules surexpimant *dGIPC*

Ils ont également mis en évidence que le phénotype observé était dû à un effet sur la régulation du cytosquelette d'actine via la myosine VI. Le phénotype est en effet perdu lorsqu'une copie du gène *myosine VI / jaguar* est supprimée. La présence de poils surnuméraires lors de la surexpression de *dGIPC* est similaire à ce qui est observé lors de la surexpression de *Frizzled*, aussi les auteurs ont pensé que *dGIPC* et Fz pouvaient interagir. Fait surprenant, contrairement à ce qui avait été observé chez le xénope, *dGIPC* ne semble interagir ni avec les récepteurs Fz1 et Fz2, ni Strabismus. La perte de fonction de *dGIPC*, outre le fait de donner des individus parfaitement viables, ainsi qu'un développement tout à fait normal, ne semble pas entraîner une perturbation de la polarité planaire. Les auteurs en concluent donc que *dGIPC* n'a pas de rôle essentiel dans la PCP. *dGIPC* étant le seul membre de sa famille, les auteurs font également l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle avec une autre protéine pour expliquer l'absence de phénotype.

4 Matériels et Méthodes

Les méthodes classiques de biologie cellulaire (culture, transfection) et de biochimie (Western blot, immunoprécipitation, GST pull down, immunocytochimie) sont présentées dans les parties suivantes. Dans ce Matériel et Méthodes, je me suis attaché à présenter les techniques innovantes développées au cours de mon travail de thèse sur l'utilisation de la cochlée comme tissu d'étude et d'analyse.

4.1 Expérimentation animale

4.1.1 Animaux

Des rates gestantes Sprague Dawley, issues du centre d'élevage Janvier, ont été utilisées. Les souris Swiss sauvages de chez Charles River.

4.1.2 Mise en accouplement et datation des embryons

Afin d'obtenir des embryons aux stades adaptés à nos expérimentations, les rates et les souris sont mises en accouplement la nuit précédant le jour X, puis les embryons sont prélevés chez la rate à au jour X+16 et chez la souris au jour X+14.

4.1.3 Euthanasie

Les mères sont euthanasiées selon les directives des comités Européen (86/609/EEC) et français (87/848). L'euthanasie se fait sous une sorbonne, les animaux étant placés dans une cloche dans laquelle est diffusé de l'isofluorane. Les animaux sont ensuite décapités.

4.1.4 Prélèvement des embryons

L'abdomen des mères est aspergé d'éthanol 70%, puis ouvert (Figure 28A). Le collier de sacs placentaires est alors prélevé grâce à une pince et détaché de la mère grâce à une paire de ciseaux. Les embryons sont ensuite placés dans une solution d'HBSS (Invitrogen) froide (Figure 28B), puis décapités (Figure 28C).

4.2 Electroporations

4.2.1 Electroporation in vitro de l'épithélium cochléaire

4.2.1.1 Isolement de l'organe de Corti

En vue d'une électroporation, les oreilles internes sont disséquées au stade E14,5 chez la souris et au stade E16,5 chez le rat.

La dissection est réalisée sous une loupe binoculaire. La tête de l'embryon est fixée grâce à des minuties dans un réceptacle rempli de « sylgard » de couleur noire pour faciliter la dissection (Figure 28D). À l'aide de pinces, la peau de la tête est retirée, puis le crâne est ouvert le long de la suture pariétale (Figure 28E). Le cerveau est retiré en le poussant hors de la boîte crânienne. L'os temporal est alors visible et l'oreille interne est facilement identifiable grâce à la veine qui l'entoure (Figure 28F). L'oreille interne est prélevée grâce aux pinces, en déchirant le tissu la séparant du crâne (Figure 28G, H, I, J, K). L'oreille interne est placée dans un réceptacle rempli d'une solution d'HBSS froide complémentée en sérum.

La dissection de l'oreille interne se poursuit dans un nouveau réceptacle exempt de tissus polluants afin de faciliter la dissection. L'oreille y est fixée grâce à des minuties placées dans la partie vestibulaire (Figure 28L). La partie cochléaire est exposée en coupant le cartilage la protégeant. Cette ouverture est généralement pratiquée au niveau de la fenêtre ronde. Le canal cochléaire est alors exposé, protégé par la membrane de Reissner. Le canal cochléaire est ouvert, à l'aide d'une pince introduite à la base du canal. Une fois la première incision réalisée dans la membrane, le canal est ouvert de la base jusqu'à l'apex (Figure 28M). L'épithélium cochléaire est ainsi entièrement exposé. L'épithélium est enfin séparé du ganglion (Figure 28N, O, P).

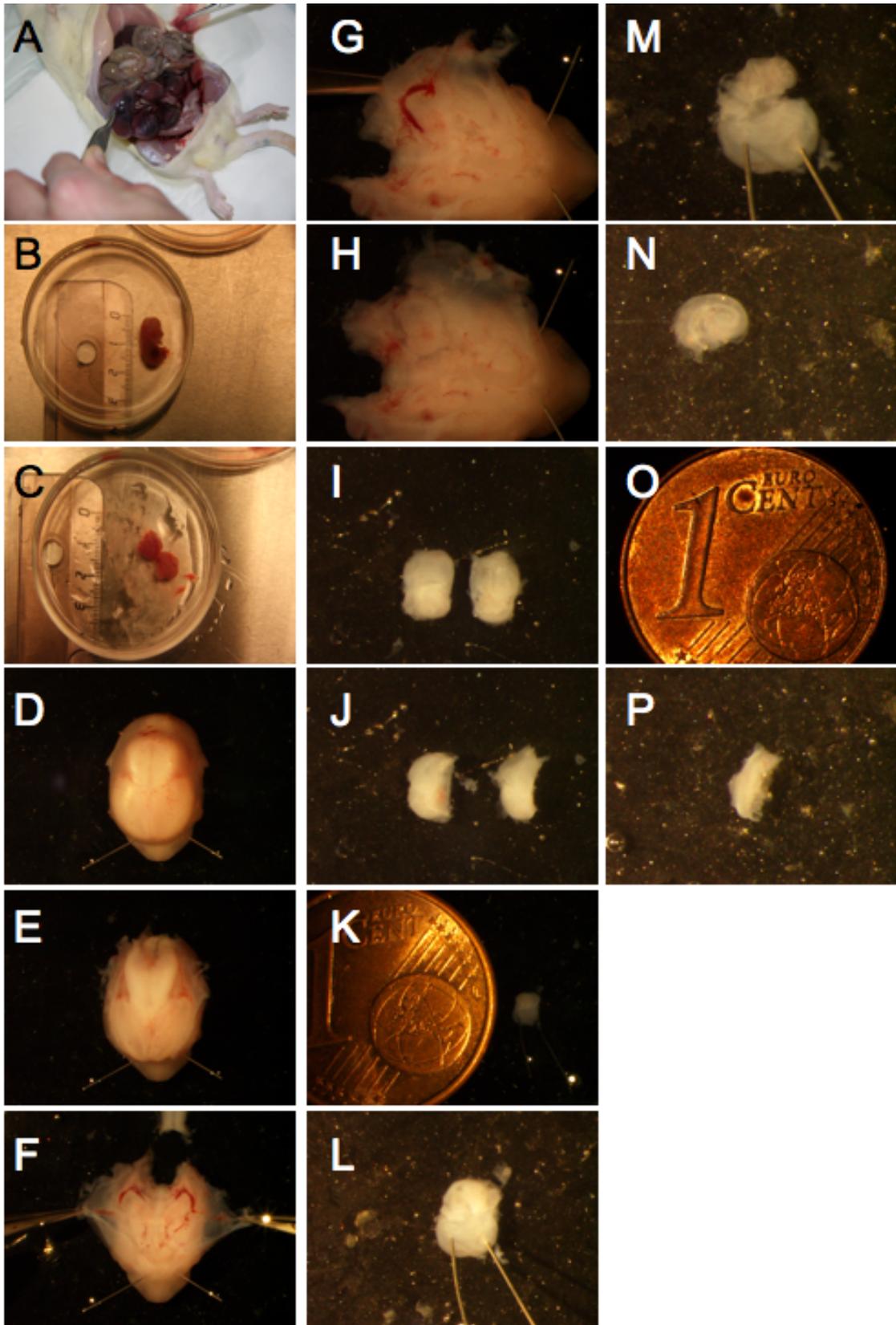


Figure 28: Isolement de l'épithélium cochléaire d'embryon de rat par microdissection.

4.2.1.2 Electroporation

Après dissection, les épithéliums cochléaires sont placés dans un volume de 8 μ l d'une préparation d'ADNc à une concentration de 1.5 à 2 μ g/ μ l. Des électrodes sont placées de part et d'autre de l'épithélium, la face apicale de l'épithélium faisant face à la cathode. L'organe de Corti est alors soumis à une série de cinq ou six chocs électriques de 25mV d'une durée de 25msec (Montcouquiol et al., 2008). Une goutte de sérum de veau foetal est ensuite ajoutée à la solution contenant la cochlée.

4.2.1.3 Culture d'explant cochléaire

Les épithéliums cochléaires sont maintenus dans des boîtes de culture de type MatTek (MatTek Corporation). Ces boîtes de culture sont, au préalable, incubées 1h avec du Matrigel (BD Biosciences), afin de favoriser l'adhésion des tissus. L'épithélium cochléaire est ensuiteensemencé dans la boîte à l'aide d'une pipette de 1ml, en présence d'un milieu de culture dont la composition est la suivante :

- Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) (Gibco, Invitrogen)
- 10% sérum de veau foetal (Gibco, Invitrogen)
- N2 supplement (Invitrogen).

Les épithéliums sensoriels électroporés sont maintenus en culture pendant six jours à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu est changé régulièrement

4.2.2 Electroporation *in utero* dans l'oreille interne d'embryon de souris

L'électroporation *in utero* est réalisée chez la souris. Les embryons sont alors au stade de développement E11.5. L'oreille interne des embryons se trouve au stade de la vésicule otique. La technique étant réalisée sur la base d'une collaboration avec John Brigande de l'« Oregon Hearing Research Center » et n'ayant pas moi-même réalisé les expérimentations,

elle ne sera détaillée que brièvement (Brigande et al., 2009).

4.2.2.1 Anesthésie et laparotomie ventrale

L'animal est anesthésié par l'utilisation d'une solution contenant du penthiobarbital, afin de réaliser une laparotomie ventrale.

La laparotomie consiste à pratiquer une incision dans l'abdomen de la souris, permettant ainsi l'accès aux embryons.

4.2.2.2 Microinjection

La transillumination de l'utérus permet de visualiser, sous loupe binoculaire, les embryons de souris, le site d'implantation d'un embryon étant caractérisé par un renflement dans l'utérus.

L'embryon est alors réorienté manuellement dans le sac utérin, par de petites pressions réalisées entre pouce et index de telle sorte que le côté gauche de l'embryon soit orienté parallèlement à la surface de l'objectif de la loupe binoculaire.

L'emplacement de l'otocyste est identifié grâce à la vascularisation l'entourant. En effet, l'otocyste est fixé dans le tissu mésenchymateux périotique entre deux artères facilement identifiables.

Une micro-injection trans-utérine est ensuite réalisée, sous lampe binoculaire grâce à l'utilisation d'une micropipette de 18-24 μm de diamètre extérieur. La pointe de la pipette est placée dans le mésenchyme périotique. La pression d'injection est de l'ordre de 15 psi pour une durée de 20ms

Une solution saline teintée en vert, contenant un plasmide d'expression à une concentration de 3 mg / μl , est injectée. La teinture verte permet de visualiser le site d'injection

Lorsque l'otocyste est correctement injecté, le canal endolymphatique se remplit et les frontières de l'otocyste deviennent facilement identifiables.

Dix à 15 injections sont nécessaires au remplissage de l'otocyste

Un seul des deux otocystes de chaque embryon est injecté, le deuxième servant de tissu contrôle.

4.2.2.3 Électroporation *in vivo*

Après injection, l'utérus est immédiatement rincé avec une solution de Ringer à 37°C.

L'électrode négative est placée à la surface de l'utérus adjacente au site d'injection. L'électrode positive est placée à la surface de l'utérus adjacente de l'otocyste non-injecté.

L'utérus est comprimé afin de maintenir l'otocyste injecté entre les électrodes.

L'électroporateur est déclenché en actionnant une pédale. Une série de cinq chocs électriques, est réalisée.

L'utérus est de nouveau rincé avec une solution de Ringer à 37°C

La souris est recousue et maintenue dans des conditions d'élevage et de gestation classiques. Les embryons sont prélevés à terme au stade E18,5, en vue d'une dissection de l'organe de Corti et une analyse par immuno-marquage.

4.3 Constructions plasmidiques utilisées en électroporation

Les constructions utilisées dans les techniques d'électroporation ont, pour la majeure partie, été générées par clonage et mutagenèse dirigée. Certaines constructions exprimant des shRNA, sont commerciales et ont été modifiées *ad hoc*, comme indiqué en table 14.

4.3.1 Vecteurs de surexpression

La construction Vangl2 a été obtenue par amplification en PCR à partir d'un tissu cochléaire de souris. L'amplicon a ensuite été cloné dans le vecteur pCLIG afin de produire une protéine de fusion portant une étiquette GFP en extrémité N-terminale (Montcouquiol et al., 2006). Le vecteur pCLIG contient un promoteur fort en amont des constructions GFP. Les constructions basées sur le vecteur pCLIG-Vangl2 suivantes ont été réalisées par mutagenèse dirigée et l'utilisation du Kit Quick Change de chez Stratagene.

Constructions pCLIG	Mutation/clonage	Description
GFP-Vangl2 ^{Lp}	S464N	Mutation Loop-tail
GFP-Vangl2 ^{Δ4}	Stop	Délétion du PDZ-Binding Motif ETSV
GFP-Vangl2 ^{Δ12}	Stop	Délétion des douze derniers acides aminés de Vangl2
GFP-Vangl2 ^{L479A-L480A}	L479A-L480A	Remplacement d'un motif putatif d'adressage baso-latéral
GFP-Vangl2 ^{C141A-C145A}	C141A-C145A	Mutation de deux résidus cystéine dans la première boucle extracellulaire de Vangl2
GFP-Vangl2 ^{ΔNter}	Délétion par PCR	Délétion des 44 premiers acides aminés

Table 13 : Vecteur de surexpression

4.3.2 Vecteurs de sous-expression

Construction	Origine	Description
pSUPER	(Yi et al., 2007)	Contient un shRNA aléatoire, contrôle négatif, exprime la GFP
pSUPER GIPC	(Yi et al., 2007)	Contient un shRNA dirigé contre GIPC1, exprime la GFP
pSUPER EF1a	(Yi et al., 2007, Brigande et al., 2009)	Contient un shRNA aléatoire, contrôle négatif, exprime GFP (promoteur EF1a)
pSUPER EF1a GIPC	(Yi et al., 2007, Brigande et al., 2009)	Contient un shRNA dirigé contre GIPC1, exprime GFP (promoteur EF1a)

Table 14 : Vecteurs de sous-expression.

Les vecteurs grisés ont été utilisés pour les électroporations *in utero*. La GFP est sous le contrôle d'un promoteur EF1a adapté à cette technique (Brigande et al., 2009).

4.4 Anticorps

4.4.1 Anticorps primaires

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés.

Anticorps	Compagnie	Origine	Immunofluorescence
β COP	ABR	Lapin polyclonal	1:1000
Calreticuline	Affinity Bioreagent	Lapin polyclonal	1:1000
ZO1	BD Biosciences	Souris monoclonal	1:1000
Vangl2	Montcouquiol et al., 2006b	Lapin polyclonal	1:500
β -catenine	Chemicon International	Souris monoclonal	1:1000
TGN38	BD Biosciences	Souris monoclonal	1 :300
Myosine VI	Proteus	Lapin polyclonal	1:300
GIPC	Proteus	Lapin polyclonal	1:300
S100A	Abcam	Lapin polyclonal	1 :100
P75	Chemicon	Lapin polyclonal	1 :500
γ -tubuline	Sigma	Souris monoclonal	1 :3000
Cre-recombinase	Chemicon	Souris monoclonal	1 :400
Acetylated tubulin	Sigma	Souris monoclonal	1 :1000

Table 15 : Anticorps primaires.

4.4.2 Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés.

Anticorps	Compagnie	Immunofluorescence
Alexa-488	Invitrogen	1:1000
Alexa-546	Invitrogen	1:1000
Alexa-647	Invitrogen	1:1000
Chromeo-546	Active Motif	1:30
Atto-647	ATTO-TEC GmbH	1:200

Table 16 : Anticorps secondaires

4.4.3 Marquages à la phalloïdine

Les phallo-toxines suivantes ont été utilisées :

Phalloïdine	Compagnie	Fluorochrome	Dilution
488	Invitrogen	Alexa-488	1:250
546	Invitrogen	Alexa-546	1:250
647	Invitrogen	Alexa-647	1 :250
546	Sigma	TRITC	1 :1000
488	Sigma	FITC	1 :1000
647	ATTO-TEC GmbH	Atto-647	1 : 500

Table 17 : Phallotoxines

4.5 Microscopie confocale STED

4.5.1 Diffraction et pouvoir de résolution d'un microscope

En 1873, Ernest Abbe a montré que la résolution d'un microscope optique était limitée par le phénomène physique de diffraction. Ce phénomène est directement lié au caractère ondulatoire de la lumière. Les limites de la résolution en microscopie optique de fluorescence en champ lointain sont donc également imposées par la barrière de diffraction. Une figure de diffraction en microscopie consiste en l'observation d'un disque brillant entouré d'anneaux alternativement sombres et lumineux à la place d'un point lumineux. Le premier disque brillant est appelé **disque d'Airy**. Le disque d'Airy limite le pouvoir séparateur du microscope, c'est-à-dire la capacité à faire la distinction entre deux points lumineux. La diffraction de la lumière au niveau de l'objet observé combinée aux propriétés des optiques composant le microscope conduit à un pouvoir de résolution D pouvant être calculé à partir de la formule suivante :

$$D = 1.22 \cdot \lambda / (NA_{obj} + NA_{cond})$$

« D » correspond à la résolution en μm

« λ » correspond à la longueur d'onde de la lumière utilisée

« NA_{obj} » et « NA_{cond} » correspondent respectivement à l'ouverture numérique de l'objectif (1,3) et du condensateur du microscope (1).

En microscopie optique de fluorescence, le pouvoir séparateur du microscope est de l'ordre de 200nm pour une longueur d'onde de 500nm. Ainsi, il est impossible de faire la différence entre deux points qui seraient séparés par une distance inférieure à 200nm.

4.5.2 L'émission stimulée

En 1994, Stefan W. Hell a montré que la barrière de diffraction de la microscopie de fluorescence pouvait être repoussée par l'utilisation d'un laser à émission stimulée (stimulated emission depletion ou STED) afin d'éliminer la fluorescence dans les régions extérieures de la réponse impulsionnelle optique d'excitation. Cette technique permet d'atteindre une résolution de 35 nm en champ lointain, en limitant la taille du disque d'Airy.

Un microscope confocal STED est donc équipé d'un laser à émission stimulée, possédant la forme d'un anneau (Figure 29) et destiné à désexciter un fluorochrome.

4.5.3 Caractéristiques du microscope confocal STED

L'architecture du microscope confocal STED utilisé pour nos acquisitions, est basée sur l'architecture du Leica DMI6000. Il s'agit d'un microscope inversé de type TCS SP5 AOBS.

4.5.3.1 Laser et diodes laser

- Argon: 458, 476, 488, 496, 514 nm
- DPSS: 561 nm
- He-Ne: 594 nm
- He-Ne: 633 nm
- Diode d'excitation: 635 nm
- Titane-Saphir accordable: 690 à 1040 nm

4.5.3.2 Objectifs

- Leica HCX PL APO CS 100 X 1,4

4.5.3.3 Résolution du microscope confocal STED

4.5.3.3.1 Mode confocal

- Résolution maximale en XY ≈ 200 nm
- Résolution maximale en Z ≈ 380 nm

4.5.3.3.2 Mode STED (à 635 nm)

- Résolution maximale en XY: 60 nm
- Résolution maximale en Z: 450 nm

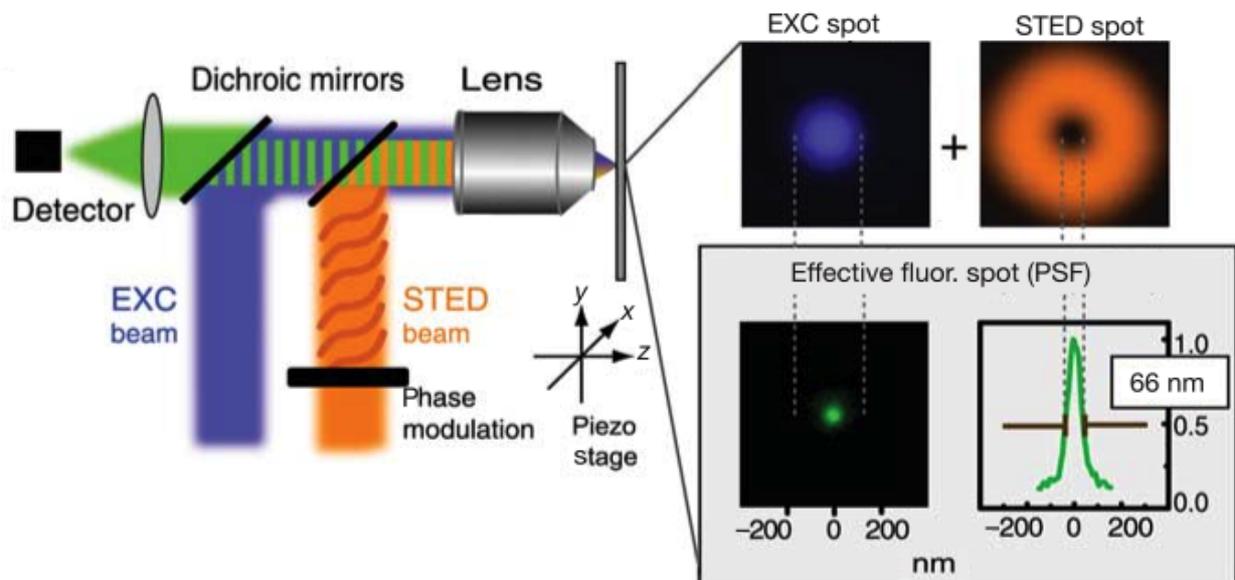


Figure 29 : Principe de la microscopie STED.

Tiré de (Willig et al., 2006)

5 Résultats expérimentaux

5.1 Un nouveau rôle des cellules de soutien dans l'établissement de la PCP au sein de l'organe de Corti

5.1.1 Objectifs

Comme précédemment indiquée dans mon introduction, la localisation asymétrique proximo-distale des protéines centrales de la PCP dans l'organe de Corti est sujette à de nombreuses incertitudes. En effet, cette asymétrie est située à la jonction entre une cellule de soutien et une cellule sensorielle ciliée. Il est donc difficile d'affirmer qu'une protéine centrale de la PCP est située dans une cellule de soutien ou dans une cellule sensorielle par la simple analyse en immuno-marquage et l'utilisation de techniques classiques de microscopie. À ce jour, seule la localisation asymétrique de Frz6 a pu être déterminée de façon précise et de manière non discutable, par la génération d'un animal mosaïque. Les immunomarquages dirigés contre la protéine Vangl2 précédemment analysés en microscopie confocale demeurent donc ambigus. Seule une localisation proximale de Vangl2 au niveau de la cellule ciliée avait jusqu'alors été envisagée, sans pour autant en avoir la preuve formelle. Cet *a priori* pose un problème majeur. En effet, cela suggérerait que Vangl2 s'accumule préférentiellement aux lieux d'accumulation de Frizzled. L'hypothèse actuelle va donc à l'encontre de toutes les théories de la polarité planaire établies chez la drosophile. Étant donnée cette incertitude, le premier objectif de cette publication est donc de déterminer la localisation exacte de Vangl2 dans l'organe de Corti.

La démonstration en 2003, par l'équipe de Mireille Montcouquiol, de la nécessité de la protéine Scrib1 dans le maintien de l'asymétrie de Vangl2, nous a également laissé penser que Scrib1 pouvait jouer un rôle dans le trafic intracellulaire de Vangl2 (Montcouquiol et al., 2003). Le deuxième objectif de ce premier article est donc de déterminer le rôle de Scrib1 dans le maintien de l'asymétrie de Vangl2, et plus largement d'étudier le rôle de Scrib1 dans l'établissement et le maintien de la polarité planaire dans l'organe de Corti. Pour réaliser ce projet, nous avons développé plusieurs stratégies :

- L'électroporation de construction GFP-Vangl2 dans l'organe de Corti afin de s'affranchir de l'utilisation d'un immunomarquage.
- La génération d'un animal mosaïque dans lequel le gène *Scrib1* est spécifiquement excisé dans les cellules sensorielles ciliées.
- L'utilisation d'une nouvelle technique de microscopie à haute résolution : la microscopie STED (Stimulated Emission Depletion microscopy), technique détaillée dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». Cette technique est très peu répandue en France, aussi nous avons collaboré avec Ulf Schwarz de chez Leica Microsystems, mais également avec la plateforme d'imagerie de Bordeaux (BIC). Cette technique permet d'obtenir des acquisitions microscopiques présentant une résolution pouvant atteindre 35nm. Ainsi, il est possible de faire la discrimination entre deux vésicules juxtaposées.

5.1.2 Résultats

5.1.2.1 Analyse de l'asymétrie proximo-distale de Vangl2 dans l'organe de Corti

En développant des techniques de biologie cellulaire spécifiques à la cochlée des mammifères, en utilisant de nouvelles techniques en imagerie STED, et en étudiant pour la première fois des mutants conditionnels pour un gène de la PCP, nous avons pu déterminer sans ambiguïté la localisation exacte de Vangl2 dans l'organe de Corti

L'analyse d'immunomarquages dirigés contre Vangl2 en microscopie STED nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, que Vangl2 était localisé à la fois au niveau des membranes plasmiques des cellules de soutien et des cellules sensorielles. Ainsi, cette analyse a montré une forte asymétrie de Vangl2 du côté distal de la cellule de soutien et plus faiblement du côté proximal de la cellule ciliée. Cette localisation fut confirmée par la surexpression d'une construction GFP-Vangl2 dans l'organe de Corti.

5.1.2.2 La délétion de *Scrib1* dans la cellule sensorielle n'affecte pas l'asymétrie de *Vangl2*, mais entraîne une perturbation de la polarité planaire

Les expérimentations en microscopie STED nous ont indiqué que *Vangl2* était à la fois localisé dans les cellules de soutien et dans les cellules sensorielles. Dans un deuxième temps, nous nous sommes donc interrogés sur les protéines susceptibles de participer à la localisation asymétrique de *Vangl2* dans ces deux types cellulaires. Les études précédentes nous ont indiqué que *Scrib1*, interacteur de *Vangl2*, était nécessaire pour le maintien de son asymétrie (Montcouquiol et al., 2006). Du fait de l'importance de cette interaction, et puisque *Scrib1* est à la fois exprimé dans les cellules de soutien et dans les cellules sensorielles, nous avons décidé d'exciser indépendamment *Scrib1* dans chacun des types cellulaires de l'organe de Corti.

Nous avons ainsi généré, pour la première fois, des souris mutantes conditionnelles pour le gène *Scrib1* présentant la délétion de *Scrib1* au niveau des cellules sensorielles. Dans ce dessein, nous avons croisé des animaux transgéniques portant des séquences loxP en amont de l'exon 2 et en aval de l'exon 8 du gène *Scrib1* (*Scrib1*^{ckO}), avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous la dépendance du promoteur du gène *pou4f3*, exprimé uniquement dans les cellules sensorielles. Une délétion de *Scrib1* dans les cellules sensorielles révèle, chez l'animal mutant, un problème de polarité planaire, nous indiquant le rôle autonome de *Scrib1* dans la régulation de la PCP. Ce phénotype est associé à un maintien de l'asymétrie de *Vangl2*, indiquant que *Scrib1* dans les cellules ciliées n'est pas nécessaire au maintien de cette asymétrie.

Nous avons également remarqué que le mutant conditionnel *Scrib1* ne présente pas de problème d'extension convergente, ce qui est systématiquement observé chez tous les mutants KO pour les gènes PCP chez le mammifère, y compris chez le mutant spontané *Scrib1*. Nous avons donc pour la première fois dans l'oreille interne séparé un signal régulant l'extension convergente de celui de la PCP. Ce résultat semble indiquer qu'un signal dépendant de *Scrib1* dans les cellules de soutien pourrait réguler les mécanismes d'extension convergente. Ceci semble également suggérer que l'expression de *Scrib1*, dans la cellule de soutien, est nécessaire à l'asymétrie de *Vangl2*.

Publication n°1 : High resolution imaging of Vangl2 and conditional *Scrib1* mutants reveal an important role for non sensory cells in Mammalian Planar Cell Polarity

Running Title: Vangl2 and Scrib1 in mammalian PCP.

Keywords: Planar Cell Polarity, ear; Vangl2

Arnaud Giese^{1,2}, Rivka Rachel³, Soren Warming³, Rebecca Erwin-Cohen³, Elodie Richard^{1,2}, Lino Tessarollo³, Neal G Copeland³, Nancy A Jenkins³, Nathalie Sans^{4,2}, Mireille Montcouquiol^{1,2}

1. INSERM U862, Neurocentre Magendie, Planar Polarity and Plasticity group, Bordeaux, France. 2. University of Bordeaux, France. 3. Mouse Cancer Genetics Program, National Cancer Institute-Frederick, Frederick, Maryland 21702, USA. 4. INSERM U862, Neurocentre Magendie, Cellular and Molecular Neurobiology, Bordeaux Cedex, France.

Current addresses. S. Warming: Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, USA; R. Rachel: R. National Eye Institute, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA; R Erwin-Cohen: MRIID, 1425 Porter Street Frederick, MD 21702, USA; L Tessarollo: NCI-Frederick, Building 560, Frederick, MD 21702, USA; NG Copeland and NA Jenkins: Institute of Molecular and Cell Biology, 61 Biopolis Drive, Proteos, Singapore 138673.

Corresponding author: Mireille Montcouquiol, Neurocentre Magendie, INSERM-U862, Planar Polarity and Plasticity group, University Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, F-33077 BORDEAUX, France E-mail: mireille.montcouquiol@inserm.fr Tel: +33 5 5757 3762. Fax: +33 5 5757 3752

Manuscript information:

7 figures, 4 supplemental figures and 1 supplemental table, 1 supplemental experimental procedure

31 text pages

Acknowledgements. The authors wish to thank Drs Mark Warchol and Matthew Kelley, as well as all the members of the lab. for comments on the manuscript. We also thank Dr Nathalie Aubailly and the entire team of the animal facility for excellent technical assistance, and the team of Bordeaux Imaging Center. We thank Ulf Schwarz from Leica Microsystems, Germany, for his help in STED microscopy images acquisition. This research was supported by INSERM AVENIR grant to M.M. and N.S., Conseil Regional d'Aquitaine (MM, NS), La Fondation pour la Recherche Medicale (MM, NS), ANR-08-MNPS-040-01(MM), ANR-07-NEUR-031-01 (NS), Aquitaine-INSERM Fellowship (AG), IRG Marie-Curie action (MM) and the European Commission Coordination Action ENINET (contract number LSHM-CT-2005-19063; NS & MM).

Abstract

The asymmetrical localization of proteins such as Vangl2 is a key feature of planar cell polarity (PCP) in invertebrates and vertebrates, but the molecular mechanisms controlling the trafficking of these proteins in mammals are still unresolved. In this study, we showed that the strong asymmetric accumulation of Vangl2 at the junction between hair cells (HC) and supporting cells (SC) in the mammalian cochlear epithelium is due to an accumulation of the protein on both the HC and the SC sides, with a stronger accumulation on the SC side. Using the Cre-loxP system, we generated conditional mutant mice in which *Scrib1* was deleted in HC (*Scrib1*^{ckO}). The hair bundle phenotype in these cochleae was similar, but weaker, than in the cochleae of circle-tail mutants (*Scrib1*^{cre}). Asymmetric localization of Vangl2 in the SC was lost in *Scrib1*^{Cre} but was maintained in the *Scrib1*^{ckO}. Additionally, cochleae from *Scrib1*^{ckO} mutants developed to a normal size, in contrast to the shortening of the cochlea observed in *Scrib1*^{Cre} mutants. The cellular patterning was not affected as severely. Our data suggest that Scrib1 is required in both HC and SC for cellular patterning and PCP establishment in the cochlear epithelium. Finally, we showed that the last 12 amino acids of Vangl2 control its trafficking to the plasma membrane.

Introduction

One of the clearest examples of Planar Cell Polarity (PCP) in mammals is the sensory epithelium of the cochlea, or organ of Corti (OC). The OC is comprised of multiple cell types, including inner (IHC) and outer hair cells (OHC) and supporting cells (SC), which prevent hair cells (HC) from touching each other. Each HC is topped by a hair bundle of actin-rich stereocilia that are organized around a single microtubule-based kinocilium. A surface view of the OC reveals a finely organized tissue, with rows of HC and all the hair bundles pointing uniformly in the same direction (for review, see Montcouquiol et al., 2006a, Kelly and Chen, 2009). This epithelium has now become an established model system to elucidate the molecular mechanisms responsible for the generation of PCP in mammals.

We and others have found that mice defective in core PCP genes, including *Van Gogh-like 2* (*Vangl2*), *Dvl1/2/3*, *Fz3/6* and *Celsr1*, show various degrees of misorientation of stereocilia (Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003; Wang et al., 2005; Montcouquiol et al., 2006b; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b). Moreover, novel PCP genes such as *Scribble1* (*Scrib1*), *PTK7*, or *Ror2* have been discovered in mammals on the basis of their inner ear and neural tube defect phenotypes (Montcouquiol et al., 2003; Lu et al., 2004; Yamamoto et al., 2008).

At the protein level, core PCP proteins including *Vangl2* (Montcouquiol et al., 2006b), *Fz3* and *Fz6* (Wang et al., 2006b), *Dvl1*, *Dvl2* and *Dvl3* (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006a; Etheridge et al., 2008), and *Pk2* (Deans et al., 2007) show polarized membrane association at the boundaries between HC and SC in mammalian inner ear epithelia. The loss of this asymmetry accompanies disruption of hair bundle orientation, suggesting a conserved function for these PCP proteins in establishing the axis of polarity. The exact localization of most of these proteins at cell boundaries in the cochlea has not been determined unequivocally, but the initial requirement for plasma membrane localization and maintenance, is a prerequisite for the subsequent asymmetric redistribution of PCP proteins and functional signaling. The mechanisms controlling PCP protein trafficking or distribution are therefore of great interest, and the mammalian cochlea is a great model for these studies.

Here, we address the trafficking of *Vangl2* in cochlear cells of rodents, and the role of *Scrib1* in its localization. We show that *Vangl2* accumulates asymmetrically mostly on the SC side at the junction with HC, that this accumulation depends on cellular organization, and

plays a role in signal transmission between cells. Using conditional knockouts, we demonstrate that *Scrib1* participates in cellular patterning and PCP establishment. Finally, we show that the last 12 amino acids of Vangl2 are important for proper sorting of the protein, targeting at the plasma membrane, but also for its basolateral retention and its function.

Materials and methods

Plasmids constructs. *Vangl2* full length cloning into pEGFPC3 or pCLIG was described previously (Montcouquiol et al., 2006b). Site-directed mutagenesis was used to substitute the serine 464 for an asparagine on the C-terminus (C-ter) region of Vangl2 (S464N), to introduce stop codons to generate Vangl2 mutants lacking the last 12 aa (Vangl2^{ΔPDZ-BM}) including the PSD-95, Discs Large, ZO-1-binding motif (PDZ-BM), to replace two leucine with two alanine in the C-ter portion of Vangl2, and to replace the cysteines of the first extracellular loop by alanine (Vangl2^{C141A-C145A}) (QuickChange, Stratagene). Mutants lacking the first 44 aa of the N-terminus portion (Vangl2^{ΔNter}) were generated by PCR from the full length cDNA.

Dissection and Electroporation. Pregnant Sprague Dawley rats were euthanized according to the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) recommendations. E16.5 rat cochleae were dissected in cold Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (Invitrogen) and electroporated in presence of 8 μl of 1.5 to 2 μg/μl cDNA with an electrical field as described previously (Montcouquiol et al., 2006b, 2008). The cochlear explants were maintained for 6 days at 37°C/5% CO₂ in MatTek dish (MatTek Corporation) before immunostaining.

Cell culture and Transfections. MDCK cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). MDCK cells were transfected with 2 μg of each DNA transfected for 24 h using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The cells were then cultured for an additional 24 h in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, HEPES (Invitrogen), glutamine and penicillin-streptomycin (Invitrogen) before immunostaining.

Cell lines quantification. Values of membrane targeting were defined as the maximum fluorescent intensity along each line measured using linescan method and Metamorph 7.04 software (Molecular Devices). Measurements from three lines were averaged per cell, and the presence at the membrane was defined as a ratio between the intensity of GFP-Vangl2 over

the intensity of ZO-1 staining. Means from different cells were averaged to obtain a final mean \pm SEM. Student's t test was used FOR statistical significance.

Immunostaining. Cochlear Explants and MDCK cells were fixed and processed for immunocytochemistry as previously described (Montcouquiol et al., 2003, 2006). Phalloidin 546 and 647 (Invitrogen) were used at a 1:250 dilution for F-actin staining. For immunocytochemistry comparisons of homozygote and wild type cochleae, both ears were processed in the same tube. P0 ears were harvested, fixed in 4% PFA, and incubated in a 30% sucrose/PBS solution overnight at 4°C. Next, 20 μ m cryostat sections were cut and permeabilized in PBS containing 0.3% triton X-100, heated in Citrate Buffer (Vector Labs) at 60 °C for 1 h, rinsed in distilled water, and in PBS for 2 x 5 min. The sections were next incubated with anti-Cre recombinase for 1 h at room temperature, and incubated next for 30 min with a biotinylated rat-adsorbed anti-mouse IgG (Vector Laboratories), to be finally reacted with diaminobenzidine using an Elite ABC kit (Vector Laboratories) with nickel intensification. Nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes).

Microscopy. For optical sectioning of whole mounts, image acquisition where obtained on an epifluorescence microscope system (AxioVision Z1; Carl Zeiss, Inc.) fitted with an Apotome slide module with a 63 \times NA 1.4 Plan-Apochromat objective and a digital camera (AxioCam MRm; Carl Zeiss, Inc.), or on a confocal microscope (TCS SP5; Leica). Imaging was done using a Z step from 0.2 to 0.4 μ m. STED microscopy was performed with a TCS STED microscope (Leica), with a objectives 63 \times 1.4 NA oil immersion, and a 100 \times 1.4 NA oil immersion STED objective. Images were processed using Volocity software (PerkinElmer).

*Generation of conditional *Scrib1* targeting vector and inactivation of *Scrib1* in HC.* The DNA construct for generation of a conditional allele of *Scrib1* was made by recombineering technique (see Fig. S1 and Supp Methods). Mice expressing Cre recombinase under the control of pou4f3 promoter were described previously (Sage et al., 2006) and obtained from Douglas Vetter (Tufts Univ, Boston). Pou4f3-Cre⁺ mice were mated to *Scrib1*-flox/flox (*Scrib1*^{flox/flox}) mice to obtain Pou4f3-Cre⁺, *Scrib1*-flox/flox (*Scrib1*^{flox/flox}, Cre⁺) conditional mutant pups for *Scrib1*, with excision in HC (also called conditional knockout or *Scrib1*^{CKO}), and Pou4f3-Cre⁻, *Scrib1*-flox/flox (*Scrib1*^{flox}, Cre⁻) pups with no excision or controls. Ears were harvested at P0 for analyses.

Other mice models. Mice were housed with a 12-h light/dark cycle and handled in compliance with the National Institutes of Health guidelines, the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) recommendations. The *circletail* mutation (*Scrib1^{Cre}*) arose spontaneously in 1997 in a transgenic colony at Columbia University (Rachel et al., 2002). Mice were maintained at Magendie Neurocenter under standard conditions by heterozygous intercross. Heterozygous offsprings were identified by sequencing, while homozygous fetuses die perinatally and were distinguished embryonically by the presence of craniorachischisis.

Results

Vangl2 accumulates asymmetrically at distal edges of supporting cells and hair cells

To precisely assess the subcellular localization of Vangl2, we analyzed surface views of whole mount preparations of P1 rat cochleae immunostained for Vangl2. These samples allow a clear analysis of the reticular lamina, which is the surface layer of the organ of Corti (OC) that is formed by the apical parts of the mosaic of HC and SC (Fig. 1A). The mammalian OC is comprised of a single row of IHC, three rows of OHC (OHC1, 2 and 3), and several types of interdigitating non-sensory SC, including inner phalangeal cells (IPh), inner and outer pillar cells (IPC, OPC), and Deiter cells (DC) (Fig. 1A). A set of actin-rich stereocilia that form a hair bundle is present on the luminal surface of each HC, and the stereocilia are orientated within the plane of the epithelium, which defines the PCP (Fig. 1A,B). This orientation is best defined in the basal turns of the cochlea around birth, when every cell type has sufficiently matured. A careful analysis of the surface view of many OC shows that Vangl2 strongly accumulates at different cell-cell junctions (Fig. 1A-B'). Vangl2 strongly accumulates at SC/SC cell junctions, between IPh and PC, and between PC (Fig. 1A-B'). Vangl2 also accumulates strongly at SC/HC junctions, specifically in the second and third OHC rows (Fig. 1A-B'). Therefore, we focused our study on the localization of Vangl2 at heterotypic junctions between HC and SC in OHC2 and OHC3.

When observed in the Z-axis, the OHC membrane may be divided into three regions as defined by Souter et al., 1995: the apical surface including the hair bundle and tight junction

(TJ), the apical part of the lateral membrane encompassing the junctional area (adherens junction AJ), and the baso-lateral membrane (Fig. 1C). Z-stack images show that Vangl2 accumulates in the apico-lateral region, starting below the cuticular plate, a rigid platform formed of a network of actin filaments supporting the stereociliary bundle (Figs. 1D, D'), and extends approximately 2.60 μ m deep at the SC/HC junction (see also Fig. S2). Vangl2 localization is consistent with an accumulation in the tight adherens junction, a hybrid intercellular junction identified in the OC at the junction between OHC and DC, which combines critical features of both TJs and AJs (Nunes et al., 2006). We also observed a weaker staining of Vangl2 around the entire membrane of the HC and along the depth of the cells (see Fig. S2). A 3D representation shows that Vangl2 accumulates strongly on the proximal side of the HC but also more weakly in a restricted zone on the distal side of the HC (Figs. 1E, E'). A 3D isosurface representation of the same data shows that Vangl2 (Fig. 1F-H', green) accumulates just below an actin-rich ring (Fig. 1F-G, red) and colocalizes with β -catenin, a component of the AJs (Fig. 1F, H, blue). To try to discriminate between the plasma membranes of both cell types, we used stimulated emission depletion (STED) microscopy. Using this technique, we were able to reveal that Vangl2 expression appeared on both the SC and the HC sides (Fig. 1I-N). On the HC side, Vangl2 labeling did not appear as a straight line, but more as puncta or clusters of concentrated particles with a broad range of intensities (compare Fig. 1I, J and Fig. S3). To better visualize the range of fluorescence intensities reflecting the patterns of protein distribution, we changed the representation of each fluorescence value from a grey scale to the Union Jack LUT (Image J), with black representing the lowest fluorescence, and progressively higher fluorescence levels are blue, white, and then red (see Fig. 1K, L). This illustration confirmed that Vangl2 protein is concentrated at many foci. Linescan and a 3D isosurface reconstruction of Vangl2 distribution confirmed that Vangl2 is expressed strongly on the SC membrane side and in a spotted pattern on the HC membrane side (Fig. 1M, N). STED microscopy confirms a distal localization of Vangl2 in HC as a thin and weak line (Fig. 1O, O').

To support our observation that both HC and SC could traffic Vangl2 asymmetrically, we followed the localization of the protein fused with a GFP-tag. We first established that electroporation with a vector that contained only GFP did not affect cochlear HC survival or differentiation (Fig. 2A-B). As previously observed, in most cells with strong GFP-Vangl2 expression, we did not observe asymmetrical localization of the tagged-protein; however,

GFP-Vangl2 was expressed along the entire circumference of the plasma membrane (Montcouquiol et al., 2006b, data not shown). We searched for cells with weaker GFP-Vangl2 expression, and we observed an asymmetrical localization of the protein with an apparent stronger accumulation on the distal side of the HC (Fig. 2C-D'). In SC, we observed a similar but stronger distal asymmetrical localization of GFP-Vangl2 (Fig. 2G-J). Altogether, our results support our observation that Vangl2 accumulates strongly and primarily on the distal side of SC at the junction with a HC, and implies that the boundary between the SC and the HC junction is the key cellular interface for PCP signal transmission.

A mutation in the first extracellular loop of Vangl2 does not affect its asymmetrical localization but affects its stability

Recent data have suggested that Frizzled receptors (Fz) interact with the extracellular loops of Vangl2 to signal between adjoining cells (Courbard et al., 2009). Two cysteine residues are conserved in the first extracellular loop of Vangl2 in sequences of both invertebrates and vertebrates (Fig. 3A)(Torban et al. 2004). We tested the impact of the mutation of these cysteine residues (C141 and C145) on Vangl2 asymmetrical localization (Fig. 3). When expressed in HEK293 cells, the protein expression of GFP-Vangl2^{C141A-C145A} was reduced by 46% (mean value 53.9 ± 4.4) when compared to GFP-Vangl2 (100%). These results are similar to the 59% (mean value 40.9 ± 0.6) reduction of GFP-Vangl2^{Lp} expression (Fig. 3B) (n = 3). In OHC, low levels of the tagged protein were observed at the plasma membrane, except for a small region of higher expression near the kinocilium and below the cuticular plate (Fig. 3C-E, arrow). In addition, at times, we observed a spherically-shaped accumulation of the protein on the proximal side of the HC, opposite the kinocilium (Fig. 3C, C', E). This round-shaped accumulation is consistent with accumulation in an organelle called Hensen's body, which could participate in recycling of membrane or integral membrane proteins (Saito, 1983). In IHC electroporated with GFP-Vangl2^{C141A-C145A}, the asymmetric localization was also stronger distally, at the junction with the PC (dotted lines, Fig. 3F-G'). These results suggest that the cysteines in the first extracellular loop of Vangl2 play a role in the regulation of protein levels/stability but not in its asymmetrical localization. During our electroporation experiments, we also obtained SC transfected with the GFP-Vangl2^{C141A-C145A} construct, and the tagged protein accumulated at the distal edge of the cells at the junctions

with neighboring HC (Fig. 3H-I'). We occasionally observed electroporated SC that possessed no contact with HC (an artifact of cultures), which displayed an asymmetrical localization of Vangl2 (Fig. 3J-K'). This finding indicates that SCs are capable of trafficking Vangl2 asymmetrically in the absence of a contacting HC. Further support for this suggestion was provided by the patterns of Vangl2 immunoreactivity in the normal mouse cochlea. In Fig. 3L, normal mosaic patterning was slightly disrupted, and two OHCs are facing each other (OHC2* and OHC5*; Fig. 3L, L') instead of abutting a SC. Notably, no asymmetry in Vangl2 localization was observed on the proximal side of the HC2, although we still observed asymmetric accumulation of Vangl2 (Fig. 3L, arrow) at the junction between two SCs (outlined in light grey).

Scrib1 is required for PCP signaling in hair cells and for convergent extension

We previously demonstrated that in the cochleae of *circletail* mice (*Scrib1^{Crc}*) that possess a spontaneous mutation in *Scrib1*, HC had a clear PCP phenotype (Montcouquiol et al., 2003). Because *Scrib1* is expressed in both HC and SC, it was not possible to determine if it was required in one specific cell type or in both cell types (Montcouquiol et al., 2006b). We used a conditional mutant for *Scrib1* (*Scrib1^{CKO}*) to specifically excise the gene from the HC (see Methods). We first determined that Cre recombinase (Cre) was not expressed in OC of animals without the Cre allele (*Scrib1^{fx/fx}*, Cre⁻, Fig. S4A, C, E, G); however, it is only expressed in the HC of compound mice (*Scrib1^{fx/fx}*, Cre⁺ or *Scrib1^{CKO}*; Fig. S4B, D, F, H). We further validated that *Scrib1* was excised in *Scrib1^{fx/fx}*, Cre⁺ cochleae (Fig. S4I). As illustrated Fig. 4, excision of *Scrib1* in HC yielded a comparable PCP phenotype to the phenotype observed in the *Scrib1^{Crc}* mutant (Fig. 4A-D), with mostly the third row of OHC affected. Quantifications show that hair bundle orientations on IHCs and OHC1 appeared normal, whereas a clear disruption was present in OHC3 (Fig. 4E-G). The orientation in OHC2 and OHC3 were not as severe as in *Scrib1^{Crc}* mice. We also analyzed the size of the cochleae, as we and others have previously reported that cochlear epithelia lacking functional PCP proteins (including Vangl2, Dvl2/3, Celsr1) were shorter and larger, probably due to convergent extension (CE) defects. *Scrib1^{Crc}* cochleae were shorter and narrower than WT cochleae (Fig. 4H, I), but we did not observe a reduction in the cochlear duct length of

Scrib1^{ckO} animals (Fig. 4H, I). These data show that *Scrib1* is required within HC for attainment of proper PCP and that it participates in CE movements during development when expressed in other epithelial cell types of the cochlear duct.

Scrib1 is required for cellular patterning and Vangl2 asymmetry

In controls from the *Scrib1*^{Crc} (Fig. 5A-B') and *Scrib1*^{ckO} (Fig. 5E-F') background, Vangl2 was asymmetrical at the junction between SC and HC and SC/SC. In *Scrib1*^{Crc} (Fig. 5C-D', stars), and *Scrib1*^{ckO} mutants (Fig. 5G-H', stars), Vangl2 asymmetrical localization at the SC/SC junction was maintained. Alternatively, Vangl2 asymmetry was completely absent from SC/HC junctions in *Scrib1*^{Crc} samples (Fig. 5C-D'), but maintained at the junction between OHC2/OPC of *Scrib1*^{ckO} mutants (5G-H', arrows). It was however absent from many OHC3/DC1 junctions (Fig. 5G-H', M,M'). We found few examples of OHC3/DC1 junctions where Vangl2 asymmetrical accumulation is maintained, and each time the orientation of the hair bundle is correct (Fig. 5M-M'', stars). In the inset, we illustrated an example, where Vangl2 asymmetry is present at the distal side of a DC1. The presence of a basal body (blue) intercalated between the membranes of the SC and the HC (star) suggests that the mislocalization of SC prevent the contact. As a result, PCP is affected in that HC.

We wondered if the loss of accumulation of the protein could be due to a defect in maturation in either HC and/or SC. To date, no clear disruption of HC maturity has been reported in PCP mutants, and it is even more difficult to assess SC maturation as few markers exist. Small molecular or anatomical disruptions may however exist. Alternatively, SCs have an apical cilium, whose position can be identified with a γ -tubulin antibody that labels the basal bodies (Tucker et al., 1998; Mogensen et al., 2000). In a WT cochlea, at birth, the basal bodies of the different SC types are aligned (Fig. 5I). We used this property to assess the pattern of SC in WT and *Scrib1* mutant cochleae. In WT OC, the basal bodies of SC were aligned and positioned regularly (Fig. 5J-K'). In *Scrib1*^{Crc} mutants, IPC and OPC basal bodies were positioned correctly for the most part (Fig. 5K-K''); however, DC1 and DC2 basal bodies appeared more affected in terms of alignment and their position with respect to the HC (Fig. 5K-K''). Notably, DC2 basal bodies were not regularly positioned by both sides of the HC. In *Scrib1*^{ckO} cochleae, IPC and OPC basal bodies were localized correctly, and DC1 basal bodies were aligned, whereas DC2 basal bodies were not regularly positioned by both

sides of the HC, similar to the *Scrib1^{Cre}* mutants (Fig.5M-M’). These data suggest that *Scrib1* in HC is not required for Vangl2 strong asymmetric localization at the junction with SC. *Scrib1* deletion from HC leads however to PCP defects in OHC3 row, which can be correlated with a disruption of cellular geometry and contacts in the most distal portion of the OC, notably in SC. These data suggest that Scrib1 participates in the transmission of a PCP signal from HC to SC, or alternatively, that SC maturation and shape is dependent on HC differentiation.

The PDZ-BM of Vangl2 is required for its basolateral localization in cochlear hair cells

We previously showed that Vangl2 and Scrib1 interact through a PDZ-BM and PDZ domains, respectively (Montcouquiol et al., 2006b). We examined the effects of a deletion of the last 12 aa of Vangl2, which effectively removed the PDZ-BM domain, on the localization of the protein. Within cells strongly expressing GFP-Vangl2, the protein is targeted basolaterally (Fig. 6A-B’), but we also observed a significant accumulation in the subcuticular region (Fig. 6B, B’, arrow). In this area, GFP-Vangl2 partially overlapped with the Trans-Golgi Network marker TGN38, which is consistent with an accumulation in the canalicular reticulum and the Golgi (data not shown)(Spicer et al., 1999). In contrast, HC transfected with a form of Vangl2 carrying the *Looptail* mutation (GFP-Vangl2^{Lp}), displayed a weak and diffuse cytoplasmic labeling (Fig. 6C-D’). This labeling is consistent with retention of the protein in the endoplasmic reticulum and its degradation. Removal of the PDZ-BM of Vangl2 led to a reduction of the basolateral membrane targeting of Vangl2 and an apical localization of the protein in the hair bundle (Fig. 3E, F’, yellow arrowhead). In cultures, the presence of Vangl2^{ΔPDZ-BM} at the membrane was so weak that it was not possible to evaluate whether the protein maintained an asymmetrical localization. In epithelial MDCK cells, a deletion of the PDZ-BM of Vangl2 also leads to a loss of Vangl2 at the membrane and to cytosolic accumulation (Fig. 6G-I).

The apical targeting of GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BM} suggests that the PDZ-BM may be a retention motif, maintaining Vangl2 to the basolateral domain, as has been shown for other molecules (Perego et al., 1999; Maday et al., 2008). Vangl2 labeling in the cochleae of *Scrib1^{Cre}* and *Scrib1^{fx/fx}*, Cre⁺ mutants did not reveal apical localization of the protein, and we

reasoned that low protein levels may prevent the observation of endogenous Vangl2 in the hair bundles. To overcome this problem, we electroporated the GFP-Vangl2 construct into the cochleae of *Scrib1*^{ckO} mutants but GFP-Vangl2 was still completely retained at the basolateral membrane of the HC (Fig. 6J, K).

Vangl2 overexpression disrupts PCP, and the PDZ-BM is essential for PCP function

During the course of our experiments, we noticed that in cells maintaining an asymmetric localization of GFP-Vangl2, the hair bundles were correctly oriented (Fig. 2D', HC1, HC3; Fig. 2E-F); however, in HC where GFP-Vangl2 was not asymmetrical, the hair bundle orientation was disrupted (Fig. 2D', HC2; Fig. 2E-F). Gain- or loss-of-function of core PCP genes has been shown to influence PCP in vertebrates (Darken et al., 2002; Jessen et al., 2002; Park and Moon, 2002). We used this property to evaluate the function of Vangl2 by measuring the angular orientation of hair bundles in individual HC that had been electroporated with various GFP-Vangl2 constructs. GFP overexpression had no impact on HC differentiation, including hair bundle orientation (Fig. 6L, Supplemental Table) when compared to untransfected HC (Fig. 6L, control). Alternatively, overexpression of full-length GFP-Vangl2 disrupted the orientation of stereocilia bundles ($60.4 \pm 7.1^\circ$), when compared to HC transfected with GFP alone (Fig. 6A-B',L). This disruption may be due to the loss of Vangl2 asymmetry or a disruption of downstream pathways, and these results show that a strict regulation of Vangl2 levels is required in HC. We did not find a significant disruption of hair bundle deviation in HC expressing GFP-Vangl2^{Lp} construct ($17.7 \pm 3.1^\circ$) (Fig. 6C-D',L). Similarly, removal of the PDZ-BM of Vangl2 led to a loss-of-function, with an average angle deviation of the hair bundles that was not statistically significant when compared to values from control cultures ($13.9 \pm 2.6^\circ$) (Fig. 6E-F',L). On the other hand, neither the deletion of the first 44 aa in the N-ter region of Vangl2 ($53.4 \pm 9.7^\circ$), nor the di-leucine motif in the C-ter (not shown) led to a significant difference with the effect of the full-length GFP-Vangl2 construct on hair bundle orientation. Finally, we also observed a loss of function of the construct when we introduced a C141A-C145A mutation ($13.2 \pm 2.5^\circ$).

Discussion

In this study, we begin to dissect the molecular functions of *Vangl2* and *Scrib1* in the mammalian cochlea. We find an unexpected strong asymmetric accumulation of Vangl2 at the distal side of the SC and a weaker accumulation on the HC side. Our results also showed that *Scrib1* expression is required cell autonomously in HC for hair bundle orientation and in SC and HC for cellular patterning and PCP signal transmission. Finally, our results show that the PDZ-BM of Vangl2 is required for its targeting/retention at the plasma membrane but that this retention is not dependant solely on Scrib1.

The distribution of Vangl2 is asymmetric in supporting cells and hair cells

We suggested originally that Vangl2 accumulation was on the proximal side of the HC and opposite to the actin-rich hair bundle, similar to its localization on hexagonal pupal wing cell in *Drosophila* (Wong and Adler 1993). Using STED microscopy and cellular biology techniques, we showed that the strong asymmetric accumulation of Vangl2 at SC/HC junctions is due to a localization of the protein on both cell sides with the strongest accumulation on the SC side. This finding emphasizes the role of the SC in PCP establishment and confirms studies suggesting the SC are molecularly asymmetric (Wang et al., 2006a; Deans et al., 2007). This localization is also consistent with our recent data demonstrating that SC in ototoxically injured avian ears retain Vangl2 asymmetry (Warchol and Montcouquiol, 2010).

Loss or maintenance of the asymmetric localization of PCP proteins in many mouse mutants has been considered to be a readout of PCP function within the HC (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006a; Qian et al., 2007; Jones et al., 2008, Etheridge et al., 2008; Ahrens et al., 2009; Wansleben et al., 2010, Song et al., 2010). Instead, our results suggest that the loss of Vangl2 asymmetry at the SC/HC junction alone is not always a reliable readout of PCP disruption within individual HC. In fact, in *Drosophila* wings, some data suggest that detectable asymmetric subcellular distributions of PCP proteins within cells are not necessary for PCP signaling (Strutt and Strutt, 2007). If SC are able to traffic Vangl2 asymmetrically, a correct cellular pattern seems important to achieve or maintain this asymmetric accumulation, since this lack of accumulation at the SC/HC junction was always correlated with a disruption of cellular organization, as assessed by the position of the basal bodies of the SC. Similarly, it

has been shown in *Drosophila* wings that cellular geometry directly affects PCP propagation (Ma et al., 2008), while PCP proteins can affect cellular patterning (Classen et al., 2005). These two functions seem to be intertwined for proteins such as Vangl2 during the development of the cochlear duct. Likely examples of the disruption of cellular patterning in the cochlea linked to a loss of Vangl2 asymmetry (e.g., in PIGA or Wnt5a mutants) can be found in the literature (Ahrens et al., 2009; Qian et al., 2007).

Vangl2 accumulation on the distal side of SC fits with the reported localization of Frizzled 3 and 6 (Fz3/6) on the proximal side of HC, i.e., opposite to Vangl2 strong expression (Wang et al., 2006b). On the other hand, the reported expression of GFP-Dvl2 and GFP-Dvl3 on the distal side of HC in transgenic animals (Wang et al., 2005, Wang et al., 2006a, Etheridge et al., 2008), are more difficult to reconcile with a model similar to the *Drosophila* (see Fig. 7). One would expect Fz and Dvl to be on the proximal side of HCs because Dvl(s) are known effectors of Fz receptors (Axelrod, 2009, Strutt and Strutt, 2009). However, Dvl(s) have also been shown to interact directly with Vangl2 C-ter in both invertebrates and vertebrates (Park and Moon, 2002; Bastock et al., 2003, Torban et al., 2004; Suriben et al., 2009). The asymmetric distal localization of Vangl2 raises the possibility of a Vangl2/Dvl pathway within HC. Limitations in detection signals prevented us from analyzing this distal asymmetric localization of Vangl2 in HCs in more detail.

Dual role of Scrib1 in the cochlear epithelium

The strong convergent extension phenotype in *Scrib1^{Cre}* animals and its absence in *Scrib1^{CKO}* animals demonstrate that a Scrib1-dependent signaling cascade in the cochlear duct controls cell movements and/or remodeling of cell-cell junctions. A loss of expression of *Scrib1* in HCs led to a PCP phenotype similar to, but milder than, the *Scrib1^{Cre}* phenotype. This cell-autonomous requirement of *Scrib1* in HC agrees with the results of a recent study in *Drosophila* that suggested that Scrib1 is an effector of Vangl2 (Courbard et al., 2009). The difference in phenotype severity between *Scrib1^{Cre}* and *Scrib1^{CKO}* mice is also consistent with the participation of SC in PCP establishment.

The mislocalization of SC basal bodies in *Scrib1^{CKO}* mutants was unexpected, and it suggests that *Scrib1* participates in the transmission of a signal from HCs to SCs or alternatively that SC maturation and shape are dependent on HC differentiation. We, and others, have not found

clear evidence of apical-basal polarity defects in HC of *Scrib1^{Crc}* or *Scrib1^{CKO}* mutants, but further analysis is required at the ultra-structural level. The differentiation of HC follows a basal-to-apical gradient and a proximal-to-distal gradient from IHC to OHC3 (Anniko, 1983), while the establishment of PCP in OHC follows this proximo-distal wave of differentiation of the epithelium (Montcouquiol et al., 2003, Driver and Kelley 2009). Almost every PCP mutant identified to date has a gradient of increasing severity in hair bundle orientation from OHC1 to OHC3. Labeling with γ -tubulin indicated that in *Scrib1* mutants a similar gradient of disruption of SC morphology/alignment exists. In the absence of definitive and specific SC markers, we cannot draw conclusions about the real impact of *Scrib1* mutations in HC or SC differentiation.

The complete loss of Vangl2 asymmetry observed in the *Scrib1^{Crc}* mutant (where the normal protein is absent in both HC and SC) is most likely a consequence of a strong disruption of cellular patterning and potentially a consequence of a partial loss of HC and/or SC polarity/maturation. In *Scrib1^{CKO}* mutants, disruption of Vangl2 asymmetry primarily affected SC/OHC3 junctions, and there was a clear correlation between the loss of Vangl2 and SC defects. Collectively, these data suggest that *Scrib1* plays a dual role as a downstream effector of the PCP pathway and as a regulator of cellular patterning.

Structure/function analysis of Vangl2 protein

We show that the PDZ-BM of GFP-Vangl2 is important for its basolateral distribution, and its PCP function when overexpressed. We could not identify the PDZ protein or adaptor mediating the basolateral retention, as it did not appear to be *Scrib1*. At least three studies have reported that the PDZ-BM of Vangl2 is not necessary for its function in vertebrates (Park and Moon, 2001, Darken and al., 2002, Goto and Keller, 2002). Goto and Keller have shown, however, that overexpression of Vangl2 inhibits CE in *Xenopus* but that eight-fold more of the construct lacking the PDZ-BM was needed to achieve the same result. These results are consistent with our data showing mislocalization and reduced effectiveness of GFP-Vangl2 ^{Δ PDZ-BM}.

In summary, our study sheds light on some molecular and cellular aspects of PCP signaling in mammalian cochlea and offers data supporting more complex molecular interactions than those initially reported. Given the great interest in the inner ear as a model to study PCP in

mammals, our results should have a strong impact on the interpretation of previous and future observations.

References

- Ahrens MJ, Li Y, Jiang H, Dudley AT. (2009) Convergent extension movements in growth plate chondrocytes require gpi-anchored cell surface proteins. *Development* 136:3463-3474.
- Anniko M. (1983) Cytodifferentiation of cochlear hair cells. *Am J Otolaryngol.* 4:375-88
- Axelrod JD. 2009 Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling. *Semin Cell Dev Biol* 20:964-971.
- Bastock R, Strutt H, Strutt D (2003) Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development* 130:3007-3014.
- Classen AK, Anderson KI, Marois E, Eaton S. (2005) Hexagonal packing of *Drosophila* wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. *Dev Cell.* 9:805-17
- Courbard JR, Djiane A, Wu J, Mlodzik M (2009) The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors. *Dev Biol* 333:67-77.
- Curtin JA, Quint E, Tshipouri V, Arkell RM, Cattanach B, et al (2003) Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear HC and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* 13:1129-1133.
- Darken RS, Scola AM, Rakeman AS, Das G, Mlodzik M, Wilson PA (2002) The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J* 21:976-985.
- Deans MR, Antic D, Suyama K, Scott MP, Axelrod JD, Goodrich LV (2007) Asymmetric distribution of *prickle-like 2* reveals an early underlying polarization of vestibular sensory epithelia in the inner ear. *J Neurosci* 27:3139-3147.
- Driver EC, Kelley MW. (2009) Specification of cell fate in the mammalian cochlea. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 87:212-21

- Courbard JR, Djiane A, Wu J, Mlodzik M. (2009) The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors. *Dev Biol* 333:67-77.
- Etheridge SL, Ray S, Li S, Hamblet NS, Lijam N, Tsang M, Greer J, Kardos N, Wang J, Sussman DJ, Chen P, Wynshaw-Boris A. (2008) Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet* 4:e1000259.
- Goto T, Keller R. (2002) The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev Biol* 247:165-181.
- Jessen JR, Topczewski J, Bingham S, Sepich DS, Marlow F, Chandrasekhar A, Solnica-Krezel L (2002) Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat Cell Biol* 4:610-615.
- Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, Petit C, Yoder BK, Chen P (2008) Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet* 40:69-67.
- Kelly MC, Chen P. (2009) Development of form and function in the mammalian cochlea. *Curr Opin Neurobiol* 19:395-401.
- Liu P, Jenkins NA and Copeland NG (2003) A Highly Efficient Recombineering-Based Method for Generating Conditional Knockout Mutations. *Genome Res* 13:476-484.
- Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M (2004) PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430:93-98.
- Ma D, Amonlirdviman K, Raffard RL, Abate A, Tomlin CJ, Axelrod JD. (2008) Cell packing influences planar cell polarity signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:18800-5
- Maday S, Anderson E, Chang HC, Shorter J, Satoh A, Sfakianos J, Fölsch H, Anderson JM, Walther Z, Mellman I (2008) A PDZ-binding motif controls basolateral targeting of syndecan-1 along the biosynthetic pathway in polarized epithelial cells. *Traffic* 9:1915-24.

- Mogensen MM, Malik A, Piel M, Bouckson-Castaing V, Bornens M. (2000) Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J Cell Sci.* 113:3013-23.
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW (2003a) Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423:173-77.
- Montcouquiol M and Kelley MW (2003b) Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci* 23:9469-9478.
- Montcouquiol M, Crenshaw EB 3rd, Kelley MW (2006a) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* 29:363-386.
- Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW (2006b) Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* 26:5265-5275.
- Montcouquiol M, Jones JM, Sans N (2008) Detection of planar polarity proteins in mammalian cochlea. *Methods Mol Biol* 468:207-19.
- Nunes FD, Lopez LN, Lin HW, Davies C, Azevedo RB, Gow A, Kachar B (2006) Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *J Cell Sci.* 119:4819-4827.
- Park M, Moon RT. (2002) The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol* 4:20-25.
- Perego C, Vanoni C, Villa A, Longhi R, Kaech SM, Fröhli E, Hajnal A, Kim SK, Pietrini G (1999) PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *EMBO J* 18:2384-2393.
- Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel KP, Dai X, Chen P (2007) Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* 306:121-133.
- Rachel RA, Wellington SJ, Warburton D, Mason CA, Beermann F (2002) A new allele of *Gli3* and a new mutation, *circletail* (*Crc*), resulting from a single transgenic experiment. *Genesis* 33:55-61.

- Sage C, Huang M, Vollrath MA, Brown MC, Hinds PW, Corey DP, Vetter DE, Chen ZY (2006) Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7345-7350.
- Saito K (1983) Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: subsurface cisternae and lamellar bodies in the Ohc. *Cell Tissue Res* 229:467-481.
- Song H, Hu J, Chen W, Elliott G, Andre P, Gao B, Yang Y. (2010) Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature*. 466:378-82.
- Souter M, Nevill G, Forge A. (1995) Postnatal development of membrane specialisations of gerbil outer hair cells. *Hear Res*. 91:43-62.
- Spicer SS, Thomopoulos GN, Schulte BA (1999) Novel membranous structures in apical and basal compartments of inner hair cells. *J Comp Neurol* 409:424-437.
- Strutt H, Strutt D (2007) Differential activities of the core planar polarity proteins during *Drosophila* wing patterning. *Developmental Biology* 302:181-194.
- Strutt H, Strutt D. Asymmetric localisation of planar polarity proteins: Mechanisms and consequences. 2009 *Semin Cell Dev Biol*. 20:957-963.
- Suriben R, Kivimäe S, Fisher DA, Moon RT, Cheyette BN (2009) Posterior malformations in *Dact1* mutant mice arise through misregulated *Vangl2* at the primitive streak. *Nat Genet* 41:977-985.
- Torban E, Wang HJ, Groulx N, Gros P (2004) Independent mutations in mouse *Vangl2* that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family. *J Biol Chem* 279:52703-2713.
- Tucker JB, Mogensen MM, Henderson CG, Doxsey SJ, Wright M, Stearns T. (1998) Nucleation and capture of large cell surface-associated microtubule arrays that are not located near centrosomes in certain cochlear epithelial cells. *J Anat*. 192 :119-130.
- Wang J, Mark S, Zhang X, Qian D, Yoo SJ, Radde-Gallwitz K, Zhang Y, Lin X, Collazo A, Wynshaw-Boris A, Chen P (2005) Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet* 37:980-985.

- Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, et al (2006a) Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development* 133:1767-1778.
- Wang Y, Guo N, Nathans J (2006b) The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neurosci* 26:2147-2156.
- Wansleeben C, Feitsma H, Montcouquiol M, Kroon C, Cuppen E, Meijlink F. Planar cell polarity defects and defective. (2010) Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development* 137:1067-1073.
- Warchol ME, Montcouquiol M (2010) Maintained Expression of the Planar Cell Polarity Molecule Vangl2 and Reformation of Hair Cell Orientation in the Regenerating Inner Ear. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2010 Feb 23.
- Wong LL, Adler PN. (1993) Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol*. 123:209-21.
- Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, Tarui H, Sasaki H (2008) Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* 15:23-36.

Supplemental Experimental Procedures

Generation of conditional *Scrib1* targeting vector. First, a retrieval vector was prepared by three-way ligation of mini-homology arms into pBlight- TK (a plasmid backbone containing the Thymidine Kinase from HSV, for counter-selection in ES cells using Gancyclovir). The homology arms were amplified from a mouse BAC containing the *Scrib1* genomic region, using the primers listed below (restriction sites are underlined). The BAC was identified by screening a 129-based BAC library (CJ7 ES cell DNA, CITB, Research Genetics) and BAC DNA was prepared using the BAC Nucleobond kit (Clontech, BD Biosciences). All primers were from Integrated DNA technologies (IDT), and all PCR reactions were done using ExpandHigh Fidelity (Roche). 5' retrieval F: aataaacggccggtcgaccttgccttctaacacctctc, 5'retrieval R: aataaaaagcttgatgggtgggcttgcca, 3'retrieval F: aataaaaagcttgccctccagcactgagaa, 3'retrieval R: aataaaggatccctaacttagatccagatggaga. Cloning sites were NotI/EagI, HindIII, and BamHI. The *Scrib1* BAC was transferred into DY380 cells, heat-shocked and electrocompetent DY380/*Scrib1* cells were electroporated with HindIII- linearized retrieval vector to sub-clone 11994 bp of genomic *Scrib1* DNA, to give rise to p*Scrib1*. For further manipulation of p*Scrib1*, two mini-targeting vectors for recombineering in E.coli were prepared essentially as described (Liu et al., 2003). The following primers were used to amplify mini-homology arms, using *Scrib1* BAC DNA as template (restriction sites are underlined). 5'F1: catgtgtcgacgctcttgctgttcattgtgg, 5'R1: gattcaggatccggtaccggctctagcatgatacca, 5'F2: gtactagaattcgcagaacctgtgtgacctg, 5'R2: catttagcggccgcacacatctagctccaccagct, 3' F1: tagcatgtcgaccattcttgcagcctgacacc, 3'R1: ctatatggatccactagtcctgagtgctaactggatga, 3'F2: taaatcgaattccgtcagggcagttgttatga, 3'R2: gaatttgcggccgcgttaacaggttctccgtgagga. 5'F1+5'R1 PCR product was digested with Sall + BamHI, 5'F2+5'R2 was digested with EcoRI + NotI, 3'F1+3'R1 with Sall and BamHI, and 3'F2+3'R2 with EcoRI +NotI. First, 5'F2+5'R2 was cloned into NotI+ EcoRI digested pBluescript to give rise to 5'MTV1 (5' mini-targeting vector 1), and 3'F2+3'R2 was cloned into NotI+ EcoRI digested pBluescript to give rise to 3'MTV1. Then, 5'F1+5'R1, Sall+EcoRI digested 5'MTV1 and a BamHI+EcoRI digested floxed neo cassette from PL452 was cloned using three-way ligation to give rise to 5'MTV2. Likewise, 3'F1+3'R1, Sall+EcoRI digested 3'MTV1 and a BamHI+EcoRI digested frt-neo-frt-loxP cassette from PL451 (Liu et al., 2003) was cloned using three-way ligation to give rise to 3'MTV2. Next, using recombineering, a floxed neo cassette was inserted upstream of *Scrib1* exon 2: a NotI+Sall digested fragment from 5'MTV2, containing the floxed neo cassette flanked by mini-homology arms, was co-electroporated with p*Scrib1* into

heat-shocked and electrocompetent DY380 cells to give rise to p*Scrib1*-5'neo. Then, p*Scrib1*-5'neo was electroporated into Cre-induced EL350 bacteria to remove the neo cassette and leave behind a single loxP site, to give rise to p*Scrib1*-5'loxP. Finally, a NotI+Sall digested fragment from 3'MTV2, containing the frt-neo cassette with a single loxP site flanked by mini-homology arms, was co-electroporated with p*Scrib1*-5'loxP into heat-shocked and electrocompetent DY380 cells to give rise to p*Scrib1*-cKO. This targeting vector contains the genomic *Scrib1* region with one loxP site and an engineered KpnI site for genotyping upstream of exon 2 and a loxP-frt-neo-frt cassette along with an engineered SpeI site for genotyping downstream of exon 8. The p*Scrib1*-cKO targeting vector was linearized using Sall and electroporated into CJ7 ES cells using standard methods. G418 and FIAU double resistant ES cell clones were selected and analyzed using Southern blot hybridization on KpnI (5') and SpeI (3') digested genomic DNA. Two independently targeted ES cell clones were injected into C57BL/6 blastocysts to produce chimaeras. *Scrib1* mutant mice were genotyped by PCR using the following primers: F-gcacactgggtatcatggcta; WT-R-gcaatctccagagccttacaga; KO-R-cccttgaaacctacatcccaa. The amplified products were 437 bp for WT band (F+ WT), 541 bp for cKO (F+ WT); 193 bp for KO (F+KO). Cre genotyping was done using the following primers: F-ttattcggatcatcagctacac; R-atctggcattctggggatt. The resultant band was 230 bp.

Antibodies. The following primary antibodies were used: rabbit anti- β COP antibody (1:1000, ABR), rabbit anti-calreticulin (1:1000, ABR), mouse anti-ZO1 antibody (1:1000, BD Biosciences), rabbit anti-Vangl2 (1:500, Montcouquiol et al., 2006b), mouse and rabbit anti- β -catenin (1:1000, Chemicon International), mouse anti-Cre (1:400, Chemicon), anti-GFP Alexa 488 (1:1000, Invitrogen), mouse anti-TGN38 (1:300, BD Biosciences), mouse anti- γ -tubulin (1:3000, Sigma), rabbit anti-S100A (1:100, Abcam). Secondary antibodies were anti-rabbit or anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 546, 647 (Invitrogen).

Quantification of hair bundle angle deviation. Measurements of angle deviation were done as reported previously (Montcouquiol et al., 2006b). Median lines were drawn across hair bundles and kinocilium site. Median line angle deviations (α) were determined using Metamorph 7.04 software (Molecular Devices). Angle deviation distribution was represented using Prism5 software (GraphPad Software, inc). Statistical significance was determined using ANOVA analysis and Tukey's Multiple Comparison test.

Figure legends

Figure 1. Vangl2 dual asymmetric localization in mammalian cochlea. (A) Schematic diagram of the various cell types composing the OC, including the inner (IHC) and outer hair cells (OHC), the inner phalangeal (IPh) and pillar cells (IPC), the outer pillar cells (OPC), and the deiter cells (DC). (B,B') Whole mount of the OC processed with antibodies specific for Vangl2 (green), β -catenin (blue), and with phalloidin staining (red). Vangl2 appears asymmetrically distributed on the proximal side (px) and the distal side (ds) of OHC2. (C) Zones of the plasma membrane along the apico-basal axis of a HC. (C,C') Z-stack images of (B) collected along the apico-basal axis. Strong Vangl2 accumulation is seen at SC/SC junction (Fig. 1C', star), but also at HC/SC junction (Fig. 1C', arrow). (E,E') Crop view of the OHC2 from (B') in a 3D fluorescence reconstruction, illustrating the proximal (px) and weaker distal (ds) localization of Vangl2. (F-H') Isosurface representation of the image in (E) illustrating Vangl2 accumulation (green) below the actin-rich ring (F'G, red), and its co-localization with β -catenin (H). (I,J) Confocal (I) and STED (J) microscopy imaging of the same proximal region of an OHC2. (K-L) Fluorescence intensities of STED image in (J) with union-jack range of colors (scale on right). (M) A linescan across a single plane from the stack in (L) shows the gap between two clusters. (N) 3D isosurface representation of (J) reveals the existence of two parallel membranes expressing Vangl2. (O,O') STED imaging of a single plane through the apical portion of two OHC reveals the distal (ds) asymmetrical localization of Vangl2 as a thinner line than the proximal (px) asymmetrical accumulation. OHC are outlined in dotted lines. Scale bars: 4 μ m in B-C'; 2 μ m in I,J; 1.5 μ m in K,L.

Figure 2. GFP-Vangl2 is trafficked asymmetrically in HC and SC. (A-B) Surface view projection (Proj XY)(A,A'), and Z-stack serie (XZ)(B) of rat cochlear cultures electroporated with different constructs (left panels), and labelled with anti-GFP antibody (green) and phalloidin (red). The empty vector expressing GFP alone fills the cytosol of transfected HC (A-B) and SC (A',B, asterisk). (C-D') Full-length GFP-Vangl2 is targeted to the plasma membrane of HC. (E-F) Cross section and linescans of the three HC in (D') (HC1,2,3) showing the different levels of GFP-Vangl2 on the proximal and distal sides of the cells. Notably, in HC2, GFP-Vangl2 is expressed strongly on both sides, disrupting the proximo-distal asymmetry. (G-H') Full-length GFP-Vangl2 is targeted distally at the membrane of a

SC. (I-J) Z-stack serie of the same image shows the basolateral plasma localization of GFP-Vangl2, and the corresponding linescan. Scale bars: 5 μ m in A-H'.

Figure 3. GFP-Vangl2^{C141A-C145A} is asymmetrically localized within HC and SC. (A) CLUSTAL W multiple sequences alignment of the first extracellular loop of Vangl2. The two cysteine residues are perfectly conserved between the different species (red). Last line: substitution of the two cysteines residues by alanine (red). (B) Western blot analysis and quantifications show that GFP-Vangl2^{Lp} or GFP-Vangl2^{C141A-C145A} expressions are reduced when compared to GFP-Vangl2. (C-C') Surface view (XY) of a rat cochlear culture, electroporated with GFP-Vangl2^{C141A-C145A} (GFP in green) and labelled with phalloidin (red). Vangl2^{C141A-C145A} is overall weakly present at the plasma membrane of OHC, with an accumulation on the proximal side of the cell in contact with a SC (dotted line), and a stronger and restricted distal accumulation. Kinocilium is indicated as a yellow dot. (D) Cross sections (XZ) as indicated in (C'). (E) Cross sections as indicated in (C'). (F,F') Vangl2^{C141A-C145A} construct is present on the distal side of two IHC, in contact with PC (dotted lines). (G,G') Cross section (XZ) as indicated in (F') showing the asymmetric localization of Vangl2^{C141A-C145A} (arrow). (H,H') Vangl2^{C141A-C145A} construct is weakly present at the plasma membrane of an SC, but asymmetrically accumulated on the distal side of the SC in contact with an adjacent OHC (dotted-line circle). (I,I') Cross section as indicated in (H'). (J,J') Vangl2^{C141A-C145A} is asymmetrically present at the plasma membrane of an electroporated SC that is not in contact with a HC. (K,K') Cross section as indicated in (J'). Scale bar = 5 μ m. (L,L') Surface view of a mouse P0 cochlea processed for Vangl2 (green) and phalloidin (red) staining. No Vangl2 asymmetry was seen on the proximal side of OHC2*, but we could still find Vangl2 asymmetric accumulation at the junction between two SC (outlined in light grey). Scale bars: 4 μ m.

Figure 4. Conditional excision of *Scrib1* in HC leads to hair bundle deviation but no convergent extension defects. (A,B) Surface views of E18.5 WT (A) and homozygote *Scrib1*^{Crc} mice cochleae (B) labelled with phalloidin (red). The second and third rows of OHC have disrupted PCP. (C,D) Surface view of E18.5 *Scrib1*^{fx/fx}, *Cre*⁻ (C) and *Scrib1*^{fx/fx}, *Cre*⁺ (D, *Scrib1*^{ckO}) mutant cochleae. The hair bundles' orientation on the third row of OHC is affected, similarly to the *Scrib1*^{Crc} mutant. (E-G) Quantification of the angle deviation of the hair

bundles of IHC, OHC1, OHC2 and OHC3 in WT (E), *Scrib1^{Crc}* (F) and *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁺* (G) animals. (H,I) Quantification of the length (H) and width (I) of the cochleae of the various mutants. In *Scrib1^{Crc}* mutant, the cochlea is shorter and larger, whereas the cochleae of *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁺* mutants were not significantly different from the WT. Scale bars: 4 μ m.

Figure 5. Scrib1 is required in HC and in SC. (A-D’) Surface views and Z-stacks of WT E18.5 (A-B’) and *Scrib1^{Crc}* (C-D’) cochleae immunostained with Vangl2 antibody (green) and phalloidin (red). Vangl2 asymmetry is present at SC/SC in both samples (arrows), but lost at SC/HC junctions in the *Scrib1^{Crc}* mutant (C-D’). In Z-stack series, Vangl2 staining appears stronger along the membranes of HC in *Scrib1^{Crc}* cochlea (D,D’) compared to WT compared to WT (B,B’). (E-H’) In *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁻* (E-F’) and *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁺* (G-H’) cochleae, Vangl2 (green) asymmetry is maintained at SC/SC junction (stars), and in most of the SC/OHC2 junctions in *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁺* (G’, arrows), but absent from SC/OHC3 junctions. In Z-stack series, Vangl2 staining appears stronger at membrane of *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁺* (F’) than in controls (H’). (I) Schematic diagram of the position of the basal bodies in HC (black dots) and SC (white dots). IPC and OPC are in blue, DC are in orange. (J-K) Cochleae immunostained with γ -tubulin antibody (green) to label basal bodies and S100A (red) to label SC. (J’,K’) The HC outlined (dotted lines) and the position of the basal bodies of SC is indicated in blue and orange dots. In WT cochlea, the basal bodies are aligned, and positioned precisely around HC. In *Scrib1^{Crc}*, the position of the basal bodies in IPC and OPC is normal for the most part, but in DC1 and DC2, the position of the basal bodies around the HC is disrupted (orange). (L-M’’) In control, all the hair bundles are aligned, Vangl2 (green) is asymmetric at every SC/HC junctions, and SC basal bodies are aligned (white, L-L’’). In *Scrib1^{fx/fx}, Cre⁺*, the hair bundles orientation in the third row OHC is affected, and some junctions are missing Vangl2 asymmetry, while some SC basal bodies are misaligned. Stars in M indicate 3 HC with clear Vangl2 asymmetry and no PCP phenotype. Inset in M shows a SC/OHC3 junction where Vangl2 asymmetry is present on the distal side of the SC, but PCP is affected in HC. Scale bar = 10 μ m.

Figure 6. The PDZ-BM of Vangl2 is necessary for basolateral retention in HC. Rat cochlear cultures electroporated with different constructs (left panels) and processed for immunocytochemistry with anti-GFP (green) and phalloidin (red). (A,A’) GFP-Vangl2 is

strongly expressed and targeted at the basolateral plasma membrane of HC. **(B,B')** Z-stack showing a strong accumulation in an intracellular compartment in the neck of the HC (arrow). **(C-D')** GFP-Vangl2^{Lp} is not present at the membrane and accumulates in the cytosol. **(E-F')** Mutations of the PDZ-BM (GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BM}) lead to a partial loss of basolateral localization of Vangl2, and an apical localization in the hair bundle **(F,F')**, yellow arrowhead). Scale bar = 5 μm. **(G,H)** In MDCK cells, GFP-Vangl2 (G) is strongly targeted at the plasma membrane whereas GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BM} (H) has lost its membrane localization and is almost entirely cytosolic. Scale bar = 20μm. ZO-1 (red) is an apical marker. **(I)** The PDZ-BM truncation reduces by 55% the presence of Vangl2 at the membrane (n = 30 cells, 3 experiments). **(J,K)** In *Scrib1*^{fx/fx}, *Cre*⁻ **(J)** and *Scrib1*^{fx/fx}, *Cre*⁺ **(K)**, GFP-Vangl2 expression was restricted to the basolateral membrane of the HC. Arrows indicate hair bundles. **(L)** Quantification of the angle of deviation (degrees) of the hair bundles of electroporated HC. Over-expression of full-length GFP-Vangl2 leads to a significant increase in angle deviation from control, a disruption that is lost when we introduced a S464N mutation in the construct (GFP-Vangl2^{Lp}), or when we removed the PDZ-BM of Vangl2 (GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BM}). The effect of GFP-Vangl2 was lost when we introduced a C141A-C145A mutation in the construct (GFP-Vangl2^{C141A-C145A}), but not when we removed the first 44 aa (GFP-Vangl2^{ΔNter}). Data represent mean +/- SEM of the angle deviation. Scale bar = 5μm.

Figure 7. Model showing the localization of PCP proteins at the surface of the organ of Corti of a newborn rat/mouse, based on this study and others. Vangl2 is located distally both in SC at the junction with HC, but also more weakly on the distal side of HC, close to the kinocilium. Fz3/6 are located on the proximal side of the HC, opposite to the strong asymmetry of Vangl2. Scrib1 is expressed in both cell types. Dvl1/3 is located distally in the HC, close to the kinocilium, in a similar zone as Vangl2. The arrows indicate the direction of the PCP signal.

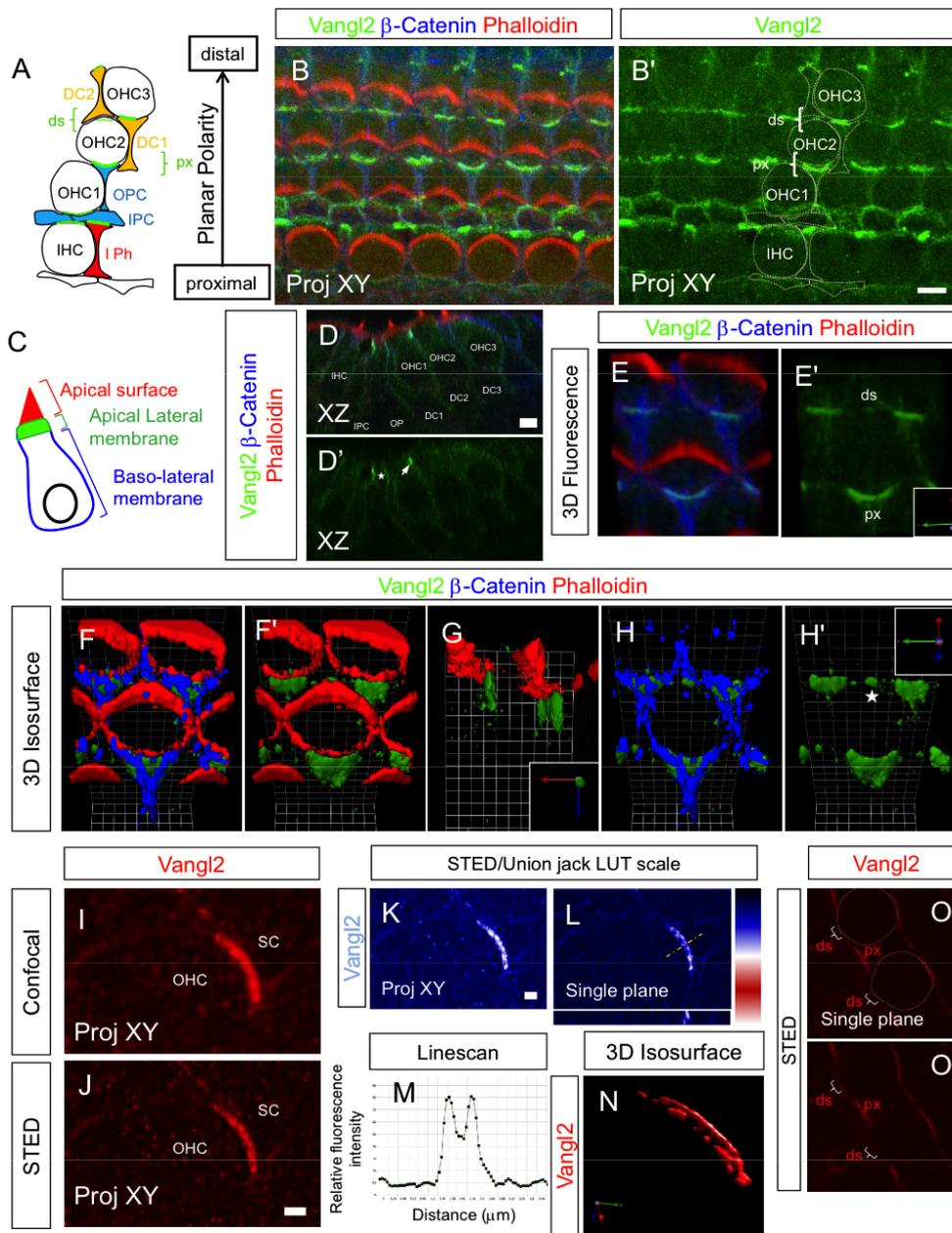
Supplemental Figure S1. Strategy for the generation of conditional *Scrib1* targeting vector. **(A)** The BAC DNA construct used for generation of a conditional allele *Scrib1* was made by recombineering technique as described. **(B)** ES cell clones were analyzed by Southern blotting KpnI (5') and SpeI (3')-digested genomic DNA.

Supplemental Figure S2. A crop of the image Fig. 1A,A', at fifteen different focal planes of 0.26 μm each, beginning below the cuticular plate.

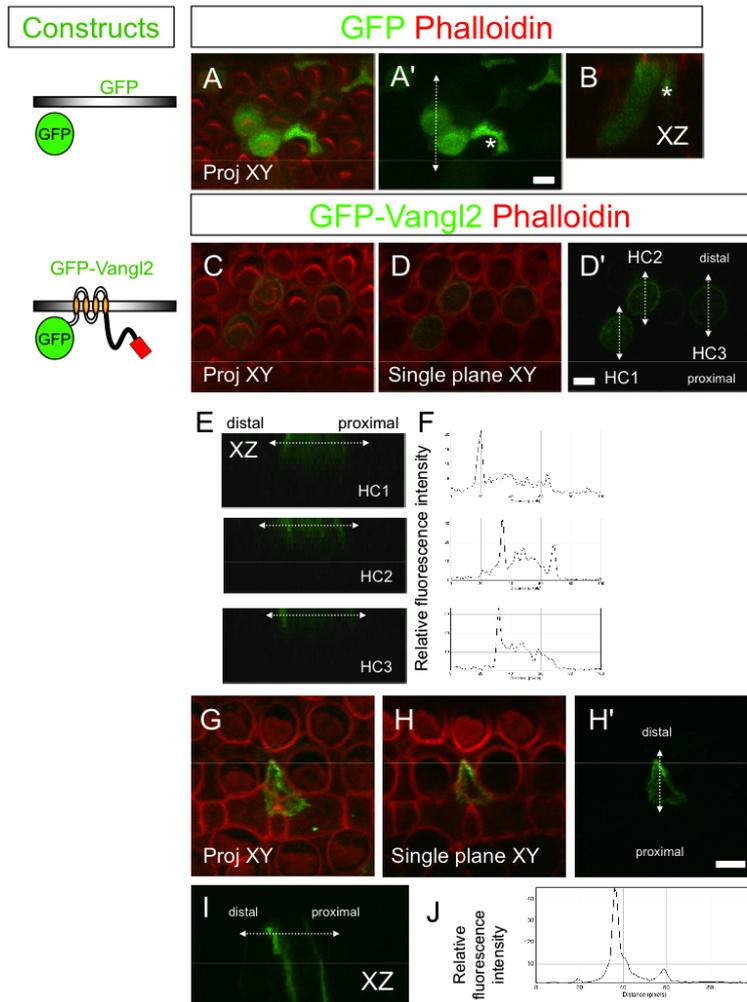
Supplemental Figure S3. Comparison of the resolution of the same Z-stack images (Fig. 1I and 1J), at nine different focal planes of 0.21 μm each, with confocal (A) and STED (B) microscopy.

Supplemental Figure S4. (A,B) Surface view of control (A) and *Scrib*^{CKO} (B) cochleae labelled with anti-Cre antibody (black). Cre recombinase is expressed in the nucleus of IHC and OHC. (C-H) Cryostat sections showing an absence of Cre recombinase expression in controls (C,E,G) and a presence in *Scrib*^{CKO} tissues (D,F,H). DAPI is in blue and phalloidin in red. (I) Genotyping of cochleae show the band corresponding to a positive excision of *Scrib1* only present in samples expressing the Cre recombinase (Cre+).

Table. **Top** average angle deviation of stereociliary bundles (in degrees) induced by overexpression of the constructs listed, with the number of cells and cochleae used for the quantification of each construct. **Bottom** statistical comparison of the means of the various constructs with the ANOVA one way analysis.



Giese et al. Figure 1



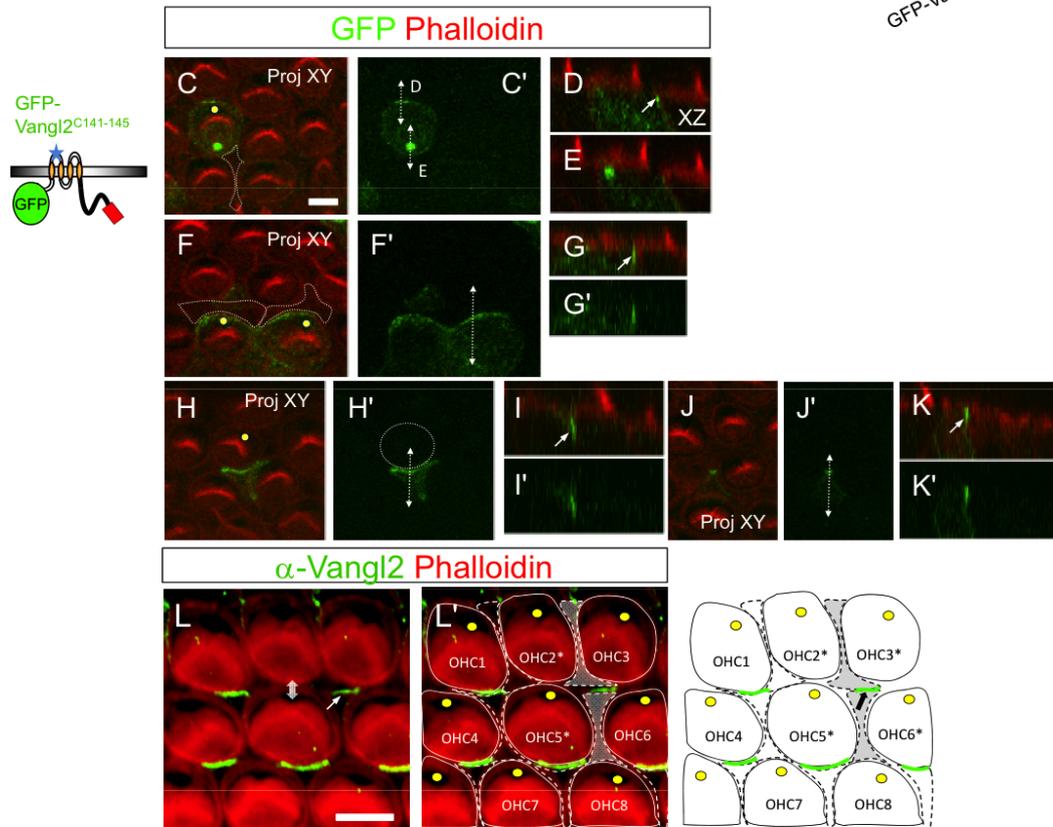
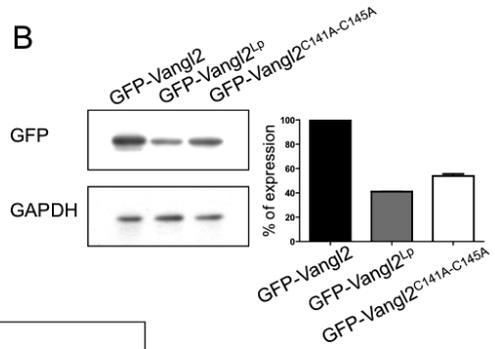
Giese et al. Figure 2

A CLUSTAL multiple sequence alignment

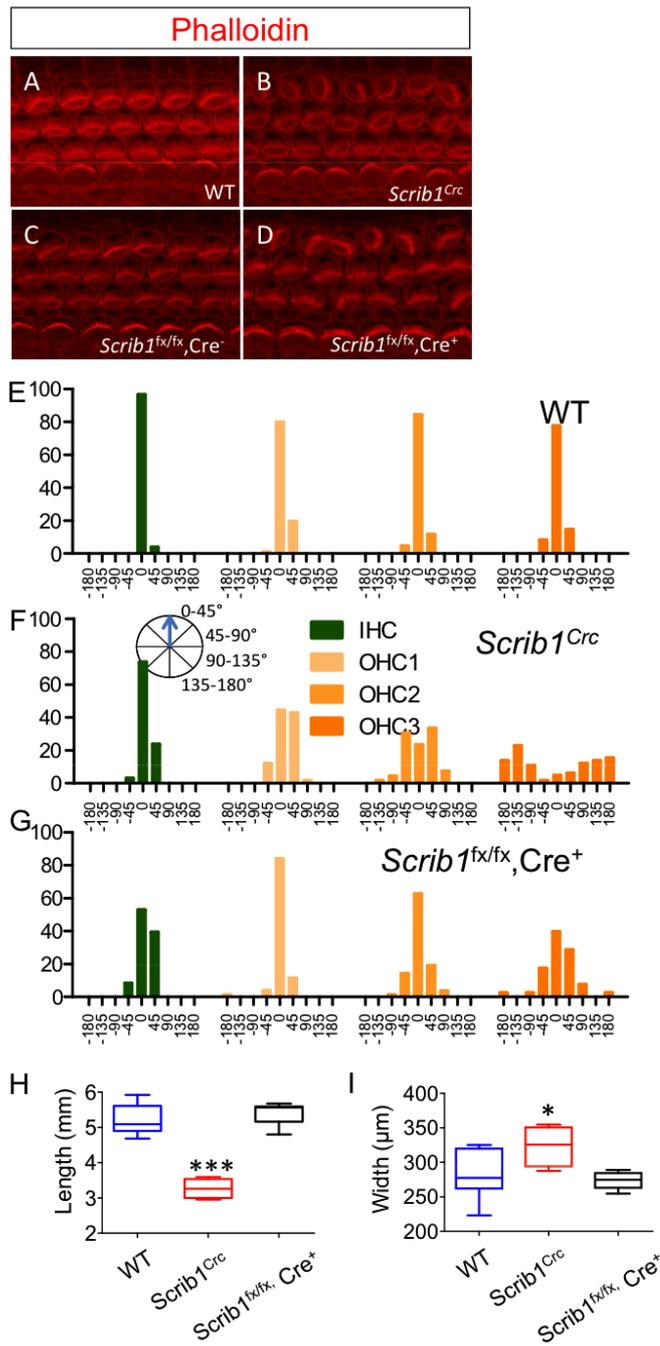
```

Rattus Norvegicus P84889 130-PLLWREELEPCGTACEG-147
Mus Musculus Q91ZD4 130-PLLWREELEPCGTACEG-147
Homo Sapiens Q9ULK5 130-PLLWREELEPCGTACEG-147
Danio Rerio Q8UVJ6 130-PQLLWRDSLEPCGTFCEG-147
Xenopus Laevis Q90Z05 130-PQILWREDLEQCGTACEG-147
Vangl2C141A-C145A 130-PLLWREELEPAGTAARG-147
    
```

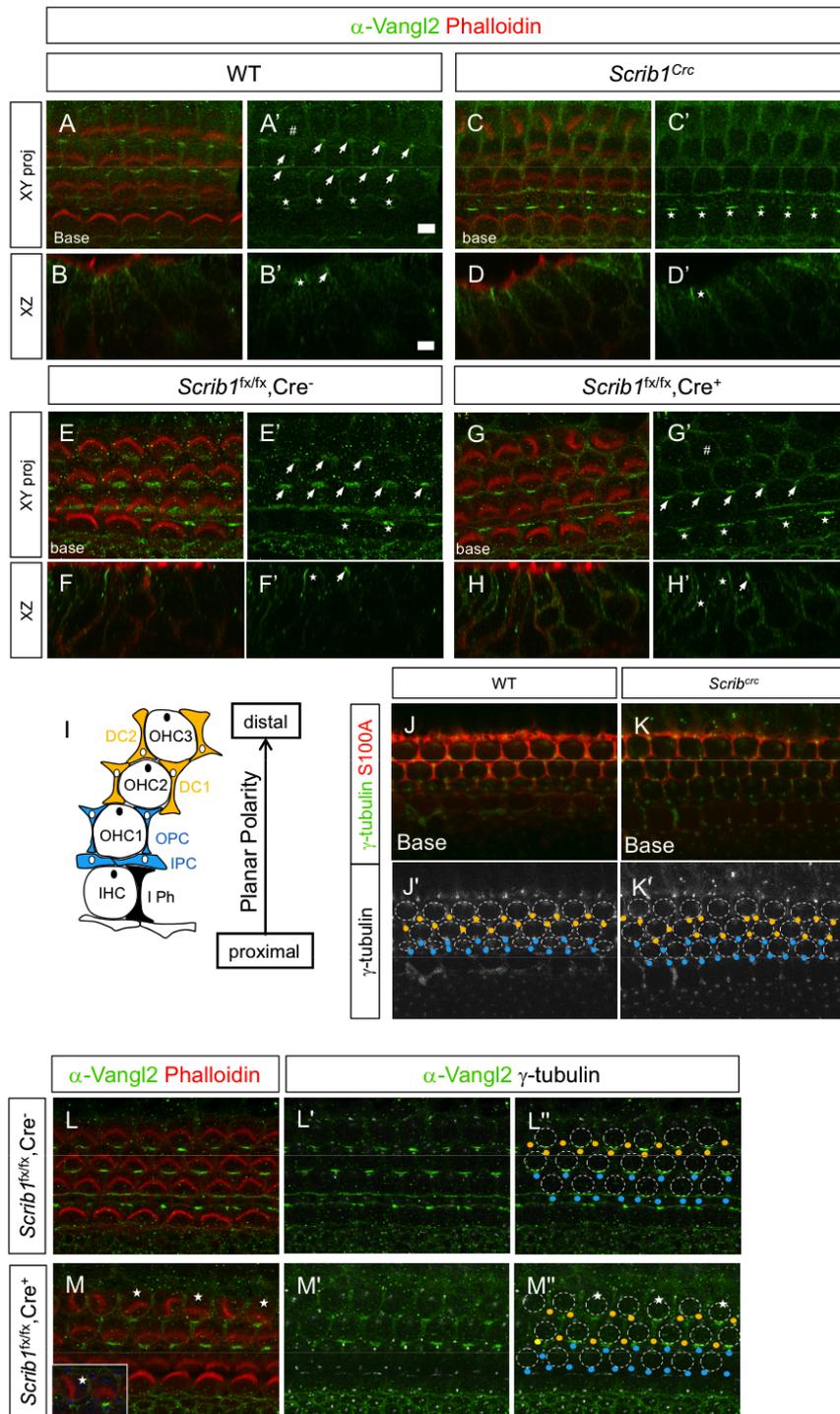
B



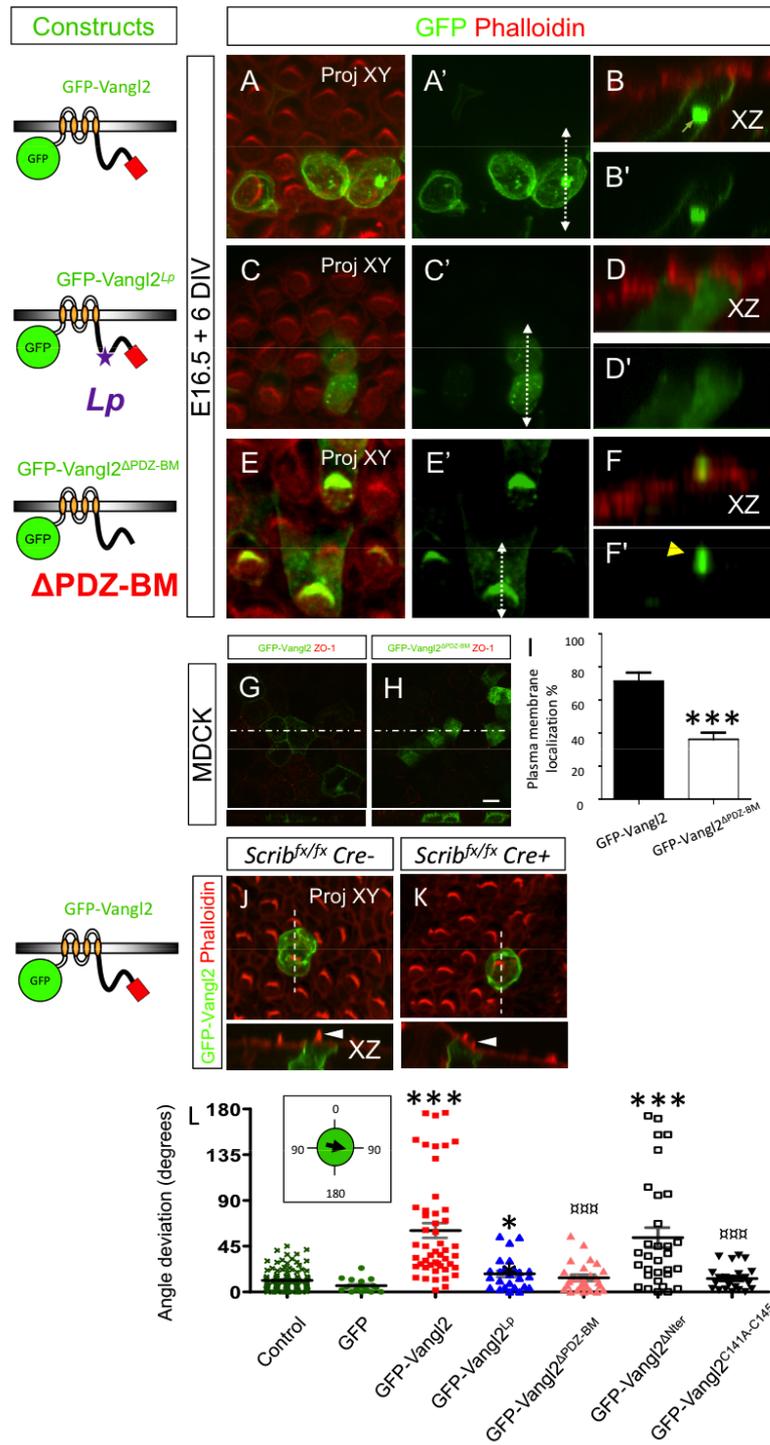
Giese et al. Figure 3



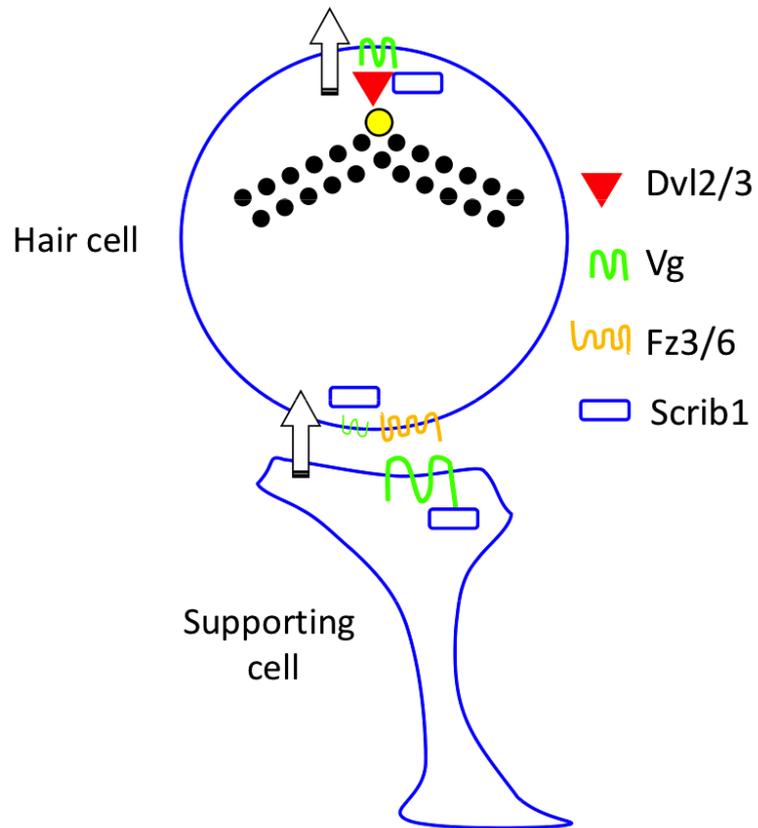
Giese et al. Figure 4



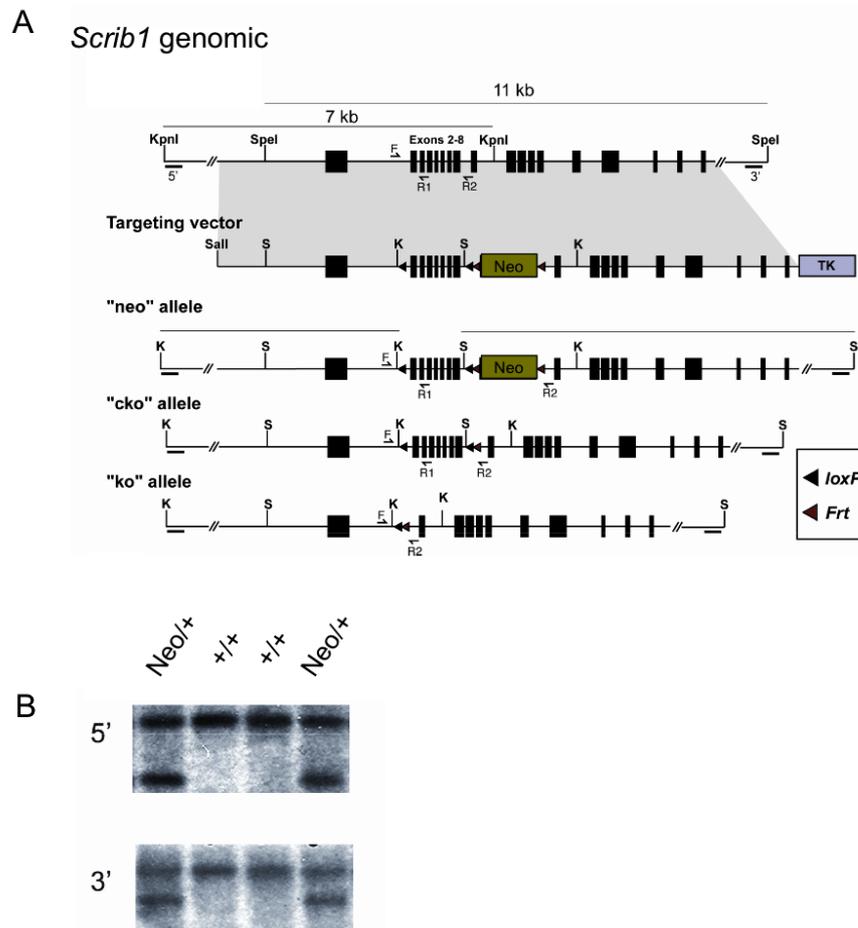
Giese et al. Figure 5

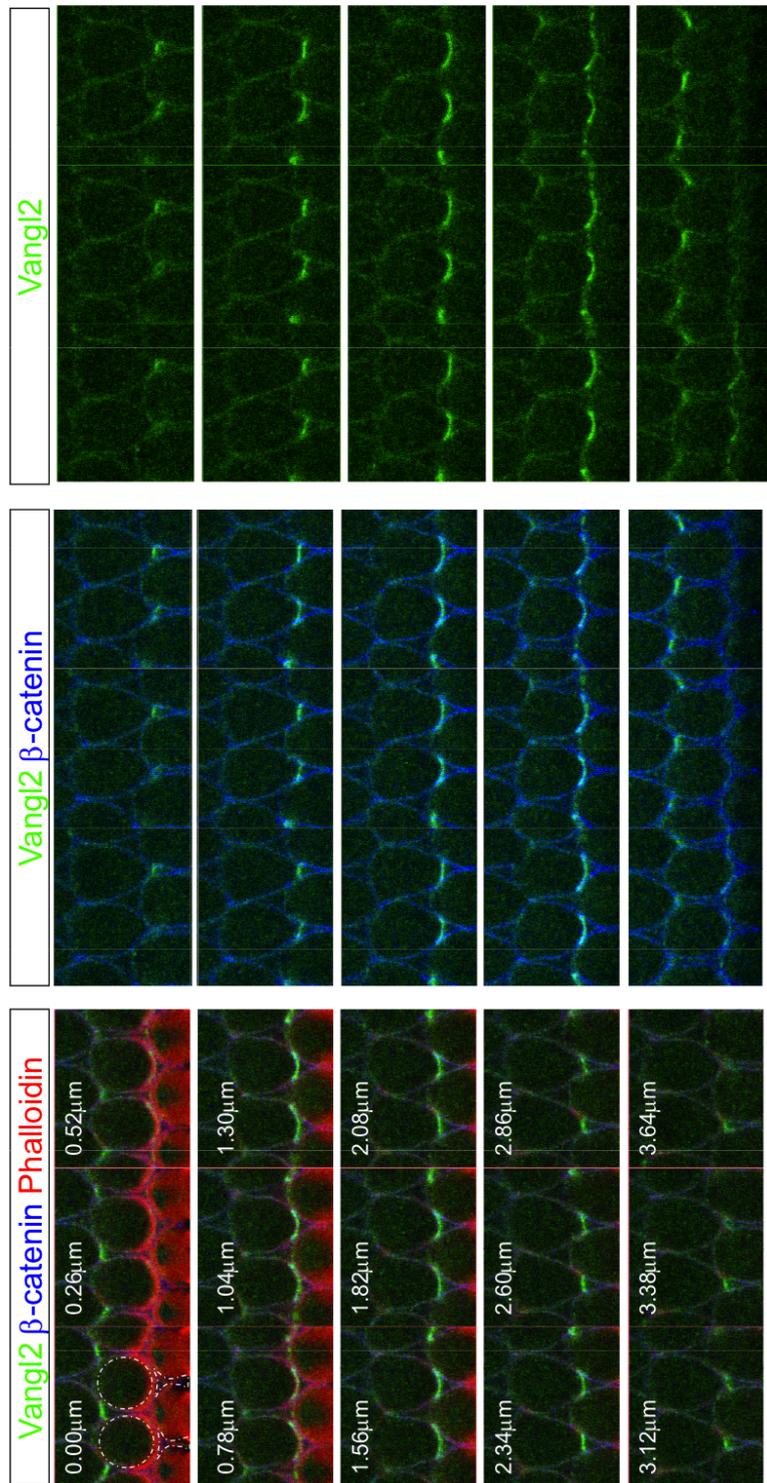


Giese et al. Figure 6

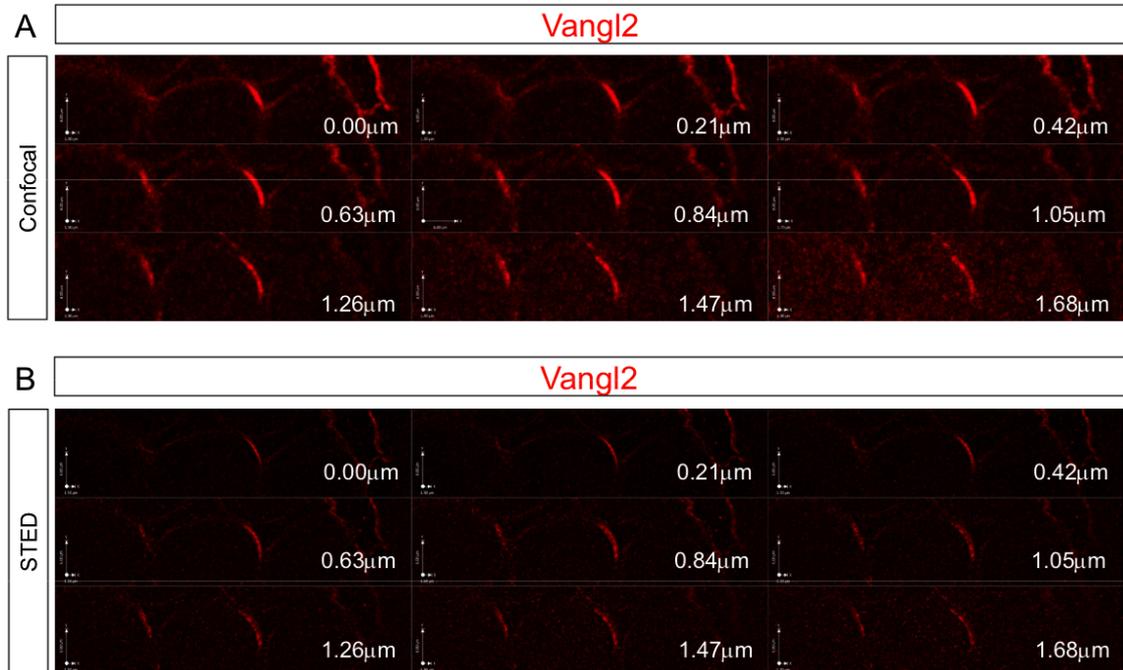


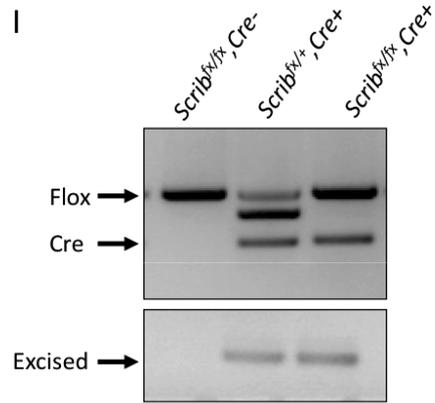
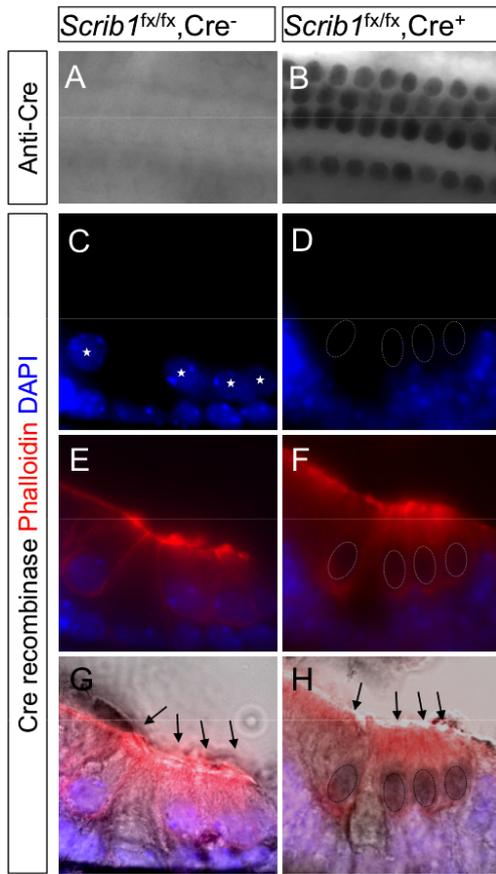
Giese et al. Figure 7





Giese et al. Supplemental 2





Table

Construct	Mean (degrees)	Number of cells/Number of cochleae
Control	11.29 ± 1.02	108/10
GFP	6.15 ± 1.56	17/4
GFP-Vangl2	60.44 ± 7.17	49/9
GFP-Vangl2 ^{Lp}	17.78 ± 3.13	25/4
GFP-Vangl2 ^{Δ12}	13.91 ± 2.66	28/7
GFP-Vangl2 ^{ΔNter}	53.46 ± 9.76	31/4
GFP-Vangl2 ^{C141A-C145A}	13.20 ± 2.51	22/6

One-way analysis of variance	P Value
Control vs GFP	ns
Control vs GFP-Vangl2	***
Control vs GFP-Vangl2 ^{Lp}	ns
Control vs GFP-Vangl2 ^{ΔPDZ-BM}	ns
Control vs GFP-Vangl2 ^{ΔNter}	***
Control versus GFP-Vangl2 ^{C141A-C145A}	ns
GFP vs GFP-Vangl2	***
GFP vs GFP-Vangl2 ^{Lp}	ns
GFP vs GFP-Vangl2 ^{ΔPDZ-BM}	ns
GFP vs GFP-Vangl2 ^{ΔNter}	***
GFP versus GFP-Vangl2 ^{C141A-C145A}	ns
GFP-Vangl2 vs GFP-Vangl2 ^{Lp}	ααα
GFP-Vangl2 vs GFP-Vangl2 ^{ΔPDZ-BM}	ααα
GFP-Vangl2 vs GFP-Vangl2 ^{ΔNter}	ns
GFP-Vangl2 versus GFP-Vangl2 ^{C141A-C145A}	***

ns p>=0,05 ; *,α p<0,05 ; **, αα p<0,01 ; ***, ααα p<0,001

5.2 Analyse du rôle de GIPC1 dans la régulation, dans l'organe de Corti, de la polarité planaire et du trafic intracellulaire de Vangl2

5.2.1 Objectifs

Comme précisés en introduction, à l'heure actuelle, peu de partenaires de Vangl2 sont connus. Il nous a donc paru important d'identifier de nouvelles protéines régulant la localisation subcellulaire de Vangl2, ainsi que les protéines participant à sa voie de signalisation. L'identification de ces nouveaux partenaires pourrait améliorer la compréhension de la fonction de Vangl2. Nous avons ainsi effectué un crible double hybride en utilisant l'extrémité C-terminale de Vangl2 comme protéine-appât, ainsi qu'une banque d'ADNc **embryonnaire cochléaire de souris**, pour identifier d'éventuelles protéines proies.

La partie C-terminale de Vangl2 comprise entre les acides aminés 438 à 521 nous est apparue comme la protéine-appât la plus intéressante. En effet, il s'agit de la partie protéique contenant plusieurs motifs, à savoir :

- Un PDZ-Binding Domain
- Un motif double leucine pouvant participer à un adressage baso-latéral de la protéine.
- Un site potentiel de phosphorylation en position 464. Ce site correspond au site muté chez la souris Loop-tail.

5.2.2 Résultats

5.2.2.1 Identification de GIPC1 comme nouvel interacteur

L'analyse des partenaires de Vangl2 en crible double-hybride a permis d'isoler 65 clones dont 13 correspondent à une protéine connue sous le nom de GIPC1.

GIPC1 possède un domaine PDZ et est essentiellement tourné vers une fonction d'adressage à la membrane et de recyclage de récepteurs membranaires grâce à des liaisons PDZ/PDZ-BD. Nous voulons donc caractériser l'interaction Vangl2/GIPC1 et déterminer la fonction de cette interaction dans la régulation de Vangl2 et de la PCP au niveau de l'oreille interne.

5.2.2.2 Vangl2 et GIPC1 interagissent

L'interaction Vangl2/GIPC1 a été confirmée par essai double hybride et GST pulldown. Nous avons généré différentes constructions codant pour les parties N-terminale, C-terminale et centrale (PDZ) de GIPC1. Nous avons ainsi pu démontrer que l'interaction Vangl2/GIPC1 met en jeu le domaine PDZ de GIPC1. La délétion du PDZ-BD de Vangl2 (Vangl2^{ΔPDZ-BD}) est suffisante pour abolir cette interaction.

5.2.2.3 GIPC1 est impliqué dans la régulation de Vangl2 et forme des complexes

Nous avons généré différentes constructions codant pour les protéines Vangl2 et GIPC1 afin d'analyser le rôle de GIPC1 sur la régulation de Vangl2 dans des lignées cellulaires. Nous avons pu ainsi déterminer que Vangl2 était capable de former des accumulations membranaires avec GIPC1 sous la dépendance d'une interaction PDZ/PDZ-BD. Nous avons également montré que GIPC1 était capable d'augmenter la localisation de Vangl2 au niveau de vésicules d'endocytose clathrine-dépendantes et d'endosomes précoces, suggérant un éventuel rôle de GIPC1 dans l'internalisation de Vangl2 ou dans son trafic intracellulaire.

5.2.2.4 Analyse du rôle fonctionnel de GIPC1 dans l'organe de Corti

Une analyse par immunohistochimie dans l'organe de Corti révèle une localisation asymétrique de GIPC1, compatible avec une régulation de la localisation asymétrique de Vangl2.

Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle GIPC1 pourrait réguler le trafic intracellulaire de Vangl2, nous avons donc analysé des cochlées de souris GIPC1 KO. Ces souris mutantes ne présentent aucune perturbation dans l'organe de Corti au niveau de l'organisation des touffes ciliaires. Ceci est en concordance avec l'identification du rôle récent de GIPC1 dans la PCP chez la drosophile. Cette absence de phénotype peut s'expliquer par une compensation de la perte de fonction de GIPC1 par les autres membres de la famille GIPC, à savoir GIPC2 et GIPC3, ou par une redondance fonctionnelle autre. L'expression de GIPC2 et GIPC3 a pu être confirmée par RT-PCR sur épithéliums cochléaires de souris.

Afin d'abolir cette compensation fonctionnelle, des shRNAs dirigés contre la famille GIPC ont été électroporés dans des épithéliums cochléaires *in vitro*, technique originale du laboratoire, et *in utero* grâce à une collaboration avec John Brigande (Oregon Hearing Research Center). Cette technique d'électroporation *in vivo* est tout à fait originale, et à ce jour, il s'agit de la première électroporation de shRNAs réalisée dans l'organe de Corti. Les constructions nécessaires à cette technique ont été réalisées au sein du laboratoire.

Un immuno-marquage dirigé contre GIPC et réalisé dans des épithéliums électroporés montre une absence totale d'expression dans les cellules exprimant les shRNAs GIPC, ce qui suggère que les trois protéines de la famille GIPC sont affectées.

Les cellules ciliées électroporées *in vitro* présentent une anomalie majeure dans la formation des stéréocils d'actine, proche du phénotype observé chez des souris Snell's Waltzer mutantes pour la Myosine VI (MyoVI) (Avraham et al, 1995). Ce phénotype est d'autant plus intéressant que GIPC1 et la MyoVI forment un complexe participant à l'endocytose dans divers types cellulaires (Hasson, 2003).

Nous avons alors formulé une nouvelle hypothèse selon laquelle le complexe GIPC/MyoVI serait susceptible de réguler l'asymétrie de Vangl2 au sein de l'épithélium

cochléaire. Des expérimentations *in vitro* ont pu démontrer que Vangl2, GIPC1 et MyoVI formaient un complexe. Une analyse de la formation de ces complexes en time-lapse a pu mettre en évidence que ces complexes étaient stables au niveau des membranes. Le rôle du complexe GIPC1/MyoVI a enfin été analysé par des expérimentations basées sur la biotinylation des protéines membranaires et a pu mettre en évidence le rôle du complexe GIPC1/MyoVI sur la régulation de Vangl2 à la surface de la membrane plasmique.

Les électroporations *in utero* montrent que les cellules n'exprimant plus GIPC présentent un phénotype PCP, c'est-à-dire, une perturbation de l'orientation de la touffe ciliaire selon l'axe proximo-distal de la cochlée, suggérant un rôle plus direct de GIPC dans la régulation de la polarité planaire au sein de l'épithélium cochléaire.

Publication n°2 : GIPC1 has a dual role in Vangl2 trafficking and hair bundle integrity

Arnaud Giese^{1,2}, Claire Mazzocco¹, Elodie Richard¹, Matthew W. Kelley³, John Brigande*⁵, Nathalie Sans*^{4,2}, Mireille Montcouquiol^{1,2}

1. INSERM U862, Neurocentre Magendie, Planar Polarity and Plasticity group, Bordeaux, France. 2. University of Bordeaux, France. 3. NIDCD, NIH, Bethesda, Maryland 22000, USA. 4. INSERM U862, Neurocentre Magendie, Cellular and Molecular Neurobiology, Bordeaux Cedex, France. 5. Oregon Health and Science University, Oregon, USA.

* equal contribution

Corresponding author: Mireille Montcouquiol, Neurocentre Magendie, INSERM-U862, Planar Polarity and Plasticity group, University Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, F-33077 BORDEAUX, France E-mail: mireille.montcouquiol@inserm.fr Tel: +33 5 5757 3762. Fax: +33 5 5757 3752

Running Title: GIPC role in inner ear.

Keywords: Inner ear; traffic; Cochlea; Van Gogh-like 2; GIPC; Myosin VI

Acknowledgements. The authors wish to thank all the members of the lab. for comments on the manuscript. We also thank Dr Nathalie Aubailly and the entire team of the animal facility for excellent technical assistance, and the team of Bordeaux Imaging Center. We thank Ulf Schwarz from Leica Microsystems, Germany, for his help in STED microscopy images acquisition. This research was supported by INSERM AVENIR grant to M.M. and N.S., Conseil Regional d'Aquitaine (MM, NS), La Fondation pour la Recherche Medicale (MM, NS), ANR-08-MNPS-040-01(MM), ANR-07-NEUR-031-01 (NS), Aquitaine-INSERM Fellowship (AG), IRG Marie-Curie action (MM) and the European Commission Coordination Action ENINET (contract number LSHM-CT-2005-19063; NS & MM).

Manuscript information:

7 figures, 6 supplemental figures

33 text pages

Abstract: 177 words; Introduction: 279; Discussion: 1,332

Abstract

To identify potential interactors for Vangl2, we performed a yeast two-hybrid screening of a cochlear cDNA library with the C-terminal tail of the protein. Here, we show that the last 12 aa of Vangl2 interact with the central PDZ domain the protein Regulator of G-protein signaling-GAIP-interacting protein COOH terminus (GIPC1). In rat and mouse cochlear epithelia, GIPC1 is strongly expressed at the pericuticular necklace of hair cells, a zone of intense trafficking, as well as in supporting cells. Downregulation of GIPC1 in hair cells using shRNA *in vitro* and *in vivo* leads to a disruption of the stereociliary bundle integrity and an impairment of hair cell differentiation. We also show that GIPC1 co-localize with Vangl2 in endosomal clusters, and that myosin VI relocalize these clusters, which suggest a role for GIPC1 in the endocytosis of Vangl2. Taken together, our data suggest that GIPC1 plays a dual role in hair cells: as an early and important regulator of hair cell differentiation, hair bundle growth and integrity, and as a protein participating in the regulation of Vangl2 trafficking.

Introduction

In mammals, core Planar Cell Polarity (PCP) proteins such as Van Gogh-like 2 (Vangl2), dishevelled 1/2/3 (Dvl1/2/3), prickle 2 (Pk2) or Frizzled 3/6 (Fz3/6) or cadherin, EGF-like, LAG-like, seven pass receptor 1 (Celsr1) show polarized membrane association in epithelia, at the boundaries between two cells (Montcouquiol et al., 2006; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2005; Wang et al., 2006b; Etheridge et al., 2008; Deans et al., 2007). This asymmetric localization is best characterized in the sensory epithelium of the cochlea, or organ of Corti. The organ of Corti is comprised of multiple cell types, including hair cells (HC) and non-sensory supporting cells (SC), preventing HC from touching one another. Each HC is topped by a hair bundle of actin-rich stereocilia that are organized around a single microtubule-based kinocilium. All the hair bundles in a given organ of Corti are pointing uniformly in the same direction, defining the PCP axis. We found previously that Vangl2 was strongly asymmetrically expressed at the junction between SC and HC (Montcouquiol et al., 2006). When a core PCP gene is mutated, hair bundles orientation is disrupted, as well as the asymmetric distribution. The molecular mechanisms controlling PCP protein asymmetric distribution, as well as the exact role of this distribution are still largely unknown and therefore of great interest.

In this study, we identified GIPC1 (GAIP-interacting protein, C terminus; also known as SEMCAP-1, GLUT1CBP, TIP-2, synectin, NIP-1) (Bunn et al., 1999; Cai and Reed, 1999; DeVries et al., 1998; Gao et al., 2000; Rousset et al., 1998; Wang et al., 1999) as a new interactor for Vangl2. We show that GIPC1 is expressed in HC and SC, and participate both in Vangl2 trafficking and hair cell maturation.

Results

Vangl2 and GIPC1 interact

We searched for potential interacting partners of Vangl2, using the C-terminal portion of Vangl2 as bait (Vangl2 C-ter, aa 438-521) to screen an embryonic cochlear library (Fig. 1A). This bait included the last 4 aa (-ETSV) that encode for the PDZ-binding motif (PDZ-BM). Thirteen of the 63 clones identified as interacting with Vangl2 encoded a portion of the gene GIPC1. GIPC1 is a cytosolic protein with a N-terminal (N-ter) proline rich domain (PRD), a central type II class of PDZ domains, and a C-ter acyl carrier protein (ACP) domain (Fig. 1B). We confirmed the interaction using a yeast two-hybrid assay on two of the thirteen clones, GIPC1^{C1} and GIPC1^{C15}. Yeast hosting both GIPC1^{C1} or GIPC1^{C15} and Vangl2 C-ter were able to grow on four drop-out plates (-Trp, -Leu, -Ade, -His)(Fig. 1C). Deletion of the PDZ-BM (Vangl2^{Δ4}), strongly reduces the interaction with GIPC1 in the yeast two-hybrid assay, and further deletion in the C-ter of Vangl2 (Vangl2^{Δ12}) completely inhibits yeast growth (Fig.1C). These results suggest that Vangl2 PDZ-BM binds to GIPC1 but that at least 8 aa upstream the PDZ-BM also participates in the interaction. The previously characterized interaction between Scribble1 (Scrib1) and Vangl2 was used as a positive control. Further assays showed that the central PDZ domain of GIPC1 interacted with Vangl2, while the PRD and ACP domains did not (Fig. 1D). These data were confirmed with an *in vitro* pull-down assay, showing that the C-ter domain of Vangl2, corresponding to the yeast-2-hybrid bait, interacted with GIPC1 but the removal of the last 4 or 12 aa of Vangl2 strongly reduced this interaction (Fig. 1E,F). Reciprocally, a mutation in the central PDZ domain of GIPC1 (GIPC1^{PDZdead}) abolished the interaction with Vangl2, confirming the specificity of the interaction (Fig. 1G).

To assess the subcellular localization of GIPC1, we analyzed surface views of whole mount preparations of P1 rat cochleae immunostained for GIPC1. These samples allow a clear analysis of the reticular lamina, which is the surface layer of the organ of Corti (OC) that is formed by the apical parts of the mosaic of HC and SC (Fig. 1H). The mammalian OC is comprised of a single row of Ihc, three rows of Ohc (Ohc1, 2 and 3), and several types of interdigitating non-sensory SC, including inner phalangeal cells (IPh), inner and outer pillar cells (IPC, OPC), and Deiter cells (DC) (Fig. 1H). A set of actin-rich stereocilia that form a

hair bundle is present on the luminal surface of each HC, and the stereocilia are orientated within the plane of the epithelium, which defines the PCP (Fig. 1J,I). This orientation is best defined in the basal turns of the cochlea around birth, when every cell type has sufficiently matured. We used two previously characterized GIPC1 antibodies to label P1 rat cochleae (De Vries et al., 1998; Dance et al., 2004). In the cochlear epithelium, at birth, GIPC1 is enriched around the cuticular plate of Ihc and Ohc, in a region of intense traffic called the pericuticular necklace (Fig. 1J,J') (Hasson et al., 1997, Kachar et al., 1997). Cross sections showed that this strong accumulation is mainly restricted to an apico-lateral domain in the HC (Fig. 1K,K'). We noticed that there was a preferential accumulation of clusters of GIPC1 on the proximal side of the HC (Fig. 1J', arrows). GIPC1 was also present in the cytosol of HC and SC in puncta or clusters (bracket). On the other hand, Vangl2 strongly accumulates at cell-cell junctions (Fig. 1I,I'), including SC/HC junctions, specifically in the second and third Ohc rows (Fig. 1I'). Altogether, these results show that Vangl2 and GIPC1 interact, and suggest that GIPC1 could regulate Vangl2 traffic in HC.

GIPC1/synectin mutant have no phenotype

To assess the effect of a mutation of GIPC1 in the inner ear, we analysed the OC of synectin/GIPC1 null mice (Chittenden et al, 2006). The cochleae of synectin/GIPC1 knockout (KO) mice displayed no obvious PCP or HC fate defects (Fig.2A,B). Unexpectedly, immunostaining with GIPC1 antibody revealed a positive expression of the protein in the cochleae of these mutants (Fig.2C,D). These results suggest that functional or genetic compensation occurs. Consistent with this hypothesis, RT-PCR for GIPC2 and GIPC3 showed that all three members of the GIPC family were expressed in E18.5 pure cochlear epithelium (Fig.2E). Moreover, both our antibodies recognized GIPC1, GIPC2 and GIPC3 proteins (Fig.2F). These results suggest that in the cochleae of synectin mutants, GIPC1 loss of expression is compensated by GIPC2 and/or GIPC3.

GIPC1 and Vangl2 are present in endocytic vesicles

GIPC1 has been reported to associate with newly internalized membrane vesicles, and is known to control surface expression of many transmembrane proteins through interaction with their C-ter. Its localization in zones of intense traffic in HC suggests that GIPC could be

involved in endocytic trafficking of proteins, such as Vangl2. We looked for the presence of Vangl2 in endocytic vesicles in COS-7 cells, using two different markers of endocytic compartments: an antibody for the early endosomal antigen 1 (EEA1), a classical marker of early endosomes and Alexa 568-conjugated transferrin that is endocytosed by live cells (see Methods, Fig.3A, S1). Results showed that Vangl2 was present in $58.5 \pm 3\%$ EEA1-positive vesicles (Fig. 3B) and $56 \pm 4\%$ of transferrin-positive vesicles (Fig. 3C). Vangl2 presence in endocytic vesicles was significantly reduced when the PDZ-BM of Vangl2 was removed (55.7% reduction $\pm 3\%$ for EEA1 vesicles, and 64% for transferrin vesicles) (Fig. 3B,C). Co-transfection of GIPC1 in cells expressing Vangl2 lead to significant increase of Vangl2 localization in EEA1-positive ($18\% \pm x\%$ increase) vesicles (Fig. 3B,C). This increase in presence of GIPC1 persisted when the PDZ-BM was removed from Vangl2, and existed also for co-localization with transferrin (58% increase). Our data show that GIPC1 increases Vangl2 co-localization in endocytic vesicles. Since transferrin is known to recycle back to the surface of the plasma membrane of a cell, some of the transferrin-positive vesicles quantified after 10-min treatment could be recycling vesicles. We therefore carried out another experiment, reducing the exposure of the cells to fluorescent transferrin to a short pulse of 3 min, labeling only the early endocytic vesicles. Our data show that in these conditions, 20% of Vangl2 vesicles co-localize with transferrin, and the addition of GIPC1 strongly increased that co-localization by 50% (Fig. 3D). Similar to the longer transferrin treatment, removal of the PDZ-BM significantly reduced the localization of Vangl2 in endocytic vesicles, but some of that decrease was rescued by co-expression of GIPC1. These data show that Vangl2 presence in endocytic vesicles increases when GIPC1 is present.

GIPC1 and myosin VI from a protein complex with Vangl2

MyoVI is a well-characterized interactor of GIPC1 and can bind to nascent endocytic vesicles to transport them along actin filament away from the periphery of the cell (Buss et al 2002, Achenbrenner et al 2003; Hasson et al., 1997). We hypothesized that GIPC1 could bind to Vangl2 and clusterize the protein, and then bind to MyoVI to eventually endocytose the complex. To verify this, we co-expressed Vangl2 with either MyoVI or GIPC1 in COS-7 cells. Vangl2 co-expression with MyoVI leads to little co-localization, except in a perinuclear region. The proteins were otherwise evenly distributed in the cytosol and some at the

membrane (Fig. 3E-F). When GIPC was co-expressed with Vangl2, the proteins co-localized in vesicles, clusters and at the membrane (Fig. 3G-H). Co-expression of GIPC/Vangl2/MyoVI leads to a striking re-localization of the GIPC1/Vangl2 clusters, and a near complete co-localization of the three proteins in clusters (Fig. 3I-J). The colocalization of GIPC/Vangl2/MyoVI in clusters are dependent on a functional PDZ/PDZ-BM interaction, as a mutation in the central PDZ domain of GIPC1 inhibits clusters formation (Fig. 3K-K’’’). We treated COS-7 cells transfected with GIPC/Vangl2/MyoVI for 3-min with fluorescent transferrin, as before. Results show a strong co-localization of the peripheral clusters with transferrin, suggesting that they are of endocytic nature for the most part (Fig.5L-L’’’) (Aschenbrenner et al, 2003).

If the clusters formed by GIPC/Vangl2/MyoVI represent an early endocytic event, their co-expression in cells should modify the levels of Vangl2 at the plasma membrane. We raised an antibody specific for the extracellular loops of Vangl2 . Unfortunately, this antibody did not work in surface assays. Immunocytochemistry on HEK293 confirmed what we observed in COS-7, with a strong co-localization of Vangl2/MyoVI/GIPC1. The co-localization of GIPC1 and Vangl2 was lost when the PDZ domain of GIPC1 was mutated (GIPC1PDZ^{dead}), but MyoVI was still present in these clusters, confirming that the two proteins had different binding sites (data not shown).

These results suggest that MyoVI, through binding with GIPC1, could clusterize Vangl2 present at the plasma membrane, and that MyoVI /Vangl2/GIPC1 are part of a protein complex which could participates in the endocytosis of Vangl2 to remove it from the plasma membrane.

Myosin VI participate in Vangl2 trafficking

MyoVI is strongly expressed in HC, and enriched at the pericuticular necklace (Hasson et al., 1997; Aschenbrenner et al., 2004). If MyoVI participates in Vangl2 endocytosis, we would expect Vangl2 levels to be higher at the plasma membrane of MyoVI mutants, because of a reduction of endocytosis. We looked at the localization of Vangl2 in the cochlea of *snell's waltzer (sv)* mutants, a mutant with an intragenic deletion leading to an absence of detectable MyoVI protein in homozygotes (Self et al., 1999). Consistent with our hypothesis, Vangl2 asymmetric localization was not lost in *sv/sv* cochlea (Fig. 4B-C’’), and

when we quantified the intensity of staining, we saw a significant increase in Vangl2 staining at SC/HC junction in *sv/sv* mutants compared to WT (Fig. 4D).

Vangl2 accumulates asymmetrically at distal edges of supporting cells and hair cells

If our hypothesis is correct and GIPC1 participate in Vangl2 endocytosis, the strong accumulation of Vangl2 seemingly on the same side than GIPC1 is confusing. One would expect a strong expression of GIPC1 to correlate with a lower level of Vangl2. Regular confocal microscopy did not allow a precise localization of Vangl2 at the junction between a SC and a HC. To try to discriminate between the plasma membranes of both cell types, we used stimulated emission depletion (STED) microscopy. Using this technique, we were able to reveal that Vangl2 expression appeared on both the SC and the HC sides (Fig. 5A-F'). On the HC side, Vangl2 labeling did not appear as a straight line, but more as puncta or clusters of concentrated particles with a broad range of intensities. To better visualize the range of fluorescence intensities reflecting the patterns of protein distribution, we changed the representation of each fluorescence value from a grey scale to the Union Jack LUT (Image J), with black representing the lowest fluorescence, and progressively higher fluorescence levels are blue, white, and then red (see Fig. 5B, C). This illustration confirmed that Vangl2 protein is concentrated at many foci. Linescan and a 3D isosurface reconstruction of Vangl2 distribution confirmed that Vangl2 is expressed strongly on the SC membrane side and in a spotted pattern on the HC membrane side (Fig. 5D,E). STED microscopy also revealed a distal localization of Vangl2 in HC as a thin and weak line (Fig. 5F,F').

To support our observation that both HC and SC could traffic Vangl2 asymmetrically, we followed the localization of the protein fused with a GFP-tag. We first established that electroporation with a vector that contained only GFP did not affect cochlear HC survival or differentiation (Fig. 5G-H). As previously observed, in most cells with strong GFP-Vangl2 expression, we did not observe asymmetrical localization of the tagged-protein; however, GFP-Vangl2 was expressed along the entire circumference of the plasma membrane (Montcouquiol et al., 2006b, data not shown). We searched for cells with weaker GFP-Vangl2 expression, and we observed an asymmetrical localization of the protein with an apparent stronger accumulation on the distal side of the HC (Fig. 5I-L). In SC, we observed a similar

but stronger distal asymmetrical localization of GFP-Vangl2 (Fig. 5M-P). Altogether, our results support our observation that Vangl2 accumulates strongly and primarily on the distal side of SC at the junction with a HC, and implies that the boundary between the SC and the HC junction is the key cellular interface for PCP signal transmission.

GIPC downregulation leads to hair bundle phenotypes *in vitro*

As an alternative to study the effect of a mutation of GIPC1, we decided to knock down GIPCs function using previously described small hairpin RNAs (shRNAs) for GIPC (Yi et al., 2007), that we will call shGIPCa-GFP and shGIPCb-GFP for this study. We first checked the efficacy of the shRNA on our myc-GIPC1 construct in HEK293T, and found that both shRNA significantly reduced myc-GIPC1 levels, with a higher efficiency for shGIPCb-GFP (Fig.S1A). shGIPCa-GFP led to a reduction of 30% and shGIPCb-GFP to a reduction of 50% of GIPC1. We therefore pursued our analysis with shGIPCb-GFP. We next tested the effect of shGIPCb-GFP on endogenous GIPCs expression in rat cochlea electroporated at E16.5 using an electroporation method previously described and maintained *in vitro* for 6 days before immunocytochemistry (Montcouquiol et al., 2006, 2008). Since the shRNA vector contains a coding sequence for GFP, we were able to identify individual cells expressing the shRNA by their GFP expression. In all cells positive for shGIPCb-GFP, there was a complete lack of GIPC expression, showing that the shRNAs were efficient to downregulate all three GIPCs within a HC (Fig.6A-A,B", n=28), but also in a SC (Fig. 6B). Since GIPC is a known interactor of myosin VI (MyoVI), an important regulator of hair bundle integrity, stereociliary bundle morphology was analyzed at embryonic day 18.5 on cochlear whole mounts labeled with phalloidin. All HC expressing shGIPCb-GFP displayed stereociliary bundle abnormalities when compared to surrounding GFP-negative cells, or to cell expressing an empty shRNA-GFP vector (Fig.6C-D'). The severity of the phenotype was variable, probably as a result of the efficacy of the downregulation of the protein or the level of transcripts. In these cells, the actin-rich stereocilia appeared splayed, a phenotype reminiscent of mutation of atypical myosin, such as MyoVI (Self et al., 1999). Due to the severity of the phenotype, it was not possible to assess a PCP defect in the bundles. The stereocilia are supported by the cuticular plate, an apically located rigid platform formed of a meshwork of actin filaments in the cytoplasm of the HC. Labeling with b-spectrin, a marker

for the cuticular plate, showed a decreased staining in cell expressing shGIPCb-GFP, suggesting that the cuticular plate was partially affected by GIPC downregulation (data not showed). These results show that downregulation of GIPC in HC strongly affect the structure and integrity of the hair bundle, at least partially through a weakening of the cuticular plate where they are anchored.

If GIPC1 participates in Vangl2 endocytosis, the downregulation of GIPC1 would prevent endocytosis of Vangl2, leading to an accumulation of the protein at the plasma membrane on the HC side. The observation of a clear Vangl2 asymmetry is very delicate *in vitro*, as it depends mostly on a good patterning at the base of the cochlear duct, and the tissue tends to spread out in culture. However, we were able to observe that when we electroporated shGIPCb-GFP in HC, the levels of Vangl2 at the membrane was increased, compared to neighboring cells not electroporated, or electroporated with an empty GFP vector (Fig. 6E).

GIPC downregulation leads to hair bundle phenotypes *in vivo*

To evaluate the impact of a downregulation of GIPC *in vivo*, we used an *in utero* approach, to induce early downregulation of GIPCs in the inner ear of mice. This technique was previously shown to allow accurate and reproducible gene transfer to the developing murine cochlea (Gubbels et al., 2008). Since during our *in vitro* experiments we sometimes observed cells with no obvious GFP expression, but clear hair bundle disruption (see Fig. 3A, # and Fig.3B, arrowhead), we reasoned that the promoter driving GFP might not be strong enough for the *in utero* approach. We replaced the PGK promoter driving the expression of the GFP of the pSUPER vector, for the human elongation factor 1-a gene (EF1A) promoter, previously used (Gubbels et al., 2008). The modified shRNAs were then microinjected into the otocyst around E11.5, and the organ of Corti harvested seven or eight days later (E18.5 to P0) for immunocytochemistry (see Methods). In samples transfected with the empty sh-GFP, GFP-positive cells were distributed all along the cochlea, and we were able to find every cell type within the organ of Corti expressing GFP, including Ihc and Ohc, pillar cells (Pc) (Fig. 4A-A'') and hensen's cells (not showed). Also, the stereociliary bundle in all the HC appeared intact and mature. This shows that *in vivo* electroporation with our vector does not affect cell fate or HC maturation. Next, we electroporated both shGIPCa-GFP and shGIPCb-GFP. In those samples, the number of cells expressing GFP after eight days was strongly reduced

compared to the empty vector, but we were still able to observe every cell type positively transfected (Fig.4B-G'). Consistent with our *in vitro* electroporation, we observed a dysmorphogenesis of the hair bundles of HC expressing shGIPCb-GFP (Fig.4B-G') and weaker with shGIPCa-GFP (Fig.S2A,A'). The hair bundle phenotype in these cells ranged from smaller and tilted with reduced cuticular plate and consistent with a PCP phenotype (Fig.3B,D), to an almost absent bundle and a complete lack of cuticular plate (Fig.4E,G). In addition to the stereociliary bundle phenotype, the HC had reduced luminal surface area (Fig.4B-E). We did not observe such dramatic phenotypes in rat cultures, but we reasoned that it is due to the earlier stages of electroporation of the *in utero* approach (E11.5) versus the latter *in vitro* approach (E16.5). This not only confirm that GIPC participates in hair bundle development or maintenance, but also in HC maturation *in vivo*.

Discussion

The central finding of this study is the identification of the GIPC family as central molecules for the normal development of the hair cells in the organ of Corti in mammals. We show that GIPC1 participates in the trafficking of Vangl2 at the plasma membrane of HC, and in the maturation of HC, including the hair bundle.

GIPC are regulators of Vangl2 trafficking and PCP

In 2005, Paul Adler's group carried out a gene expression screen to identify candidate genes that functioned in wing and wing hair morphogenesis (Ren et al., 2005). They discovered that the amount of *kermit* mRNA, the *Xenopus* GIPC homologue, increased 3.1 fold during wing maturation. Kermit, was originally identified by an EP insertion that resulted in abnormal hair polarity and multiple HC when over expressed using several GAL4 drivers (Toba et al. 1999). Recently, Djane and Mlodzik have shown that overexpression of the fly homologue for GIPC (dGIPC) affects PCP in the body wall and wing of the adult fly (Djiane and Mlodzik, 2010). The authors argue however that dGIPC is not normally involved during PCP generation in the fly because dGIPC null mutants are homozygous viable. Our own results suggest that compensation may exist in mammals, since the GIPC family is composed of at least 3 members, GIPC1,2 and 3 (Katoh, 2002), and redundancy would explain the lack of obvious phenotype in the inner ear of the GIPC1/synectin mutant, as opposed to the strong phenotype of the shRNA for GIPC used *in vitro* and *in vivo*.

We found that GIPC and Vangl2 colocalize within COS-7 and HEK293 cells giving evidence for their interaction within cells. Furthermore, when we transiently overexpressed MyoVI, Vangl2 and GIPC1, colocalization was enhanced, and clusters containing the three proteins relocalized closer to the plasma membrane. MyoVI is the only actin-based molecular motor that translocates along actin filaments toward the minus end, which tend to be oriented toward the cell center. Altogether, these data suggest a role for GIPC1 in the endocytosis of Vangl2.

Consistent with this result and using STED microscopy and cellular biology techniques, we showed that the strong asymmetric accumulation of Vangl2 at SC/HC junctions is due to a localization of the protein on both cell sides with the strongest accumulation on the SC side.

Vangl2 is therefore more weakly expressed on the HC side, where GIPC1 is accumulated and polarized.

GIPC is a PDZ-domain-containing protein that can bind to proteins that have at their carboxyl-termini a conserved type I PDZ-BM (S/T)-X-(V/A). Vangl2 has such a domain. Since MyoVI do not bind to the PDZ region of GIPC but to its C-ter domain (Bunn et al., 1999), GIPC bound to MyoVI would still be able to bind to other proteins via its PDZ domain. GIPC1 would cluster Vangl2 and bind to MyoVI in order to remove Vangl2 from the plasma membrane, effectively reducing its accumulation on the plasma membrane. The strong accumulation of GIPC1 on the proximal side of HC, coupled with the lower expression of Vangl2 on the same side (Giese et al., submitted) is consistent with such a protein complex involved in the endocytosis of Vangl2. Some of the mild phenotype observed in the *in vivo* shGIPC1b cochlea (see example Fig. 4D) suggests that a reduction in GIPC family members during HC development might have an impact on PCP, maybe because of Vangl2 traffic regulation.

Early *in vivo* downregulation of GIPC leads to a more severe phenotype than *in vitro* downregulation, with an inhibition of HC maturation. It is known that MyoVI is expressed early in the cytosol of HC, as early as E13.5 and later in the cuticular plate (Hasson et al 1997, Montcouquiol et al., 2006). This is consistent with the presence of endocytic vesicles at the apical pole of HC (Forge and Richardson 1993; Souter et al 1995; Denman-Johnson and Forge 1999) suggesting that there is extensive endocytotic activity and membrane turnover at the apical membrane of HC during development.

It should be noted that during drosophila spermatogenesis, one possible role for MyoVI that was advanced was that it could deliver membrane vesicles to the advancing front of the investment cone, providing the materials necessary for forming the membrane. The reduced apical surface area of HC in our shGIPCb experiments suggest that during early maturation of HC GIPC and MyoVI could participate in a similar mechanism to increase the size of HC. Finally, another role for GIPC could come from the protein behaving as a scaffold to form protein complexes, allowing the activation of various signaling pathways, as has been reported for GIPC1 in other systems.

GIPC is a major regulator of hair bundle formation/maintenance

PDZ-containing proteins, such as GIPC family members, are known to (1) stabilize large functional complexes; (2) spatially cluster and anchor transmembrane proteins to specific subcellular domains; (3) act as adaptors or (4) scaffolds; (5) regulate trafficking of cytosolic proteins to and from the plasma membrane and (6) interact with the cytoskeleton (Fanning and Henderson, 1999). There is however little *in vivo* evidence for the functional role of GIPC in mammals, other than in arterial branching and hippocampal synaptic transmission (Chittenden et al., 2006; Yano et al., 2006). In the present study, using shRNA *in vivo* and *in vitro*, we uncovered a role for GIPCs in the differentiation of HC in the inner ear of mammals. We believe that this role is masked in GIPC mutants by redundancy from the two other members of the GIPC family that are present in mammals, and are expressed by the cochlear epithelium. GIPCs probably play more than one role during HC maturation, as its downregulation led to different phenotypes whether it occurred in the early or later phases of development. The early downregulation of GIPC did not inhibit cell fate, but strongly impaired HC in terms of shape, size, and maturation. GIPC interactions are flexible and it is able to associate with a variety of proteins with divergent PDZ-BM (Abramow-Newerly et al., 2006). The GIPC family may therefore be involved in various functions through different binding partners during the early stages of development of the HC, and modulate many signaling pathways. Some of these interactions could involve MyoVI, which is expressed in the cytosol of HC, as early as E13.5 (Hasson et al 1997, Montcouquiol et al., 2006).

However, MyoVI is not required for the initial maturation of HC and hair bundle formation. In the deaf mouse, *Snell's waltzer* (Self et al., 1999), effectively null for MyoVI, stereocilia are normal before birth. Starting at birth, the apical plasma membrane loses its position and rises up between adjacent stereocilia. By about two weeks after birth, fused giant stereocilia structures have formed in mutant mice (Self et al., 1999). This phenotype is believed to be due to a disruption of the progression of MyoVI down the actin cytoskeletons of stereocilia, pulling the attached apical membrane taut until the increasing load arrests the motor, thereby anchoring the membrane between stereocilia. Downregulation of GIPC later in development also leads to a strong disruption of hair bundle integrity, with a fairly normal looking of HC. It is possible therefore that this later stage involves a GIPC1-MyoVI tandem, as disruption of either of them leads to a similar hair bundle phenotype. Indeed, GIPC1 is one of the best

candidates for a molecular bridge between MyoVI and the plasma membrane (Sweeney and Houdusse, 2007).

In humans, mutations in MyoVI cause hereditary hearing loss (DFNA22 and DFNB37 syndromes), which can be associated with hypertrophic cardiomyopathy (Melchionda et al., 2001; Ahmed et al., 2003). Our data strongly suggest an *in vivo* functional role for the GIPC family in hair cell maturation that could also lead to hearing impairment if disrupted. A GIPC mutation has not been linked to human deafness so far, but a recent study has identified four patients that share a 359-kb deleted region in 19p13.12 harboring six genes, including GIPC1. The patients had a number of clinical features including hearing impairment, leading the authors to suggest that haploinsufficiency of GIPC1 may contribute to hearing impairment for its interaction with MyoVI (Bonaglia et al., 2010).

Experimental Procedures

Plasmids constructs. *Vangl2* full length was amplified from mouse cochlea and cloned into pEGFPC3 or pCLIG (Montcouquiol et al., 2006b). Site-directed mutagenesis was used to substitute the serine 464 for an asparagine on the C-terminal (C-ter) region of *Vangl2* (S464N), to introduce stop codons to generate *Vangl2* mutants lacking the last 4 amino acids (aa) (*Vangl2*^{Δ4}), the last 12 aa (*Vangl2*^{Δ12}) (QuickChange, Stratagene). Rat myc-GIPC1 (pCMVtag3C) was a generous gift from Dr. R. Lefkowitz (Howard Hughes Medical Institute, Durham, NC). A GFP-GIPC1 fusion protein was obtained by amplification of rat GIPC1 and subcloned into the pCLIG mammalian expression vector. Site-directed mutagenesis was used to generate mutant forms of GIPC1 including mutations in the two hydrophobic pockets of the PDZ domain of GIPC1 (GIPC1^{PDZ1dead}, LGL/AAA, aa 143–145), and introduction of a stop codon in the C-ter of GIPC1, generating a form lacking the 29 last aa (GIPC1^{Δ29}). Rat GIPC2 and GIPC3 ORF were synthesized (NM_001037210, XM_576176, Eurogentec) and cloned in frame with the myc-tag in pCMVtag3C. pSUPER.gfp/neo vector (sh-GFP) and pSUPER.gfp/neo GIPC1 (shGIPC1a-GFP, shGIPC1b-GFP) were a generous gift from Dr. R. Wenthold (NIDCD, NIH, Bethesda, USA). GFP-Myosin VI pEGFP-C1 was a generous gift from Tama W. Hasson (UCSD, San Diego, USA).

Yeast two-hybrid screening. The C-ter portion of *Vangl2* (aa 438-521) was used as a bait for the screening was subcloned into pGBTK7 vector (Clontech) in frame with the DNA-binding domain of galactosidase 4 (GAL4). Yeast two-hybrid screening and assays were performed as described in the Clontech protocol (Matchmaker two-hybrid System 3 assay). AH109 cells expressing GAL4-*Vangl2* were combined with Y187 cells expressing an embryonic mouse cochlea cDNA library (Montcouquiol et al., 2006). The mating mixture was plated onto synthetic defined plates under quadruple selection (Leu-, Trp-, Ade-, His-). The library plasmids from positive colonies were rescued and sequenced. Among the positive clones, thirteen were identified as GIPC1. Stop codon were introduced in the pGBTK7-*Vangl2* construct to generate pGBTK7-*Vangl2*^{Δ4} and pGBTK7-*Vangl2*^{Δ12}. Two different GIPC1 clones obtained from the screening were re-transformed into yeast AH109 with the bait (GIPC1^{C1}, GIPC1^{C15}). For each transformation, yeasts were first plated under double selection (Leu-, Trp-). The colonies were then transferred to quadruple selection (Leu-, Trp-, Ade-, His-

) containing α -GAL. Selection and β -galactosidase activity were used to measure the direct interaction. Similar assays were done with the N-terminal portion of GIPC1 (PRD, aa 2-130), the C-term portion of GIPC1 (ACP, aa 124-226) and the central PDZ domain of GIPC1 (PDZ, aa 124-226) subcloned into pGADT7.

GST binding assays. The N-ter of Vangl2 (aa 1-108), the C-ter of Vangl2 (aa 437-521), or mutations of the C-ter portion (Vangl2 ^{Δ 4} and Vangl2 ^{Δ 12}) were cloned in GEX-4T-1 and GST fusion proteins were produced in BL21 *Escherichia coli* and purified directly from bacterial extract on glutathione-Sepharose-4B beads (Amersham). Pull-down assays were performed with myc-GIPC1 and myc-GIPC1^{PDZ1-dead}. Immobilized GST were incubated with 1 ml of cell lysate expressing GIPC1 resuspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% DOC), containing inhibitors cocktail (Sigma) for 3h at 4°C. After extensive washes with binding buffer (50 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), the bead pellets were resuspended in SDS sample buffer followed by Western blot analysis.

Antibodies. The following primary antibodies were used : rabbit anti-Vangl2 (1:500 dilution, Montcouquiol et al., 2006), mouse anti-EEA1 polyclonal antibody (1:500, BD Biosciences), mouse and rabbit anti-myc monoclonal antibody (1:1000, Covance, Ramona, CA), rabbit anti-GIPC polyclonal antibodies (generous gift from Marilyn Farquhar, UCSD, San Diego, USA, 1:800, Fq; Proteus Biosciences, Prot), rabbit anti-Myosin VI polyclonal antibody (1:200, Proteus Biosciences), mouse anti- β -catenin monoclonal antibody (1:1000, Chemicon International, Temecula, USA), anti-GFP polyclonal antibody (1:1000, Chemicon), anti-acetylated tubulin monoclonal antibody (1:1000, Sigma-Aldrich, Lyon, France), anti- α -spectrin (1:400, BD Biosciences). Secondary antibodies : Alexa Fluor-546 goat anti-rabbit, Alexa Fluor-647 goat anti-rabbit, Alexa Fluor-546 goat anti-mouse, Alexa Fluor-647 goat anti-mouse (1:1000 dilution, Invitrogen).

Dissection and in vitro electroporations. Pregnant Sprague Dawley rats were euthanized according to the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) recommendations. E16.5 rat cochleae were dissected in cold HBSS (Invitrogen) as described previously (Montcouquiol et al., 2006b). Briefly, after removal of the surrounding cartilage, Reissner's membrane was dissected to expose the developing sensory epithelium. After dissection, cochleae were electroporated in presence of 8 μ l of 1.5 to 2 μ g/ μ l cDNA with an electrical field (Montcouquiol et al., 2008).

Electroporated sensory epithelium were maintained for 6 days at 37°C/5% CO₂ in MatTek dish (MatTek Corporation) previously coated with Matrigel (BD Biosciences), in presence of culture medium composed of Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM), 10% foetal bovine serum, and N2 supplement (Invitrogen).

In vivo electroporations. For in vivo electroporation, the PGK promoter of pSUPER.gfp/neo vector was replaced with the human elongation factor 1- α promoter (EF1- α). pSUPER-modified constructs were injected and electroporated into the E11.5 mouse otocyst as described previously (Gubbels et al., 2008).

Cell culture and Transfections. COS-7 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Cells used for transient transfections were maintained using DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), HEPES (Invitrogen), glutamine and penicillin-streptomycin (Invitrogen). Cells were plated 20-30% confluent for 24 h at 37°C/5% CO₂. On the day of transfection, 2 μ g of each DNA were transfected for 24 h using Calcium phosphate. The cells were then cultured for an additional 24 h before immunostaining.

Immunostaining. Transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min, washed, then permeabilized with PBS containing 0.25% Triton X-100 for 5 min, and blocked with 10% normal goat serum (NGS, Vector Labs) diluted in PBS for 1 h. Cells were incubated with a primary antibody in PBS containing 3% NGS for 1 h, washed, and incubated with secondary antibodies for 30 min in 3% NGS/PBS. Cochleae were fixed with 4% PFA 30 min, washed, permeabilized in TBS containing 0.5% Tween-20, and blocked into TBS with 10% NGS for 1 h. Cochleae were then incubated with a primary antibody in TBS containing 2% NGS and 1% BSA overnight at 4°C, washed, and incubated with secondary antibodies for 30/45 min in TBS with 2% NGS/1% BSA. Phalloidin 546 and 647 were used at a 1:250 dilution for F-actin staining. For immunocytochemistry comparisons of homozygote and wild type cochleae (synectin, *Snell's waltzer*), both ears were processed in the same tube, in the same conditions. For experiments with transferring, 24h after transfection, COS-7 cells were incubated in DMEM supplemented with 2 mM L-Glutamine and 2% BSA at 37°C/5% CO₂ for 1 h. The medium was then replaced with the DMEM/L-Glu/BSA medium complemented with 1% Alexa fluor 568-conjugate transferrin (50 μ g/ml). Transferrin staining was processed for 3 or 15 min at 37°C/5% CO₂. The cells were washed and processed for immunostaining.

Microscopy. For optical sectioning of whole mounts, image acquisition were obtained on an epifluorescence microscope system (AxioVision Z1; Carl Zeiss, Inc.) fitted with an

Apotome slide module with a 63× NA 1.4 Plan-Apochromat objective and a digital camera (AxioCam MRm; Carl Zeiss, Inc.), or on a confocal microscope (TCS SP5; Leica). Imaging was done using a Z step from 0.2 to 0.4µm. STED microscopy was performed with a TCS STED microscope (Leica), with a objectives 63× 1.4 NA oil immersion, and a 100× 1.4 NA oil immersion STED objective. Images were processed using Volocity software (PerkinElmer).

Colocalization analysis. Three 80x80 pixel regions were selected in cytosol from each COS-7 cell. In each area, value of colocalization was defined as the percentage ratio between the number of positive vesicles for GFP-Vangl2, GFP-Vangl2^{Δ4} or GFP-Vangl2^{Δ12} and the number of myc-GIPC1, EEA1 or transferrin vesicles overlapped or using Axiovision software (Zeiss). Measurements from three areas were averaged per cell. Means from different cells were averaged to obtain a final mean SEM. Student's t test was used in order to determine statistical significance. Van steensel's coefficient was calculated using Jacop imageJ plugin, quantification for membrane targeting was quantified using linescan method and Metamorph 7.04 software (Molecular devices).

Endocytosis analysis. To evaluate endocytosis, COS-7 cells were transfected with various cDNA. Twenty-four hr after transfection, COS-7 cells were incubated in DMEM supplemented with L-Glutamine and BSA at 37°C/5% CO₂ for 1h. The medium was then replaced with 1% Alexa fluor 568 conjugated transferrin (Invitrogen, 50ug/ml) in DMEM/L-Glu/BSA medium, for 3 or 15 min at 37°C. The cells were then washed and processed for immunostaining.

Immunoblotting. The immunoblotting procedure was carried out as described previously (Montcouquiol et al., 2008). Anti-myc antibody and anti-GFP antibody were used at a 1:5000 dilution. Immunoreactive proteins were visualized using a chemiluminescence-based immunodetection of horseradish peroxidase (HRP) (Amersham).

Coimmunoprecipitation. Forty-eight hours after transfection, cells were homogenized with a polytron in 50 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8.0 Tris-HCl containing a protease inhibitor mixture. DOC was added to a final concentration of 1%. Solubilization was performed at 37°C for 45 min, followed by centrifugation at 30 000g for 60 min at 4°C. Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. Protein A-Sepharose beads were incubated 4 h with anti-myc antibody and washed with PBS containing 0.1% Triton X-100 three times. DOC lysate was incubated 16h with protein A-Sepharose beads. After washing

with PBS containing 0.1% Triton X-100, 150mM NaCl three times, the Sepharose was boiled in 2x SDS sample buffer.

Mutants. Fixed tissue of synectin and *Snell's waltzers* mutant mice were a generous gift of Michael Simons (Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH), and Karen Avraham (Tel Aviv University, Israel).

RT-PCR. RNA was isolated from thermolysined-mouse E16.5 cochlea reverse-transcribed using random hexanucleotide primers and SuperScript II reverse transcriptase as described earlier (Montcouquiol et al., 2003). Primers designed for this work were: GIPC1, 5'ATGATCAGCCAGCGTTCAGC 3', 5'CAAGGTCCAGGTTTCAGTTCC 3'; GIPC2, 5'TAGGACCAAGGTCGAAAGCC 3', 5'CGACAGCAAACATCATCTGGG 3'; GIPC3, 5'CGCGAGCTTTACGCCAAGATC 3', 5'TGGTCATTGATGGCCTCAATGC 3'; Myosin VI, 5'-3', 5'-3'. PCR primers were denatured at 94°C for 1 min, annealed at 55°C for 1 min, and extended at 72°C for 1 min for 35 cycles.

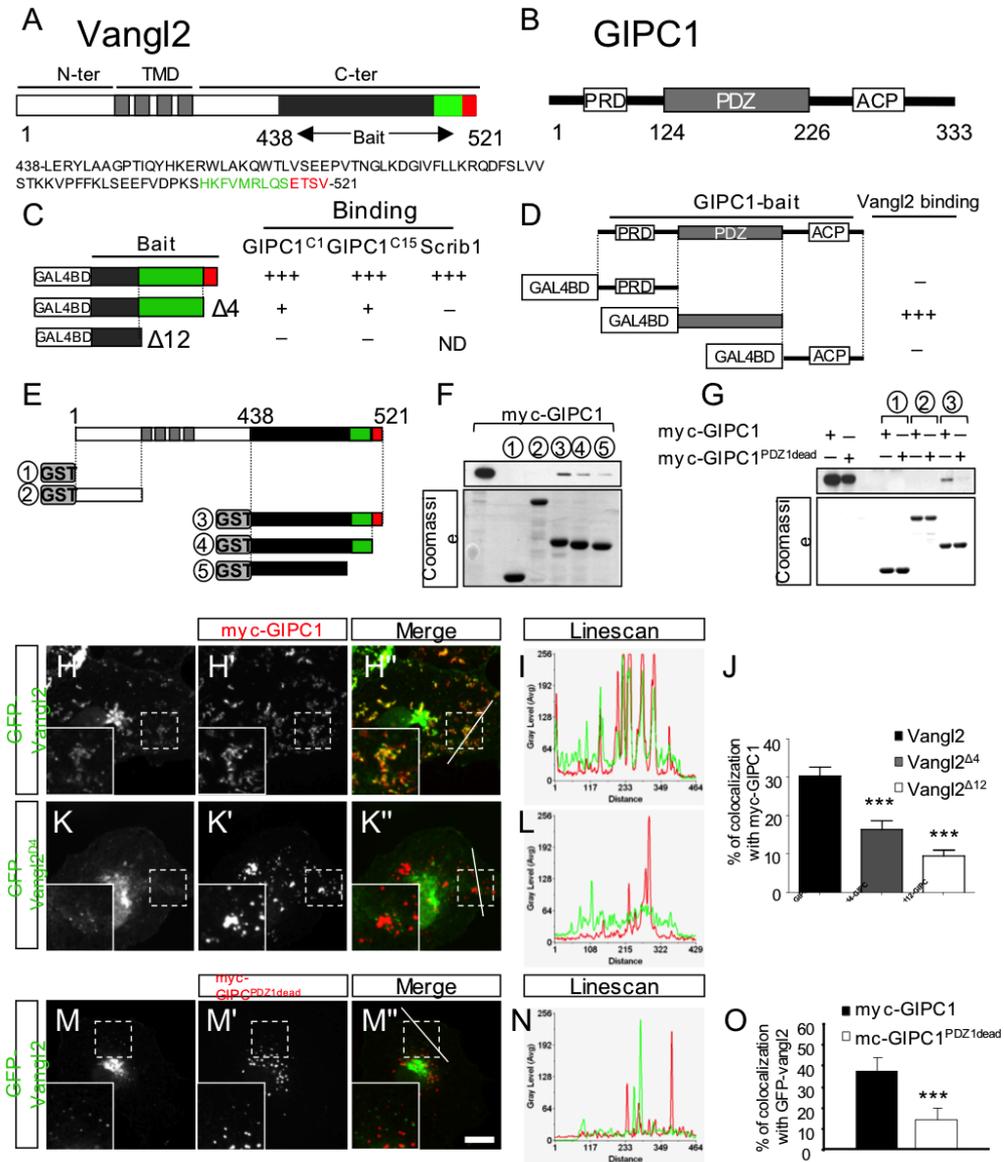
References

- Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, Chidiac P. RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal*. 2006 18:579-91
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaikat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T et al.: Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet* 2003, 72:1315-1322
- Aschenbrenner L, Naccache SN, Hasson T: Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Mol Biol Cell* 2004, 15:2253-2263.
- Bonaglia MC, Marelli S, Novara F, Commodaro S, Borgatti R, Minardo G, Memo L, Mangold E, Beri S, Zucca C, Brambilla D, Molteni M, Giorda R, Weber RG, Zuffardi O. Genotype–phenotype relationship in three cases with overlapping 19p13.12 microdeletions 2010 *European Journal of Human Genetics* ahead of print
- Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 1999;10:819–832
- Buss F, Arden SD, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J: Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 2001, 20:3676-3684.
- Chittenden TW, Claes F, Lanahan AA, Autiero M, Palac RT, Tkachenko EV, Elfenbein A, Ruiz de Almodovar C, Dedkov E, Tomanek R, Li W, Westmore M, Singh JP, Horowitz A, Mulligan-Kehoe MJ, Moodie KL, Zhuang ZW, Carmeliet P, Simons M. Selective regulation of arterial branching morphogenesis by syndecin. *Dev Cell*. 2006 10:783-9
- Deans MR, Antic D, Suyama K, Scott MP, Axelrod JD, Goodrich LV (2007) Asymmetric distribution of prickle-like 2 reveals an early underlying polarization of vestibular sensory epithelia in the inner ear. *J Neurosci* 27:3139-3147.

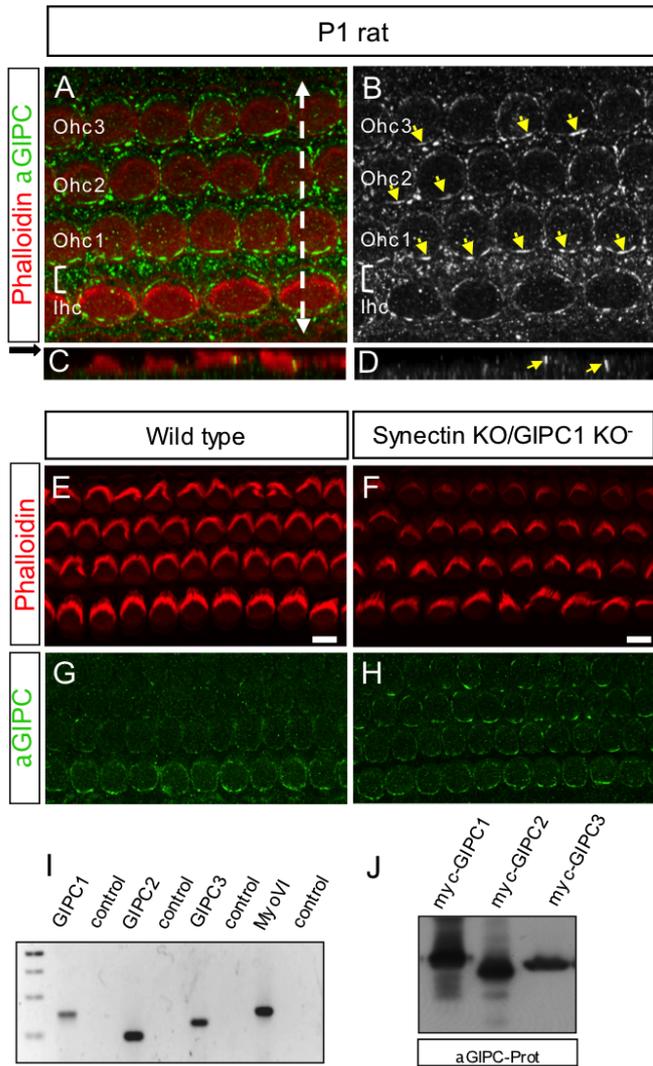
- Denman-Johnson K, Forge A. Establishment of hair bundle polarity and orientation in the developing vestibular system of the mouse. *J Neurocytol.* 1999 28:821-35
- Devenport D, Fuchs E. Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nat Cell Biol.* 2008 10:1257-68
- Djiane A, Mlodzik M. The *Drosophila* GIPC homologue can modulate myosin based processes and planar cell polarity but is not essential for development. *PLoS One.* 2010 5:e11228
- Etheridge SL, Ray S, Li S, Hamblet NS, Lijam N, Tsang M, Greer J, Kardos N, Wang J, Sussman DJ, Chen P, Wynshaw-Boris A. (2008) Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet* 4:e1000259.
- Fanning AS, Anderson JM. 1999 PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest.* 103:767-72
- Forge A, Richardson G. Freeze fracture analysis of apical membranes in cochlear cultures: differences between basal and apical-coil outer hair cells and effects of neomycin. *J Neurocytol.* 1993 22:854-67.
- Gubbels SP, Woessner DW, Mitchell JC, Ricci AJ, Brigande JV. Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. 2008 *Nature.* 455:537-41
- Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol.* 1997 137:1287-307.
- Hasson T: Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 2003, 116:3453-3461.
- Kachar B, Battaglia A, Fex J. Compartmentalized vesicular traffic around the hair cell cuticular plate. *Hear Res.* 1997 107:102-12
- Katoh M. GIPC gene family. *Int J Mol Med.* 2002 9:585-9.

- Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, Rabionet R, Arbones ML, Notarangelo A, Di Iorio E, CarellaMet al.: MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 2001, 69:635-640
- Montcouquiol M, Jones JM, Sans N (2008) Detection of planar polarity proteins in mammalian cochlea. *Methods Mol Biol* 468:207-19.
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW (2003) Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423:173-77.
- Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW (2006b) Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* 26:5265-5275.
- Ren N, Zhu C, Lee H, Adler PN. Gene expression during *Drosophila* wing morphogenesis and differentiation. *Genetics*. 2005 Oct;171(2):625-38.
- Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP. Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol*. 1999 214:331-41.
- Souter M, Nevill G, Forge A. (1995) Postnatal development of membrane specialisations of gerbil outer hair cells. *Hear Res*. 91:43-62.
- Sweeney HL, Houdusse A. What can myosin VI do in cells? 2007 *Curr Opin Cell Biol*. 19:57-66
- Toba, G., T. Ohsako, N. Miyata, T. Ohtsuka, K. H. Seong *et al.*, 1999. The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151: 725-737
- Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, et al (2006a) Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development* 133:1767-1778.

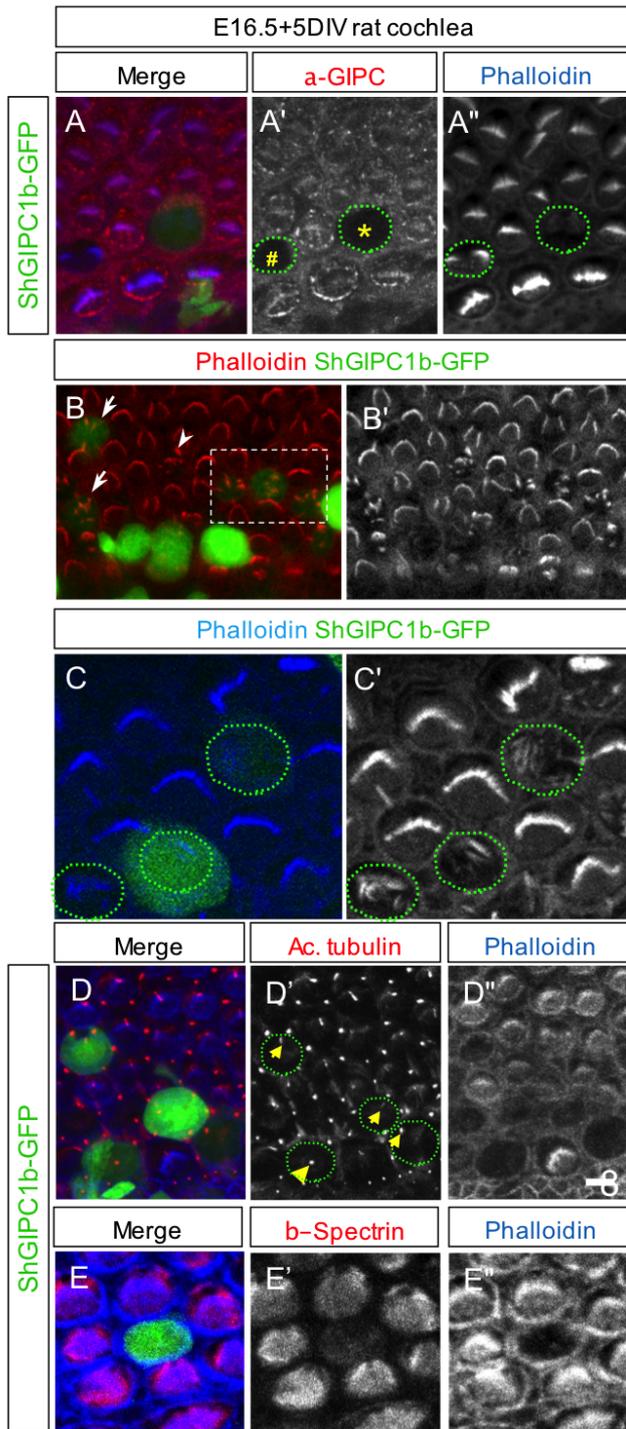
- Wang J, Mark S, Zhang X, Qian D, Yoo SJ, Radde-Gallwitz K, Zhang Y, Lin X, Collazo A, Wynshaw-Boris A, Chen P (2005) Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet* 37:980-985.
- Wang Y, Guo N, Nathans J (2006b) The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neurosci* 26:2147-2156.
- Warner CL, Stewart A, Luzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, Buss F: Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice. *EMBO J* 2003, 22:569-579.
- Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV. BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nat Neurosci*. 2006 9:1009-18.
- Yi Z, Petralia RS, Fu Z, Swanwick CC, Wang YX, Prybylowski K, Sans N, Vicini S, Wenthold RJ. The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking *J Neurosci*. 2007 27:11663-75



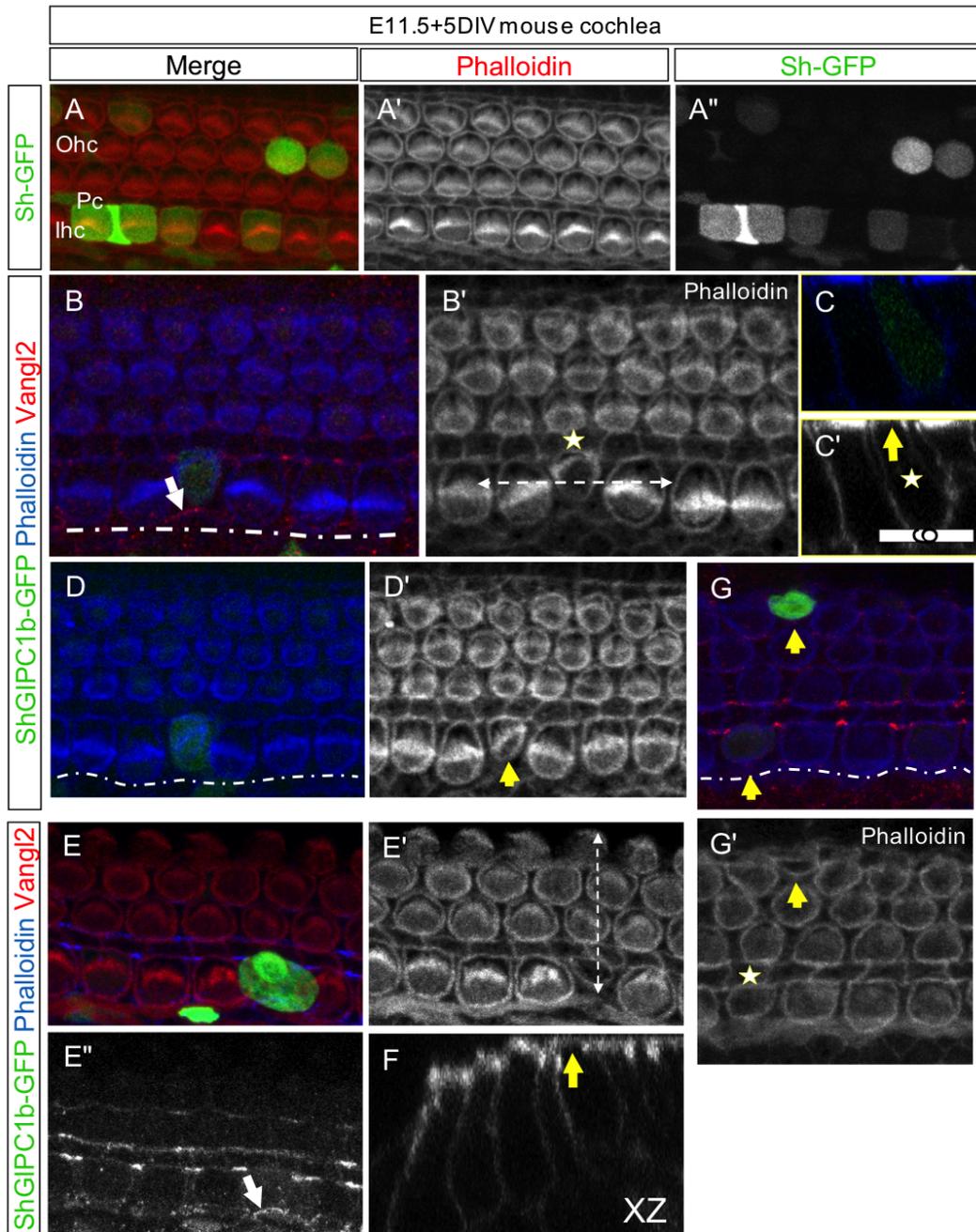
Giese et al Figure 1



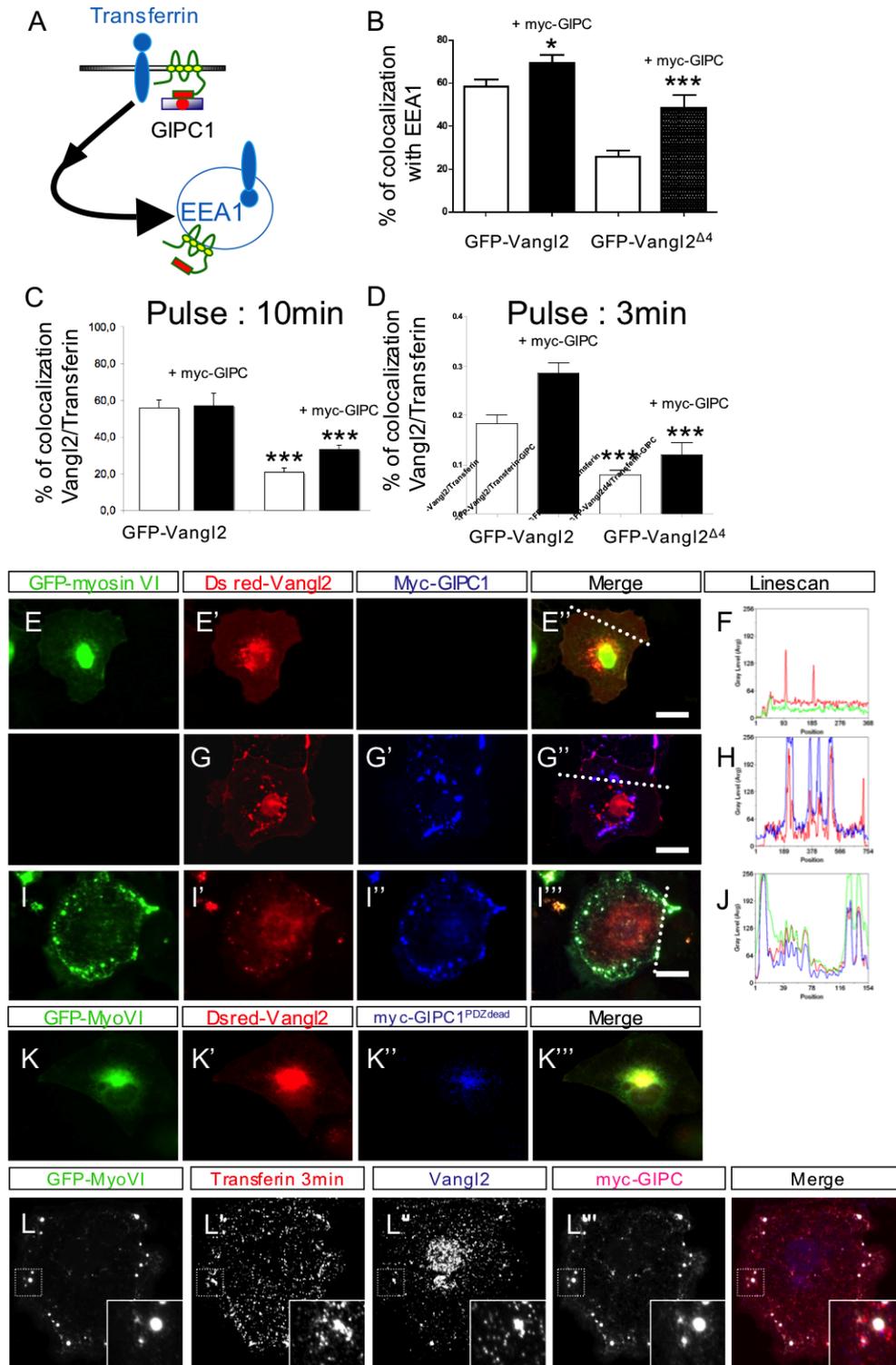
Giese et al Figure 2



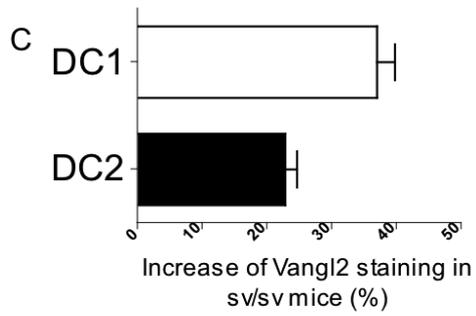
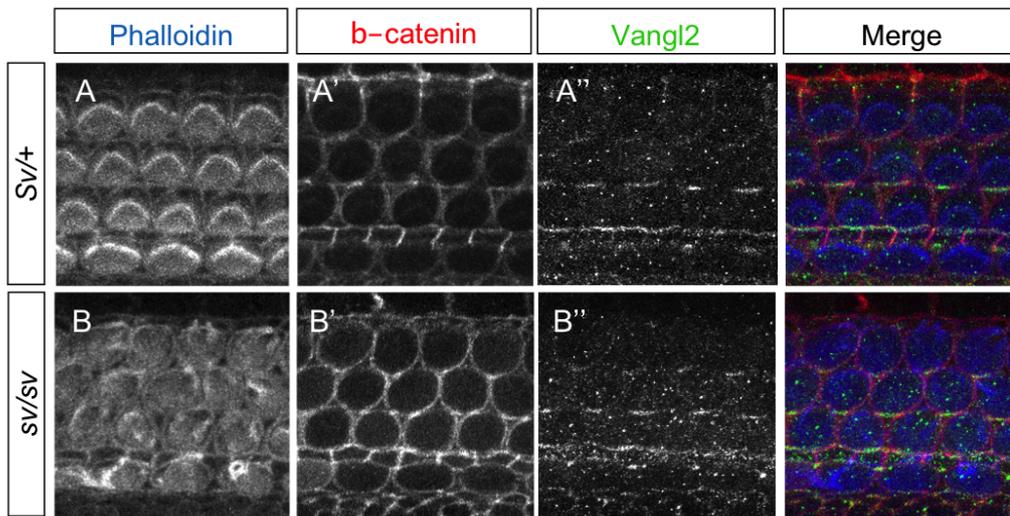
Giese et al Figure 3



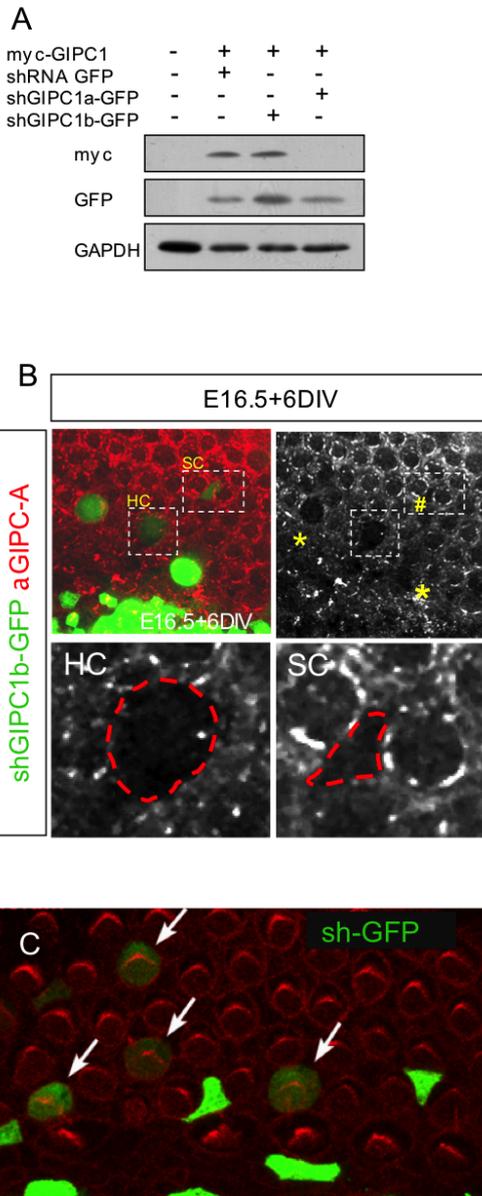
Giese et al Figure 4



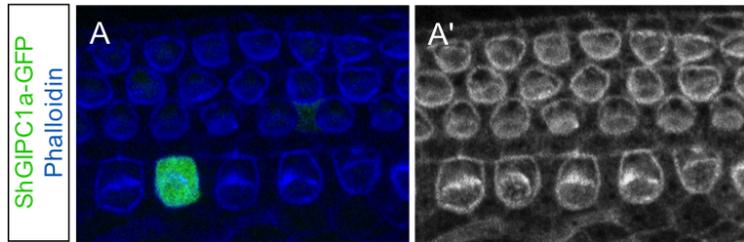
Giese et al Figure 5



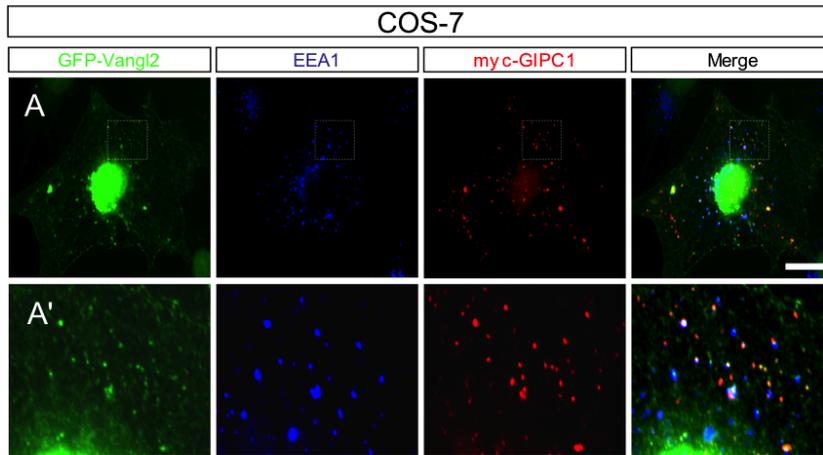
Giese et al Figure 6



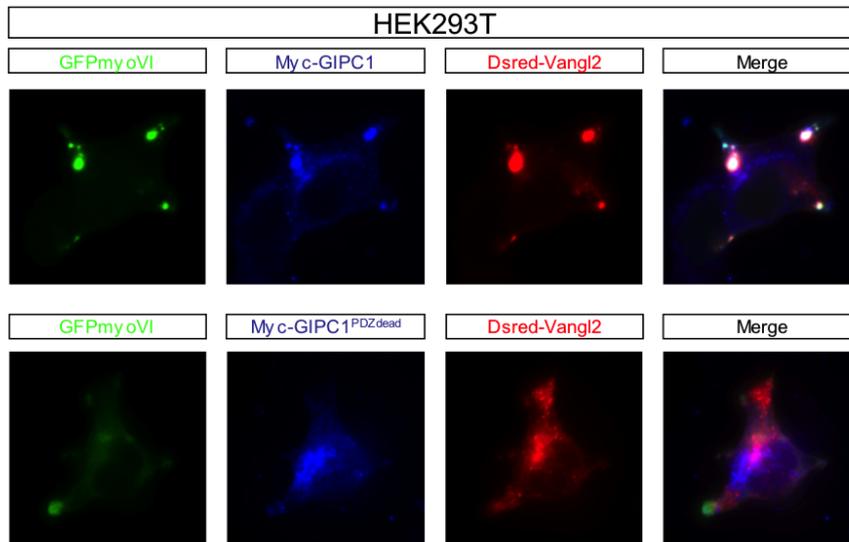
Giese et al Figure S1



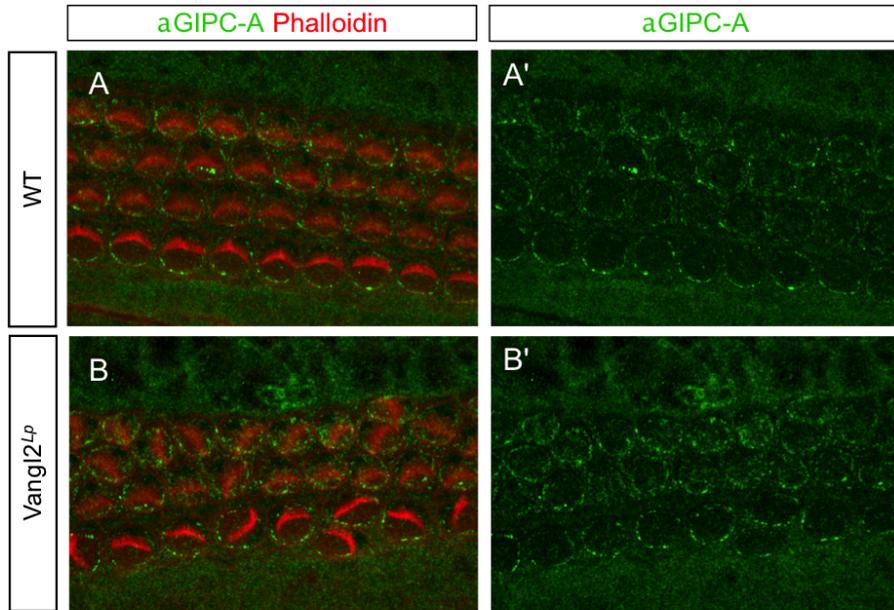
Giese et al Figure S2



Giese et al Figure S3



Giese et al Figure S4



Giese et al Figure S5

6 Discussion et Perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet du laboratoire qui consiste à étudier la polarité planaire cellulaire chez les mammifères. Nous travaillons essentiellement sur les mécanismes contrôlés par les gènes *Vangl2* et *Scribble1*, gènes ayant été mis en évidence par l'équipe, en 2003, comme régulateurs de la PCP dans l'oreille interne.

Mon travail, au cours de ces trois années, fut d'étudier le trafic intracellulaire de la protéine centrale de la PCP *Vangl2* dans l'épithélium sensoriel de cochlée de mammifères. Comme je l'ai précisé dans mon introduction, l'essentiel des mécanismes de la polarité planaire cellulaire ont été mis en évidence chez la drosophile et certains de ces mécanismes semblent bien conservés chez les mammifères. Nous avons également vu que certains de ces mécanismes semblent contradictoires entre drosophile et mammifères, notamment en ce qui concerne la distribution proximo-distale des protéines centrales de la PCP.

L'un des critères caractérisant un gène PCP est la localisation asymétrique de la protéine pour laquelle il code. Ce critère est conservé entre la drosophile et les mammifères. Cette localisation asymétrique, essentielle, transitoire et apparaissant à la jonction entre une cellule sensorielle ciliée et une cellule de soutien dans l'organe de Corti, est toutefois sujette à de nombreuses interrogations :

- Les mécanismes permettant l'établissement de l'asymétrie des protéines centrales de la PCP n'est toujours pas connu à l'heure actuelle
- nous ne savons pas quelles sont les protéines impliquées dans la régulation de cette asymétrie
- nous ne savons pas de manière précise si cette asymétrie s'opère dans les cellules de soutien ou dans les cellules ciliées de l'organe de Corti.

Dans un premier temps, je me suis donc efforcé de caractériser l'asymétrie proximo-distale de *Vangl2* dans l'épithélium cochléaire et de déterminer le rôle de la protéine *Scribble1* sur cette asymétrie.

Dans un deuxième temps, je me suis attaché à étudier le rôle de la protéine *GIPC1*, mise en évidence par un crible double hybride, sur la régulation du trafic intracellulaire de *Vangl2* dans l'organe de Corti.

Un nouveau regard sur l'asymétrie proximo-distale de Vangl2

L'utilisation de la microscopie STED, de par la haute résolution des acquisitions en immunofluorescence, a permis de caractériser de manière précise la localisation proximo-distale de Vangl2 dans l'organe de Corti. Nous avons pu mettre en évidence que Vangl2 était localisé asymétriquement du côté distal des cellules de soutien et des cellules sensorielles ciliées. Vangl2, dans une moindre mesure, semble également s'accumuler sous forme de « clusters » du côté proximal des cellules ciliées. La localisation de Vangl2 est schématisée en Figure 31, et est comparée au modèle qui était proposé jusqu'à ce jour.

Cette nouvelle vision de la localisation de Vangl2 est accréditée par la surexpression d'une construction GFP-Vangl2 dans l'organe de Corti. La faible expression de cette construction se traduit par une localisation asymétrique de la protéine de fusion encodée par notre vecteur et est similaire à celle qui est observée en immuno-marquage *in vivo*. Cette expérimentation a l'avantage d'écarter tout risque de marquage aspécifique de notre anticorps et qui aurait pu fausser notre première analyse. L'utilisation de protéine fusion est la stratégie communément utilisée chez la drosophile afin d'étudier la localisation des protéines de la PCP au sein de l'aile de drosophile, et ceci, en raison de la localisation asymétrique qui reste dans tous les systèmes discrète et transitoire.

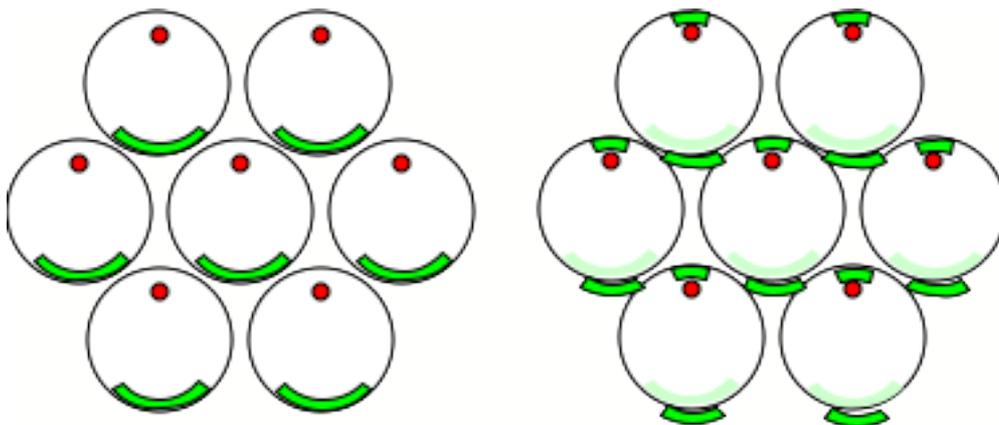


Figure 31 : Nouvelle vision de l'asymétrie de Vangl2 dans l'organe de Corti.

Comparaison entre la localisation asymétrique de Vangl2 communément admise par la littérature (gauche) et la localisation proposée dans notre modèle (droite). Le marquage

Vangl2 est symbolisé en vert. Les cercles représentent des cellules ciliées intercalées par des cellules de soutien et vues de dessus.

Réconciliation entre les modèles de la PCP chez la drosophile et les mammifères

Cette analyse apporte une nouvelle vision sur les mécanismes de la PCP dans l'organe de Corti. En effet, jusqu'à présent, nous pensions que Vangl2 était localisé du côté proximal de la cellule sensorielle ciliée (Figure 31). La communauté scientifique pensait ainsi que Vangl2 était localisé du même côté que le récepteur Frizzled (Figure 32). Cette localisation hypothétique posait problème car elle allait à l'encontre de ce que nous observions dans les cellules épithéliales de l'aile de drosophile. En effet, chez la drosophile, Frizzled s'accumule du côté distal de la cellule hexagonale, à l'opposé de la localisation asymétrique de Vangl2.

Dans le nouveau modèle (Figure 32) que nous proposons, de nouvelles interactions entre Frizzled et Vangl2 se dessinent :

1. une opposition entre les localisations asymétriques de Frizzled et Vangl2 intrinsèque à la cellule ciliée et semblable à ce que nous voyons au sein d'une cellule épithéliale de l'aile de drosophile.
2. une accumulation de Vangl2 dans la cellule de soutien faisant face à une accumulation de Frizzled dans la cellule ciliée. Ceci est également cohérent avec ce que nous voyons à l'interface de deux cellules épithéliales chez la drosophile. C'est à cette interface que l'hypothèse de la boucle de rétrocontrôle s'opère.

La localisation de Vangl2, du côté distal de la cellule ciliée, coïncide avec la localisation distale de la protéine Dishevelled (Wang et al, 2005). Cette observation pourrait suggérer qu'il existe une voie Vangl2-Dishevelled au sein de la cellule sensorielle. Cette voie est d'autant plus probable qu'une interaction Vangl2-Dishevelled a déjà été montrée chez les mammifères.

La localisation de Vangl2 dans les cellules de soutien, schématisée en Figure 32, semble être en accord avec la localisation de pk2 dans le système vestibulaire. En effet, l'équipe de Lisa

Goodrich a montré que pk2 était asymétriquement localisé dans les cellules ciliées, mais également dans les cellules de soutien.

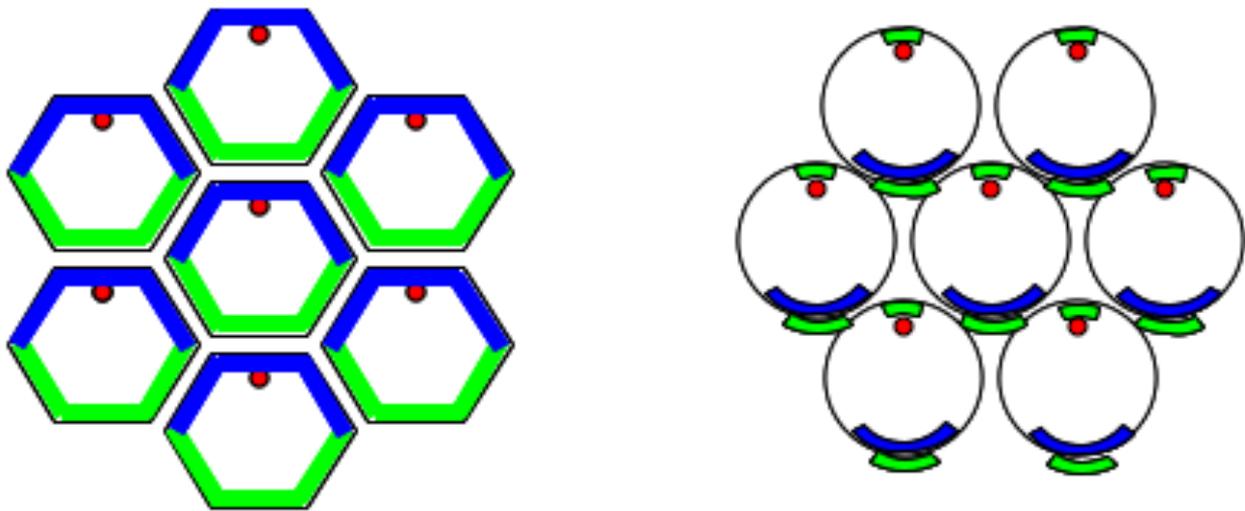


Figure 32 : Nouveau modèle de la PCP dans l'oreille interne de mammifère

Comparaison entre la localisation asymétrique de Vangl2 (vert) et Frizzled (bleu) dans les cellules épithéliales de l'aile de drosophile (gauche) et la localisation proposée dans l'épithélium cochléaire (droite).

Boucle de rétrocontrôle dans l'organe de Corti ?

Lawrence avait formulé une hypothèse, chez la drosophile, selon laquelle une boucle de rétrocontrôle permettrait de réguler l'asymétrie proximo-distale des protéines centrales de la PCP. Selon cette hypothèse, le récepteur Frizzled inhiberait l'activité de Flamingo au sein d'une cellule, et un signal serait transmis à la cellule voisine grâce à une communication Flamingo/Flamingo. Ce signal permettrait ainsi d'activer dans la cellule voisine la protéine Strabismus/Vang, qui à son tour inhiberait le récepteur Frizzled (Lawrence et al., 2004). Dans l'organe de Corti, nous pouvons supposé que cette boucle de rétrocontrôle s'opèrerait à la jonction entre une cellule ciliée et une cellule de soutien. Ceci pourrait signifier que les localisations asymétriques de Vangl2 et de Frizzled3 s'autoréguleraient. Cette régulation

pourrait se faire grâce à un signal transmis entre cellule ciliée et cellule de soutien par des liaisons homotypiques de type Celsr (homologue de Flamingo chez le mammifère).

Cette théorie est accréditée par les travaux récents de Marek Mlodzik. En effet, son équipe a mis en évidence que les boucles extracellulaires de Vangl2 seraient capables d'interagir avec l'extrémité N-terminale extracellulaire du récepteur Frizzled (Wu et al, 2010). Cette interaction pourrait servir à la transmission d'un signal PCP entre cellules sensorielles ciliées et cellules de soutien dans l'organe de Corti.

Les différentes approches afin d'étudier la régulation de l'asymétrie de Vangl2 dans l'organe de Corti

La nouvelle description de la localisation de Vangl2 dans l'organe de Corti révèle, potentiellement, que la protéine possède un rôle dans les cellules ciliées ainsi que dans les cellules de soutien. Cette caractérisation reste néanmoins descriptive et les mécanismes régulant cette localisation asymétrique demeurent méconnus.

Aux regards de la localisation de Vangl2, les mécanismes qui peuvent participer à l'établissement de cette asymétrie sont les suivants :

- Vangl2 est recruté au niveau de vésicules d'endocytose du côté proximal de la cellule ciliée. Cette endocytose pourrait permettre d'aboutir à une dégradation de la protéine du côté proximal de la cellule ciliée.
- Vangl2 est stabilisé du côté distal de la cellule de soutien. Cette stabilisation peut être assurée par des protéines d'échafaudage, ou bien par un recyclage membranaire.

Ces mécanismes sont représentés en Figure 33.

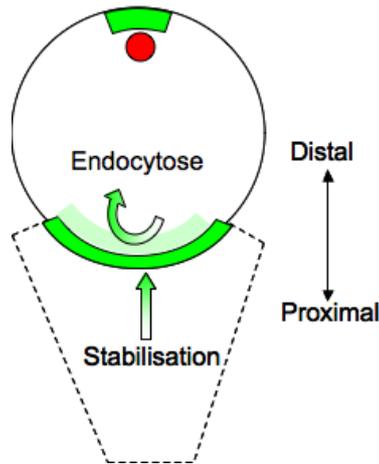


Figure 33 : Mécanismes pouvant réguler l'asymétrie de Vangl2 à la jonction entre cellule ciliée et cellule de soutien.

La cellule ciliée est représentée par un cercle, la cellule de soutien par un trapèze.

Les partenaires de Vangl2 pouvant potentiellement réguler sa localisation asymétrique

Nous avons focalisé notre étude sur les partenaires de Vangl2 ayant été mis en évidence au laboratoire, à savoir Scribble1 et GIPC1. Scribble1 et GIPC1 interagissent avec Vangl2 grâce à une interaction PDZ/PDZ-BDM et ces protéines ont des propriétés compatibles avec notre théorie sur la régulation de l'asymétrie de Vangl2 à la jonction entre cellule ciliée et cellule de soutien (Figure 33).

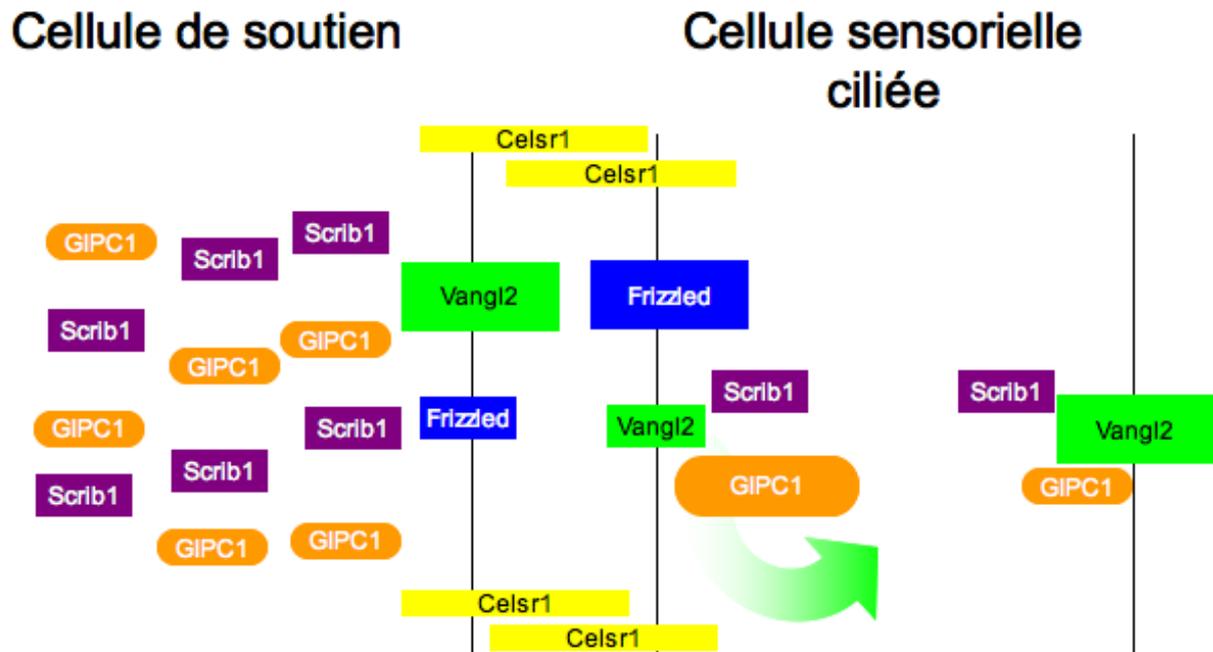


Figure 34 : Rôles potentiels de Scrib1 et GIPC1 sur la régulation de l'asymétrie de Vangl2.

Flèche verte : endocytose

Stratégie expérimentale

Afin de mieux comprendre l'établissement de l'asymétrie de Vangl2, nous avons utilisé plusieurs stratégies :

- nous avons surexprimé Vangl2 dans les cellules ciliées
- nous avons surexprimé des formes tronquées de la protéine Vangl2
- nous avons sous-exprimé GIPC1 par stratégie ARN d'interférence les gènes de la famille *GIPC* dans la cellule ciliée
- nous avons excisé le gène *Scrib1* dans les cellules de soutien et cellules ciliées par génération de souris KO conditionnel.

Nous avons ainsi analysé les phénotypes engendrés par ces différentes stratégies, et pouvant indiquer une perturbation de la PCP dans l'organe de Corti.

- Dans les cellules sensorielles ciliées, nous avons regardé l'orientation des touffes ciliaires.
- En ce qui concerne les cellules de soutien, il est difficile de savoir si ces cellules présentent un problème de polarité planaire, car elles ne présentent pas de touffes ciliaires. Nous avons toutefois regardé la position du kinocil au sein de ces cellules, et qui pourrait être un indicateur de la PCP
- Des anomalies d'extension convergente sont également le signe d'une perturbation de la PCP dans la cochlée.
- Nous avons regardé les répercussions que ces différentes stratégies avaient sur l'asymétrie de Vangl2.

Scrib1 est-il un signal de rétention pour Vangl2?

Nous avons constaté que la délétion du PDZ-BDM de Vangl2 dans l'organe de Corti entraînait, entre autres, une perte de la localisation basolatérale ainsi qu'une relocalisation de la protéine au niveau des stéréocils des cellules sensorielles ciliées. Nous nous sommes donc demandé si Scrib1, protéine d'échafaudage contrôlant la polarité apico-basale et interacteur de Vangl2 via une liaison PDZ/PDZ-BDM, pouvait participer à son maintien au niveau des membranes baso-latérales. La stratégie que nous avons utilisé afin de vérifier cette hypothèse est de générer une souris KO conditionnel, présentant une délétion du gène *Scribble1* spécifiquement dans les cellules sensorielles. L'analyse d'un immuno-marquage dirigé contre Vangl2 chez cette souris a révélé que l'asymétrie de Vangl2 est conservée à la jonction entre cellules ciliées et cellules de soutien, contrairement à ce qui est observé chez la souris mutante *Scrib1^{Cre/Crc}*. De plus, nous n'avons observé aucun marquage Vangl2 dans les touffes ciliaires des cellules sensorielles, élément comparable à la souris Circle-tail mutante pour *Scrib1*. Il nous a donc paru peu probable que Scrib1 participe au maintien basolatéral de Vangl2. L'équipe de Mlodzik a par ailleurs montré en 2010, chez la drosophile, que Scribble n'était pas nécessaire à la localisation apico-latérale de Strabismus dans les cellules épithéliales de l'aile. Nous pensons donc qu'un autre partenaire est impliqué dans le maintien apico-latéral de Vangl2 (Figure 35)

En ce qui concerne l'asymétrie distale de Vangl2 mise en évidence dans les cellules sensorielles en microscopie STED, nous n'avons pas pu déterminer si elle était maintenue

chez le mutant *Scrib1*^{ckO}. Nous avons toutefois observé que Vangl2 semblait être plus fortement exprimé dans les cellules sensorielles et que, potentiellement, la protéine Vangl2 accumulée en position distale était redistribuée sur les membranes apico-latérales. *Scrib1* pourrait donc participer au maintien de l'asymétrie de Vangl2 dans la cellule ciliée. Le rôle de *Scrib1* dans l'organe de Corti sur la localisation de Vangl2 est schématisé en Figure 38.

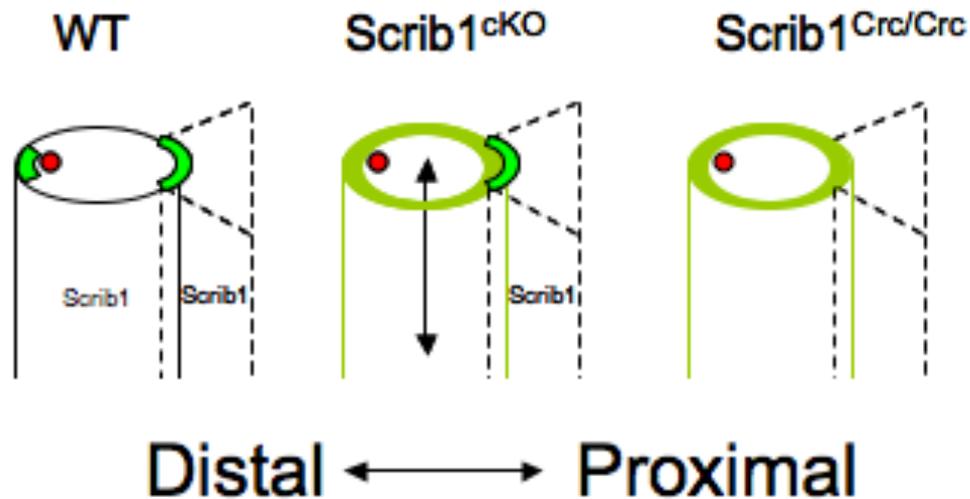


Figure 35 : Rôle de *Scrib1* sur la localisation de Vangl2 dans l'organe de Corti.

La délétion de *Scrib1* dans les cellules ciliées (*Scrib1*^{ckO}) se traduit par un maintien de l'asymétrie distale de Vangl2 (Croissant vert) dans la cellule de soutien (trapèze). Vangl2 semble toutefois se redistribuer sur le pourtour de la membrane apico-latérale de la cellule ciliée (Couronne verte). *Scrib1* pourrait donc participer au maintien de l'asymétrie distale de Vangl2 dans la cellule ciliée. La non accumulation de Vangl2 dans les touffes ciliaires nous laisse penser que *Scrib1* n'est pas une protéine permettant le maintien de Vangl2 selon l'axe apico-basal (flèche noire).

Scrib1 est nécessaire au signal PCP de façon autonome

La délétion spécifique de *Scrib1* dans les cellules sensorielles ciliées se traduit par une perturbation de l'orientation des touffes ciliaires des cellules ciliées externes appartenant à la troisième rangée, et dans une moindre mesure, de celles de la seconde rangée. Le phénotype des animaux *Scrib1*^{ckO} est donc similaire à ce qui est observé chez le mutant *Scrib1*^{Crc/Crc} ((-

)PCP ; Figure 36). Cette observation nous a permis de conclure que *Scrib1* était nécessaire de façon autonome dans la transmission du signal PCP dans l'organe de Corti.

Une analyse plus approfondie de la longueur et de l'épaisseur du tissu, chez le mutant *Scrib1*^{CKO}, nous a permis de déterminer dans un deuxième temps, que la délétion de *Scrib1* dans les cellules ciliées n'entraînait pas d'anomalie dans les mécanismes d'extension convergente, contrairement au phénotype observé chez le mutant *Scrib1*^{Crc/Crc}. ((-)CE ; Figure 36) (Montcouquiol et al., 2003). En d'autres termes, cela signifie que l'expression de *Scrib1* dans les cellules de soutien est nécessaire aux mécanismes d'extension convergente dans l'épithélium sensoriel.

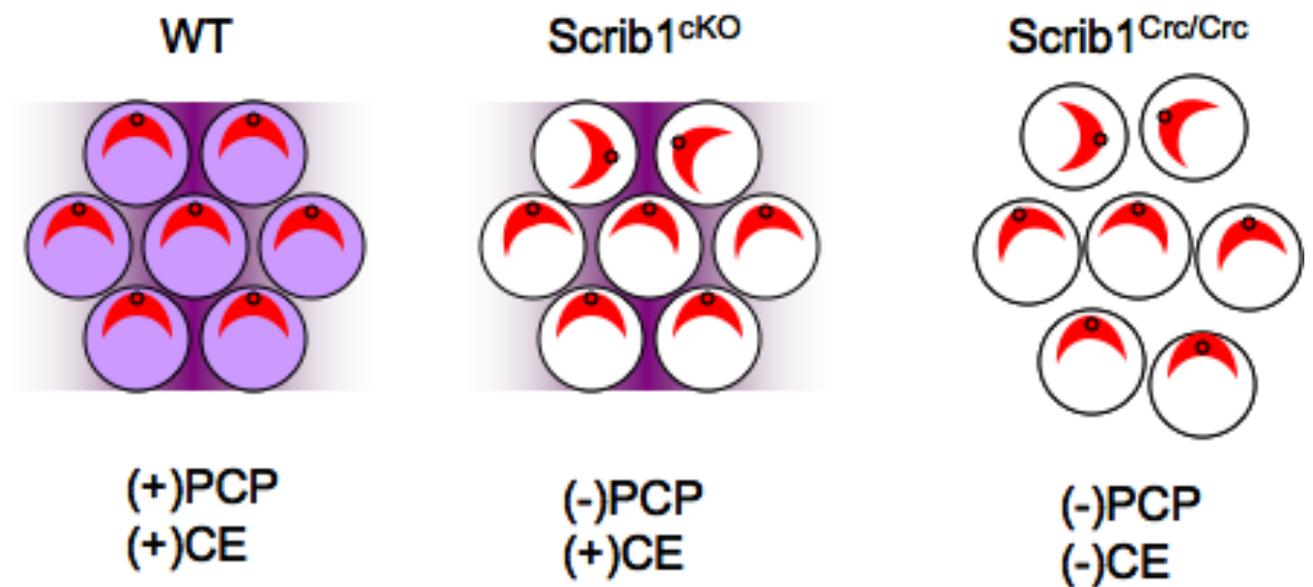


Figure 36 : Phénotypes observés chez des souris WT, *Scrib1*^{CKO} et *Scrib1*^{Crc/Crc}.

Zone violette : Zone d'expression du gène *Scrib1* ; Il faut noter l'épaisseur du tissu qui est plus importante chez la souris mutante *Scrib1*^{Crc/Crc}, dénotant une anomalie de l'extension convergente. (-)PCP = perturbation de la polarité planaire ; (-)CE = perturbation de l'extension convergente

Pour la première fois dans l'organe de Corti, nous avons pu faire une dichotomie entre un signal contrôlant l'extension convergente et un signal contrôlant la PCP. Les signaux CE et PCP seraient sous le contrôle de la protéine *Scrib1*, respectivement, dans les cellules de soutien et dans les cellules sensorielles (Figure 37).

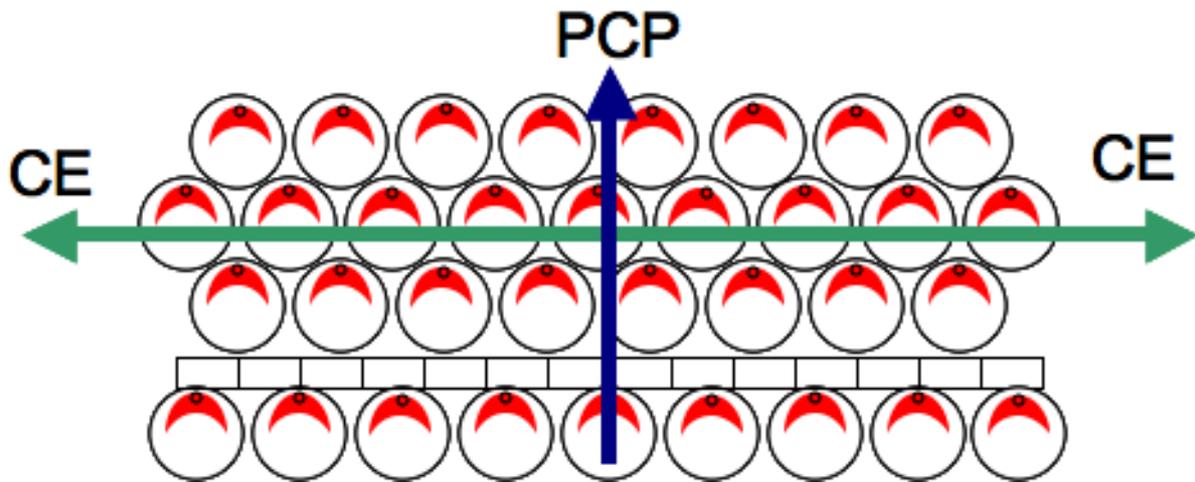


Figure 37 : Signaux de l'extension convergente et de la PCP régulé par Scrib1.

Flèche bleue : Signal PCP permettant l'orientation des touffes ciliaires. Flèche verte : Signal PCP permettant l'orientation des touffes ciliaires

Pourquoi GIPC1 était-il un bon candidat?

Le crible double hybride faisant appel à la partie C-terminale de Vangl2 nous a permis de mettre en évidence une interaction entre Vangl2 et GIPC1. GIPC1 a retenu notre attention car cette protéine est impliquée dans la régulation de nombreux récepteurs membranaires. GIPC1 fut définitivement jugé bon candidat aux regards de l'analyse de l'expression du gène *GIPC1* et de la localisation de la protéine pour laquelle il code dans l'organe de Corti. Les caractéristiques du gène *GIPC1* sont les suivantes :

- *GIPC1* est exprimé à la fois dans les cellules de soutien et dans les cellules sensorielles.
- la protéine pour laquelle il code présente une localisation largement cytosolique dans les cellules de soutien et s'accumule asymétriquement dans les cellules ciliées. En effet, GIPC1 est préférentiellement localisé du côté proximal des cellules ciliées.

La localisation de GIPC1 est donc compatible, comme le montre la Figure 34, avec un rôle dans la régulation de Vangl2 à la jonction entre cellules de soutien et cellules ciliées, puisque GIPC s'accumule là où l'accumulation de Vangl2 est la plus faible.

GIPC1 participe dans le trafic intracellulaire de Vangl2 dans l'organe de Corti

Nous avons montré par une approche *in vitro*, que Vangl2, GIPC1 et la myosine VI formaient un complexe. Ce complexe semble dépendant du domaine PDZ de GIPC1. Les complexes entre des récepteurs membranaires et GIPC1/myosine VI ont déjà été montrés dans la littérature (Naccache et al., 2006). Cette interaction permet la formation de clusters à la surface de la membrane plasmique qui seront ensuite recrutés vers des vésicules d'endocytose. En accord avec la littérature, nous avons également montré que les « clusters » Vangl2/GIPC1/myosine VI étaient remobilisés vers des vésicules d'endocytose, par des expérimentations faisant appel à la transferrine. La myosine VI est connue pour être exprimée dans les cellules ciliées de l'organe de Corti. L'analyse de souris Snell's Waltzer mutante pour le gène de la myosine VI a révélé que Vangl2 était beaucoup plus accumulé à la jonction entre cellule de soutien et cellule ciliée. Ce phénotype pourrait s'expliquer par la perte du complexe Vangl2/GIPC1/myosine VI, se traduisant alors par un recrutement plus faible de Vangl2 du côté proximal des cellules ciliées vers les vésicules d'endocytose.

GIPC1 participe à l'intégrité de la cellule ciliée

L'analyse de l'oreille interne d'une souris mutante pour *GIPC1* n'a révélé aucun problème de type PCP dans l'organe de Corti. L'absence de phénotype de type PCP dans l'oreille est semblable à l'absence de phénotype observée chez un mutant GIPC1 par l'équipe de Mlodzik dans le *notum* de drosophile (Djiane and Mlodzik, 2010). Mlodzik a fait l'hypothèse selon laquelle la perte de GIPC1 était compensée par une protéine ayant la même fonction. Nous avons nous même montré que les gènes *GIPC2* et *GIPC3* étaient exprimés dans l'organe de Corti, et nous pensons que la perte d'un membre de la famille GIPC est compensée par les autres membres.

L'expression d'un shRNA dirigé contre les 3 gènes de la famille *GIPC* dans les cellules ciliées, se traduit par une altération de la formation de leurs touffes ciliaires, et de leurs plaques cuticulaires dans lesquelles les touffes ciliaires s'enchaînent. La position du cil primaire est également affectée. Ceci suggère que la maturité des cellules ciliées est affectée. Ce phénotype est proche de celui qui est observé chez les souris Snell's Waltzer, confortant ainsi l'hypothèse de la formation de complexe GIPC1/myosine VI dans les cellules ciliées. Récemment, la délétion du gène GIPC1 chez l'homme a été associée à des surdités (Bonaglia et al., 2010). La encore, un affaiblissement du complexe GIPC1/myosine VI serait impliqué. Pour finir, l'électroporation in utero d'un shRNA dirigé contre GIPC se traduit par une accumulation plus forte de Vangl2 dans la cellule. Là encore, ce phénotype peut être attribué à une diminution de l'endocytose de Vangl2 au niveau de la membrane plasmique des cellules ciliées.

La fonction de Vangl2 est dépendante du PDZ-BDM

Nous avons vu que la partie C-terminale de Vangl2 était hautement conservée et que le PDZ-BDM situé à son extrémité était essentiel à sa fonction. Nous avons montré, au cours de nos premières expérimentations, et ceci dans des lignées cellulaires, que la délétion du PDZ-BDM entraînait une accumulation anormale de Vangl2 au niveau du réticulum endoplasmique. La voie de sécrétion permettant d'adresser la protéine transmembranaire est donc altérée. En d'autre terme, le PDZ-BDM s'avère essentiel au trafic intracellulaire de Vangl2 et à son adressage au niveau de la membrane plasmique. Cette observation est à mettre en relation avec les observations des équipes de Merte et de Wansleben, qui ont montré en 2010, que Sec24b, protéine du manteau COPII, était nécessaire à l'emballage de Vangl2 dans des vésicules faisant la liaison entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Merte et al., 2010, Wansleben et al., 2010). Le PDZ-BDM de Vangl2 serait donc peut être nécessaire à cet emballage

Nous avons également vu dans la littérature que le PDZ-BDM de nombreuses protéines étaient nécessaires à leurs adressages basolatéraux ou apicaux dans des cellules épithéliales.

Afin de déterminer si le PDZ-BDM de Vangl2 est nécessaire à son adressage basolatéral dans les cellules sensorielles ciliées, nous avons surexprimé, dans l'organe de

Corti, une construction GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BDM}. Alors que la protéine fusion GFP-Vangl2 est correctement adressée à la membrane plasmique basolatérale des cellules sensorielles, la protéine fusion GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BDM} semble s'accumuler au niveau des membranes apicales et notamment au niveau des membranes des stéréocils constituant les touffes ciliaires. Cette observation semble indiquer que le PDZ-BDM est nécessaire à l'adressage membranaire de Vangl2, et que sa délétion entraîne une anomalie dans l'aiguillage des voies basolatérales/apicales.

A contrario la mutation d'un domaine dileucine situé dans l'extrémité C-terminale de Vangl2 ne semble pas affecter le trafic intracellulaire de la protéine, bien que ce domaine ait été impliqué dans l'adressage de nombreuses protéines vers les endosomes ou des lysosomes (Gabilondo et al, 1997).

La délétion du PDZ-BDM de Vangl2 n'est pas seulement associée à un mauvais adressage de la protéine dans les cellules ciliées de l'organe de Corti, mais aussi à une perte de fonction de la protéine. En effet, nous avons vu que la surexpression d'une construction GFP-Vangl2 dans une cellule sensorielle entraînait une mauvaise orientation de la touffe ciliaire, et donc une perturbation de la PCP.

La surexpression d'une construction GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BDM} n'entraîne pas une mauvaise orientation des touffes ciliaires, traduisant une perte de fonction de la protéine. Il est à l'heure actuelle difficile de déterminer si cette perte de fonction est liée au mauvais adressage de la protéine vers la membrane basolatérale empêchant ainsi à la protéine d'inverser la boucle de rétrocontrôle à la jonction cellule ciliée cellule de soutien, ou bien si l'absence du PDZ-BDM de Vangl2 empêche la liaison d'un effecteur qui servirait à la transmission d'un signal PCP intracellulaire.

L'une des perspectives envisagée à court terme est d'électroporer la construction GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BDM} dans des cellules de soutien. En effet, nous avons démontré que plus forte accumulation de Vangl2 dans l'organe de Corti s'opérait dans les cellules de soutien.

Il serait intéressant de regarder si la construction GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BDM} exerce un effet dominant négatif sur le Vangl2 endogène. En effet, la littérature a déjà montré que Vangl2 pouvait former des dimères et qu'un dimère Vangl2/Vangl2^{ΔPDZ-BDM} était inactif. La formation de dimères Vangl2/GFP-Vangl2^{ΔPDZ-BDM} dans les cellules de soutien pourrait ainsi se traduire par une perturbation de la transmission d'un signal PCP.

Le PDZ-BDM de Vangl2 se limite-il aux quatre derniers acides aminés de la protéine?

Au cours de nos expérimentations, afin de tronquer le PDZ-BDM de Vangl2, nous avons généré deux types de construction :

- Une construction présentant une troncation des quatre derniers acides aminés de Vangl2 (Vangl2^{Δ4}), tronquant exclusivement le motif ETSV (X-S/T-X-Φ).
- Une construction présentant une troncation des douze derniers acides aminés de Vangl2 et que nous avons appelé Vangl2^{ΔPDZ-BDM}

Dans notre étude fonctionnelle, seule la délétion des douze derniers acides aminés de Vangl2 est associée à un phénotype dans l'organe de Corti. Cette observation est en accord avec toutes les études ayant mis en évidence le rôle du PDZ-BDM dans la fonction de Vangl2. En effet, ces études ont en général fait appel à des constructions présentant une troncation des 10 derniers acides aminés de la protéine (Darken et al., 2002, Goto and Keller, 2002, Park and Moon, 2002). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse selon laquelle le PDZ-BDM de Vangl2 ne serait pas restreint aux quatre derniers acides aminés de la protéine. Cette hypothèse serait également en accord avec les études des interactions PDZ/PDZ-BDM mis en jeu pour les partenaires de Vangl2. En effet, nous avons, nous-même, mis en évidence que la délétion des quatre derniers acides aminés de la protéine n'était pas suffisante pour s'affranchir de l'interaction avec GIPC1. Ceci est également valable pour l'interaction entre Strabismus et Dishevelled chez le Xénope, mais également entre Strabismus et Scrib1 chez la drosophile selon l'équipe de Mlodzik. Notre équipe a toutefois démontré chez la souris que la délétion des quatre derniers acides aminés était suffisante pour s'affranchir de l'interaction entre Vangl2 et Scrib1.

Plus largement dans la littérature, il a été mis en évidence que l'acide aminé situé juste en amont du PDZ-BDM participait également aux interactions PDZ/PDZ-BDM, ce qui renforce l'idée selon laquelle les acides aminés en amont du PDZ-BDM de Vangl2 pourraient jouer un rôle dans sa fonction.

Effet cellule autonome et non autonome de Vangl2 dans l'organe de Corti

Nous avons montré que la surexpression d'une construction GFP-Vangl2, au sein d'une cellule sensorielle, entraîne, lorsqu'elle est forte, une perturbation de l'orientation de la touffe ciliaire. Nous avons formulé deux hypothèses quant aux raisons de cette perturbation locale de la polarité planaire :

1. Vangl2 possède, dans l'organe de Corti, un rôle autonome dans la régulation de la PCP. L'asymétrie distale de Vangl2 dans la cellule ciliée pourrait être nécessaire à un signal PCP permettant l'orientation de la touffe ciliaire. La localisation asymétrique de Vangl2 serait perturbée par la surexpression d'une construction GFP-Vangl2 qui se localise alors uniformément sur la membrane apico-latérale de la cellule ciliée. La perturbation locale du signal PCP se traduirait, au final, par un défaut dans l'orientation de la touffe ciliaire.

2. La deuxième hypothèse s'appuie sur la théorie de la boucle de rétrocontrôle qui pourrait se situer, dans l'organe de Corti, à l'interface entre cellules ciliées et cellules de soutien. Comme nous l'avons déjà vue, cette boucle de rétrocontrôle permettrait de créer un biais. Ceci permettrait d'avoir une forte accumulation de Vangl2 du côté distal la cellule de soutien, et dans une moindre mesure une accumulation du côté proximal de la cellule ciliée. L'accumulation de Frizzled serait le miroir de la localisation de Vangl2. La surexpression de Vangl2 dans la cellule ciliée inverserait le biais créé par la boucle de rétrocontrôle. Cette inversion se traduirait alors par une perturbation localisée de la PCP.

Un immuno-marquage dirigé contre des protéines centrales de la PCP pourrait être réalisé afin de vérifier cette théorie. Cela pourrait se traduire, par exemple, par une accumulation distale de Frizzled dans la cellule de soutien, à la place d'une accumulation proximale dans la cellule ciliée.

Nous avons vu au sein des épithéliums de drosophile que Vangl2 possédait un rôle non autonome dans la régulation de la PCP (Figure 38). Ainsi, la surexpression de Vangl2 dans des cellules épithéliales entraîne une anomalie non seulement au sein des cellules qui surexpriment le gène , mais aussi au sein des cellules qui les entourent.

Afin de déterminer si Vangl2 possède un rôle non autonome au sein de l'organe de Corti, nous avons quantifié les angles de déviation des touffes ciliaires de cellules sensorielles entourant une cellule surexprimant notre construction GFP- Vangl2. Cette quantification a révélé que les cellules environnantes ne présentaient pas de perturbation de leur PCP (Figure 39).

Cela signifie-il pour autant que Vangl2 ne possède pas de rôle non autonome dans l'organe de Corti? Je pense qu'il est difficile dans l'état actuel des choses de répondre à cette question. Chez la drosophile, l'effet non autonome a été mis en évidence par l'utilisation d'individus mosaïques. L'effet non autonome de Vangl2 ou de Frizzled est visible au niveau de cellules entourant un groupe de cellules surexprimant Vangl2 ou muté pour ce gène. Il est donc possible que l'effet non autonome ne soit seulement visible quand un groupe de cellules adjacentes présente une surexpression Vangl2 ou une mutation de ce gène.

L'effet non autonome de Vangl2 ne pourrait être visible que dans les cellules de soutien. Il reste difficile pour l'instant de savoir si ces cellules présentent un défaut de PCP.

La meilleure façon de mettre en évidence un rôle non autonome de Vangl2 dans l'organe de Corti serait donc de générer un individu mosaïque mutant ou gain de fonction, ou bien de parvenir à surexprimer Vangl2 dans un groupe de cellules adjacentes.

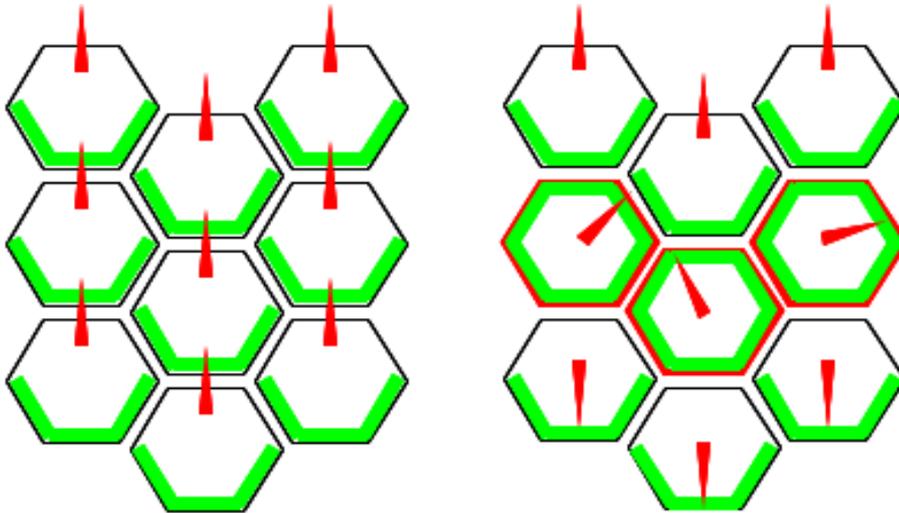


Figure 38 : Effet non autonome de Strabismus dans l'aile de drosophile.

A gauche : Epithélium d'aile de drosophile WT ; A droite : Epithélium d'aile de drosophile mosaïque. Les clones surexprimant Vangl2 sont indiqués en rouge.

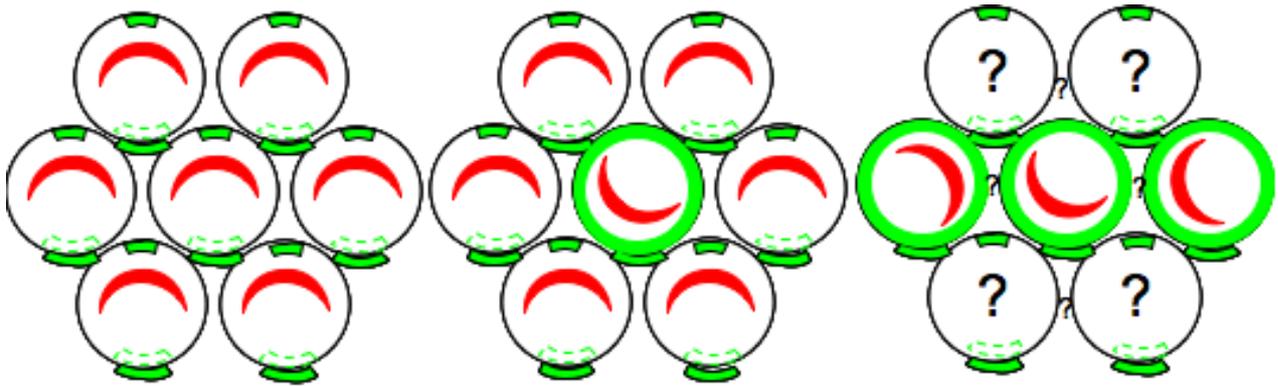


Figure 39 : Effet autonome et non autonome de Vangl2 dans l'organe de Corti.

L'interaction Vangl2-Frizzled participe t-elle à la transmission d'un signal PCP?

Nous avons vu que potentiellement une boucle de rétrocontrôle existait à la jonction d'une cellule ciliée et d'une cellule de soutien, et cette boucle pourrait créer une l'interface Vangl2-Frizzled entre ces deux types cellulaires. Nous avons également vu que le domaine CRD de l'extrémité N-terminale de Frizzled était capable d'interagir avec les boucles extracellulaires de Vangl2. Dans notre théorie selon laquelle il existerait une communication entre Frizzled et Vangl2 à la jonction entre une cellule ciliée et une cellule de soutien, les boucles extracellulaires de Vangl2 joueraient donc un rôle capital.

L'alignement des séquences peptidiques de la première boucle extracellulaire des homologues de Vangl2, dans différentes espèces, a montré que deux résidus cystéine étaient parfaitement conservés. Cette première boucle étant de taille réduite (21 aa), il est donc probable que ces deux cystéines forment un pont disulfure. Aussi, ce pont disulfure pourrait être nécessaire au maintien de la conformation tridimensionnelle de la boucle.

Au cours de nos expérimentations, nous avons démontré que la surexpression, dans l'organe de Corti, d'une construction GFP-Vangl2^{C141A-C145A} portant une mutation au niveau des deux cystéines de la première boucle extracellulaire, entraînait systématiquement, dans les cellules sensorielles et dans les cellules de soutien, une localisation asymétrique de la protéine encodée par le vecteur. Cette localisation est conforme à ce que nous avons observé en

microscopie STED. Le phénotype est également associé à une expression plus faible de protéine encodée, ou par une dégradation de celle-ci.

Afin d'expliquer le phénotype observé, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle la mutation de cette boucle pourrait mimer une activation de Vangl2. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle la protéine GFP-Vangl2^{C141A-C145A} semble être mieux régulée dans la cellule.

GFP-Vangl2^{C141A-C145A} étant mieux régulé, l'asymétrie distale et endogène de Vangl2 ne serait pas perturbée, ainsi que le biais moléculaire à l'interface cellules ciliées-cellules de soutien. Les autres éléments allant en faveur d'une éventuelle meilleure régulation du taux de la protéine, sont :

- L'accumulation de la construction GFP-Vangl2^{C141A-C145A} dans un organite qui, aux regards de sa localisation dans les cellules ciliées externes, semble correspondre au « Hensen Body ». Le « Hensen Body » est un organite localisé dans la région apicale de cellules ciliées externes, dérivé du réticulum endoplasmique, et qui pourrait participer à la dégradation de certaines protéines. L'accumulation de la construction GFP-Vangl2^{C141A-C145A} dans cet organite éviterait donc une accumulation excessive de la protéine à la membrane plasmique, empêchant ainsi de perturber l'asymétrie de Vangl2
- L'absence de déviation de la touffe ciliaire dans les cellules ciliée électroporées avec la construction GFP-Vangl2^{C141A-C145A}. Cet élément va dans le sens d'une absence de perturbation du signal PCP dans l'organe de Corti.

Références

- Adler PN (Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2:525-535.2002).
- Adler PN, Lee H (Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13:635-640.2001).
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaikat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Griffith AJ, Friedman TB, Wilcox ER (Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet* 72:1315-1322.2003).
- Aschenbrenner L, Lee T, Hasson T (Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* 14:2728-2743.2003).
- Awan A, Lucic MR, Shaw DM, Sheppard F, Westwater C, Lyons SA, Stern PL (5T4 interacts with TIP-2/GIPC, a PDZ protein, with implications for metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1030-1036.2002).
- Axelrod JD (Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev* 15:1182-1187.2001).
- Axelrod JD (Studies of epithelial PCP. *Semin Cell Dev Biol* 20:956.2009).
- Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N (Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12:2610-2622.1998).
- Bastock R, Strutt H, Strutt D (Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development* 130:3007-3014.2003).
- Bonaglia MC, Marelli S, Novara F, Commodaro S, Borgatti R, Minardo G, Memo L, Mangold E, Beri S, Zucca C, Brambilla D, Molteni M, Giorda R, Weber RG, Zuffardi O (Genotype-phenotype relationship in three cases with overlapping 19p13.12 microdeletions. *Eur J Hum Genet*.2010).
- Brigande JV, Gubbels SP, Woessner DW, Jungwirth JJ, Bresee CS (Electroporation-mediated gene transfer to the developing mouse inner ear. *Methods Mol Biol* 493:125-139.2009).
- Bunn RC, Jensen MA, Reed BC (Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 10:819-832.1999).

- Chae J, Kim MJ, Goo JH, Collier S, Gubb D, Charlton J, Adler PN, Park WJ (The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development* 126:5421-5429.1999).
- Chen WS, Antic D, Matis M, Logan CY, Povelones M, Anderson GA, Nusse R, Axelrod JD (Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin *flamingo* mediate intercellular polarity signaling. *Cell* 133:1093-1105.2008).
- Chittenden TW, Claes F, Lanahan AA, Autiero M, Palac RT, Tkachenko EV, Elfenbein A, Ruiz de Almodovar C, Dedkov E, Tomanek R, Li W, Westmore M, Singh JP, Horowitz A, Mulligan-Kehoe MJ, Moodie KL, Zhuang ZW, Carmeliet P, Simons M (Selective regulation of arterial branching morphogenesis by *synectin*. *Dev Cell* 10:783-795.2006).
- Darken RS, Scola AM, Rakeman AS, Das G, Mlodzik M, Wilson PA (The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J* 21:976-985.2002).
- De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG (GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12340-12345.1998).
- Devenport D, Fuchs E (Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nat Cell Biol* 10:1257-1268.2008).
- Djiane A, Mlodzik M (The *Drosophila* GIPC homologue can modulate myosin based processes and planar cell polarity but is not essential for development. *PLoS One* 5:e11228.2010).
- Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J, Shi D (Role of *frizzled 7* in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 127:3091-3100.2000).
- Eaton S (Planar polarization of *Drosophila* and vertebrate epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 9:860-866.1997).
- El Mourabit H, Poinat P, Koster J, Sondermann H, Wixler V, Wegener E, Laplantine E, Geerts D, Georges-Labouesse E, Sonnenberg A, Aumailley M (The PDZ domain of *TIP-2/GIPC* interacts with the C-terminus of the integrin $\alpha 5$ and $\alpha 6$ subunits. *Matrix Biol* 21:207-214.2002).

- Eldstrom J, Doerksen KW, Steele DF, Fedida D (N-terminal PDZ-binding domain in Kv1 potassium channels. *FEBS Lett* 531:529-537.2002).
- Fanto M, Mlodzik M (Asymmetric Notch activation specifies photoreceptors R3 and R4 and planar polarity in the *Drosophila* eye. *Nature* 397:523-526.1999).
- Gao Y, Li M, Chen W, Simons M (Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol* 184:373-379.2000).
- Goto T, Keller R (The planar cell polarity gene *strabismus* regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev Biol* 247:165-181.2002).
- Gubb D, Green C, Huen D, Coulson D, Johnson G, Tree D, Collier S, Roote J (The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* 13:2315-2327.1999).
- Guirao B, Meunier A, Mortaud S, Aguilar A, Corsi JM, Strehl L, Hirota Y, Desoeuvre A, Boutin C, Han YG, Mirzadeh Z, Cremer H, Montcouquiol M, Sawamoto K, Spassky N (Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat Cell Biol* 12:341-350.2010).
- Guo N, Hawkins C, Nathans J (Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9277-9281.2004).
- Hasson T (Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 116:3453-3461.2003).
- Hirakawa T, Galet C, Kishi M, Ascoli M (GIPC binds to the human lutropin receptor (hLHR) through an unusual PDZ domain binding motif, and it regulates the sorting of the internalized human choriogonadotropin and the density of cell surface hLHR. *J Biol Chem* 278:49348-49357.2003).
- Hu LA, Chen W, Martin NP, Whalen EJ, Premont RT, Lefkowitz RJ (GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation. *J Biol Chem* 278:26295-26301.2003).
- Jeanneteau F, Guillin O, Diaz J, Griffon N, Sokoloff P (GIPC recruits GAIP (RGS19) to attenuate dopamine D2 receptor signaling. *Mol Biol Cell* 15:4926-4937.2004).
- Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M (Prickle and *Strabismus* form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J* 22:4409-4420.2003).

- Jessen JR, Topczewski J, Bingham S, Sepich DS, Marlow F, Chandrasekhar A, Solnica-Krezel L (Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat Cell Biol* 4:610-615.2002).
- Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, Petit C, Yoder BK, Chen P (Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet* 40:69-77.2008).
- Katoh M (GIPC gene family (Review). *Int J Mol Med* 9:585-589.2002).
- Kedlaya RH, Bhat KM, Mitchell J, Darnell SJ, Setaluri V (TRP1 interacting PDZ-domain protein GIPC forms oligomers and is localized to intracellular vesicles in human melanocytes. *Arch Biochem Biophys* 454:160-169.2006).
- Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, Salem S, Finnell RH, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P (Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects. *Hum Mutat* 30:E706-715.2009).
- Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, Pauwels E, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P (Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clin Genet*.2010).
- Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, Kirillova I, De Marco P, Merello E, Hayes JM, Wallingford JB, Drapeau P, Capra V, Gros P (Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N Engl J Med* 356:1432-1437.2007).
- Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P (Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet* 28:251-255.2001).
- Kiely PA, Sant A, O'Connor R (RACK1 is an insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor-interacting protein that can regulate IGF-1-mediated Akt activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 277:22581-22589.2002).
- Kiernan AE, Cordes R, Kopan R, Gossler A, Gridley T (The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development* 132:4353-4362.2005).
- Kirikoshi H, Katoh M (Molecular cloning and characterization of human GIPC2, a novel gene homologous to human GIPC1 and Xenopus Kermit. *Int J Oncol* 20:571-576.2002).

- Klein TJ, Mlodzik M (Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:155-176.2005).
- Krasnow RE, Adler PN (A single frizzled protein has a dual function in tissue polarity. *Development* 120:1883-1893.1994).
- Krasnow RE, Wong LL, Adler PN (Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in *Drosophila*. *Development* 121:4095-4102.1995).
- Lawrence PA, Casal J, Struhl G (Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of *Drosophila*. *Development* 131:4651-4664.2004).
- Lawrence PA, Struhl G, Casal J (Planar cell polarity: one or two pathways? *Nat Rev Genet* 8:555-563.2007).
- Lee JD, Hempel N, Lee NY, Blobe GC (The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling. *Carcinogenesis* 31:175-183.2010).
- Lee OK, Frese KK, James JS, Chadda D, Chen ZH, Javier RT, Cho KO (Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat Cell Biol* 5:987-993.2003).
- Lindqvist M, Horn Z, Bryja V, Schulte G, Papachristou P, Ajima R, Dyberg C, Arenas E, Yamaguchi TP, Lagercrantz H, Ringstedt T (Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. *J Cell Sci* 123:472-483.2010).
- Liu TF, Kandala G, Setaluri V (PDZ domain protein GIPC interacts with the cytoplasmic tail of melanosomal membrane protein gp75 (tyrosinase-related protein-1). *J Biol Chem* 276:35768-35777.2001).
- Lou X, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG (GAIP, GIPC and Galphai3 are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function. *J Am Soc Nephrol* 13:918-927.2002).
- Lu X, Borchers AG, Jolicœur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M (PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430:93-98.2004).
- Maday S, Anderson E, Chang HC, Shorter J, Satoh A, Sfakianos J, Folsch H, Anderson JM, Walther Z, Mellman I (A PDZ-binding motif controls basolateral targeting of syndecan-1 along the biosynthetic pathway in polarized epithelial cells. *Traffic* 9:1915-1924.2008).
- Margolis B, Borg JP (Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci* 118:5157-5159.2005).

- Maximov A, Sudhof TC, Bezprozvanny I (Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J Biol Chem* 274:24453-24456.1999).
- May-Simera HL, Kai M, Hernandez V, Osborn DP, Tada M, Beales PL (Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol* 345:215-225.2010a).
- May-Simera HL, Kai M, Hernandez V, Osborn DP, Tada M, Beales PL (Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol*.2010b).
- Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, Schekman R, Ginty DD (Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nat Cell Biol* 12:41-46; sup pp 41-48.2010).
- Milewski MI, Lopez A, Jurkowska M, Larusch J, Cutting GR (PDZ-binding motifs are unable to ensure correct polarized protein distribution in the absence of additional localization signals. *FEBS Lett* 579:483-487.2005).
- Montcouquiol M, Kelley MW (Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci* 23:9469-9478.2003).
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW (Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423:173-177.2003).
- Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW (Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* 26:5265-5275.2006).
- Muders MH, Vohra PK, Dutta SK, Wang E, Ikeda Y, Wang L, Udugamasooriya DG, Memic A, Rupasinghe CN, Baretton GB, Aust DE, Langer S, Datta K, Simons M, Spaller MR, Mukhopadhyay D (Targeting GIPC/synectin in pancreatic cancer inhibits tumor growth. *Clin Cancer Res* 15:4095-4103.2009).
- Naccache SN, Hasson T, Horowitz A (Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12735-12740.2006).
- Park M, Moon RT (The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol* 4:20-25.2002).

- Phillips HM, Hildreth V, Peat JD, Murdoch JN, Kobayashi K, Chaudhry B, Henderson DJ (Non-cell-autonomous roles for the planar cell polarity gene *Vangl2* in development of the coronary circulation. *Circ Res* 102:615-623.2008).
- Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, Hildreth V, Peat JD, Anderson RH, Copp AJ, Chaudhry B, Henderson DJ (Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circ Res* 101:137-145.2007).
- Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel KP, Dai X, Chen P (Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* 306:121-133.2007).
- Rawls AS, Guinto JB, Wolff T (The cadherins *fat* and *dachsous* regulate dorsal/ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Curr Biol* 12:1021-1026.2002).
- Rida PC, Chen P (Line up and listen: Planar cell polarity regulation in the mammalian inner ear. *Semin Cell Dev Biol* 20:978-985.2009).
- Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL (Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135-1140.2005).
- Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, Quaggin SE, Harrison R, Mount R, McNeill H (Loss of *Fat4* disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet* 40:1010-1015.2008).
- Saitoh T, Mine T, Katoh M (Molecular cloning and characterization of human GIPC3, a novel gene homologous to human GIPC1 and GIPC2. *Int J Oncol* 20:577-582.2002).
- Sanggaard KM, Kjaer KW, Eiberg H, Nurnberg G, Nurnberg P, Hoffman K, Jensen H, Sorum C, Rendtorff ND, Tranebjaerg L (A novel nonsense mutation in *MYO6* is associated with progressive nonsyndromic hearing loss in a Danish DFNA22 family. *Am J Med Genet A* 146A:1017-1025.2008).
- Schulte G, Bryja V (The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:518-525.2007).
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73-77.1997).

- Strutt D (Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* 130:4501-4513.2003).
- Strutt D, Strutt H (Differential activities of the core planar polarity proteins during *Drosophila* wing patterning. *Dev Biol* 302:181-194.2007).
- Strutt DI (Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol Cell* 7:367-375.2001).
- Strutt DI (The asymmetric subcellular localisation of components of the planar polarity pathway. *Semin Cell Dev Biol* 13:225-231.2002).
- Tan C, Deardorff MA, Saint-Jeannet JP, Yang J, Arzoumanian A, Klein PS (Kermit, a frizzled interacting protein, regulates frizzled 3 signaling in neural crest development. *Development* 128:3665-3674.2001).
- Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN (Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* 150:199-210.1998).
- Torban E, Patenaude AM, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G, Epstein DJ, Gros P (Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3449-3454.2008).
- Tree DR, Shulman JM, Rousset R, Scott MP, Gubb D, Axelrod JD (Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* 109:371-381.2002).
- Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T (Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* 98:585-595.1999).
- Von Kap-Herr C, Kandala G, Mann SS, Hart TC, Pettenati MJ, Setaluri V (Assignment of PDZ domain-containing protein GIPC gene (C19orf3) to human chromosome band 19p13.1 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 89:234-235.2000).
- Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X (C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *FASEB J* 20:1513-1515.2006a).
- Wang Y, Guo N, Nathans J (The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J Neurosci* 26:2147-2156.2006b).

- Wansleeben C, Feitsma H, Montcouquiol M, Kroon C, Cuppen E, Meijlink F (Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development* 137:1067-1073.2010).
- Willig KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW (STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440:935-939.2006).
- Wolff T, Rubin GM (Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development* 125:1149-1159.1998).
- Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J (Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 12:1251-1260.2003).
- Wu J, Jenny A, Mirkovic I, Mlodzik M (Frizzled-Dishevelled signaling specificity outcome can be modulated by Diego in *Drosophila*. *Mech Dev* 125:30-42.2008).
- Wu J, Mlodzik M (The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev Cell* 15:462-469.2008).
- Wu J, Mlodzik M (A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. *Trends Cell Biol* 19:295-305.2009).
- Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, Tarui H, Sasaki H (Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* 15:23-36.2008).
- Yates LL, Schnatwinkel C, Murdoch JN, Bogani D, Formstone CJ, Townsend S, Greenfield A, Niswander LA, Dean CH (The PCP genes *Celsr1* and *Vangl2* are required for normal lung branching morphogenesis. *Hum Mol Genet* 19:2251-2267.2010).
- Yi Z, Petralia RS, Fu Z, Swanwick CC, Wang YX, Prybylowski K, Sans N, Vicini S, Wenthold RJ (The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking. *J Neurosci* 27:11663-11675.2007).
- Zeidler MP, Perrimon N, Strutt DI (The four-jointed gene is required in the *Drosophila* eye for ommatidial polarity specification. *Curr Biol* 9:1363-1372.1999).
- Zhang Y, Chittenden T, Simons M (Characterization of synectin expression and promoter activity. *Gene* 342:29-34.2004).

Annexes

819.8/B23

Identification of a novel interactor for Vangl2

A. GIESE¹, C. MAZZOCCHI¹, E. RICHARD¹, D. SCHEFFER¹, C. SAGE¹, N. SANS², *M. MONTCOUQUOL¹,
¹Developmental Neurosciences, ²Molecular and Cellular Neurobiology, INSERM U862 - Avenir, Bordeaux, France



Background

The Van Gogh-like 2 (Vangl2) gene encodes a four-transmembrane domain protein that controls planar cell polarity (PCP) in *Drosophila*. In 2003, Montcouquiol et al. showed that Vangl2 also controls PCP in mammals, and that the protein is asymmetrically localized in cochlear hair cells (Montcouquiol et al., 2006).

We previously showed that the PDZ-binding domain (PDZ-BD) at the end of the C-terminus of Vangl2 is required for its interaction with Scribble1, another PCP molecule in mammals (Montcouquiol et al., 2006). However, very little is known about other interacting partners for Vangl2, its regulation, or the molecular cascades it activates.

We sought to find interactors for Vangl2 using a yeast-two-hybrid (Y2H) screening strategy in the C-terminal portion of Vangl2 (including the PDZ-BD) as a bait.

Our screening identifies GIPC1 as a putative interacting partner for Vangl2, and our study validates this interaction.

1. A yeast two-hybrid screening assay identifies GIPC1 as a binding partner for Vangl2

A. Schematic of the yeast two-hybrid assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) and prey constructs (GIPC1 and other clones) were co-transformed into yeast cells. Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

B. Sequence alignment of the 13 clones identified during the Y2H screen. The ORF of mouse GIPC1 is shown. The bait construct is indicated by a red arrow. The prey constructs are indicated by colored arrows. The bait construct is a 4-transmembrane domain protein, with an intracellular C-terminus ending with a PDZ-binding domain (PDZ-BD). We used a portion of the C-terminus of Vangl2 (bait) in our Y2H screening. The prey constructs are GIPC1 and other clones. GIPC1 is a 582 aa cytosolic protein with a central PDZ domain.

C. Schematic representation of the yeast two-hybrid assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) and prey constructs (GIPC1 and other clones) were co-transformed into yeast cells. Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

D. Left: GST pull-down assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) was immobilized on a glutathione (GST) resin. The prey construct (GIPC1) was co-purified with the bait construct. Right: Coomassie-stained gel showing the pull-down assay. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

2. GIPC1 and Vangl2 interact through a PDZ binding domain

A. Schematic of the C-terminal (C-ter) of Vangl2 protein. The amino acids indicate the various functional motifs to generate the last 4 amino acids (PDZ-BD), or the last 12 amino acids (D12) of the bait.

B. Yeast two-hybrid screening. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) was co-transformed with prey constructs (GIPC1 and other clones). Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

C. Summary of the yeast two-hybrid assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) and prey constructs (GIPC1 and other clones) were co-transformed into yeast cells. Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

D. Left: GST pull-down assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) was immobilized on a glutathione (GST) resin. The prey construct (GIPC1) was co-purified with the bait construct. Right: Coomassie-stained gel showing the pull-down assay. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

3. Vangl2 and GIPC1 colocalization requires the PDZ-BD

A. Schematic representation of the yeast two-hybrid assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) and prey constructs (GIPC1 and other clones) were co-transformed into yeast cells. Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

B. Co-localization of Vangl2 and GIPC1 in early endosomes. COS7 cells were transiently cotransfected with myc-GIPC1 and GFP-Vangl2. The cells were immunostained for myc-GIPC1 (red) and GFP-Vangl2 (green). The cells were then analyzed by confocal microscopy. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

C. Summary of the yeast two-hybrid assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) and prey constructs (GIPC1 and other clones) were co-transformed into yeast cells. Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

D. Left: GST pull-down assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) was immobilized on a glutathione (GST) resin. The prey construct (GIPC1) was co-purified with the bait construct. Right: Coomassie-stained gel showing the pull-down assay. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

4. GIPC1 and Vangl2 colocalize in early endosomes

A. Co-localization of Vangl2 and GIPC1 in early endosomes. COS7 cells were transiently cotransfected with myc-GIPC1 and GFP-Vangl2. The cells were immunostained for myc-GIPC1 (red) and GFP-Vangl2 (green). The cells were then analyzed by confocal microscopy. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

B. Quantification of the colocalization of GIPC1 and Vangl2 in early endosomes. The cells were analyzed by confocal microscopy. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

5. Vangl2 PDZ-BD is required for cellular trafficking.

A. COS7 cells were transiently cotransfected with myc-GIPC1 and GFP-Vangl2. The cells were immunostained for myc-GIPC1 (red) and GFP-Vangl2 (green). The cells were then analyzed by confocal microscopy. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

B. Quantification of the colocalization of GIPC1 and Vangl2 in early endosomes. The cells were analyzed by confocal microscopy. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

C. Summary of the yeast two-hybrid assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) and prey constructs (GIPC1 and other clones) were co-transformed into yeast cells. Growth on selective media indicates a positive interaction. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

D. Left: GST pull-down assay. The bait construct (Vangl2 PDZ-BD) was immobilized on a glutathione (GST) resin. The prey construct (GIPC1) was co-purified with the bait construct. Right: Coomassie-stained gel showing the pull-down assay. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

6. Vangl2- PDZ-BD is required for membrane targeting

A. MDCK cells were transiently transfected with GFP-Vangl2 (G), GFP-Vangl2^{ΔD12} (D), or GFP-Vangl2^{ΔD12} + PDZ-BD (G+D). The cells were immunostained for GFP-Vangl2 (green) and ZO-1 (red). The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

B. Quantification of the membrane targeting of Vangl2 constructs at the plasma membrane. The cells were analyzed by confocal microscopy. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

7. GIPC1 is expressed in cochlea

A. RT-PCR of pure cochlear epithelium showing the presence of the three members of the GIPC family: GIPC1, GIPC2 and GIPC3. Myosin VI is shown as a positive control. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

B. In situ hybridization showing the expression of GIPC1 (green) in the cochlear epithelium. The bait construct alone does not support growth, and the prey construct alone does not support growth.

C. Surface view of a rat cochlear epithelium showing the asymmetrical expression of Vangl2 (green) in the sensory epithelium. Red is β-catenin.

Conclusion

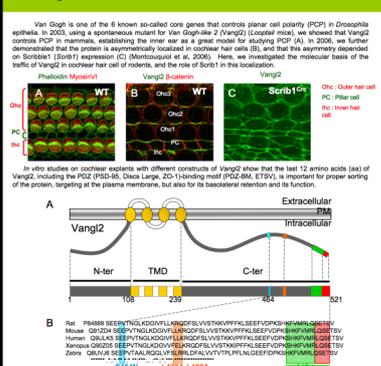
We have identified a new interacting partner for Vangl2, and demonstrated that this interaction is required for the trafficking of Vangl2. We also have demonstrated the role of the PDZ-BD of Vangl2 in its targeting.

Intracellular Trafficking of the Core Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in Sensory Cells of the Mammalian Cochlea

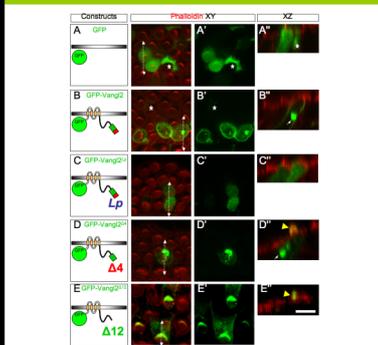
Arnaud Giese^{1,2}, Soren Warming³, Rivka Rachel³, Rebecca Erwin-Cohen³, Elodie Richard^{1,2}, Lino Tessarollo³, Neal G Copeland³, Nancy A Jenkins³, Nathalie Sans^{4,2}, Mirielle Montcouquiol^{1,2}

1. INSERM U862, Neurocentre Magendie, Planar Polarity and Plasticity, Bordeaux, France; 2. University of Bordeaux, Bordeaux, France; 3. Mouse Cancer Genetics Program, National Cancer Institute-Frederick, Frederick, Maryland 21702, USA; 4. INSERM U862, Neurocentre Magendie, Cellular and Molecular Neurobiology, Bordeaux Cedex, France

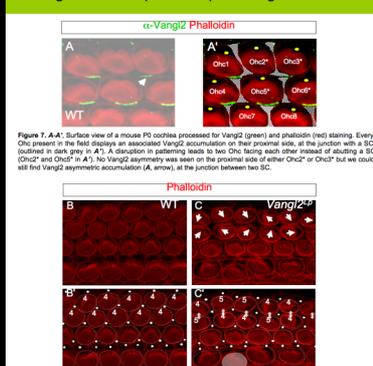
1. Background



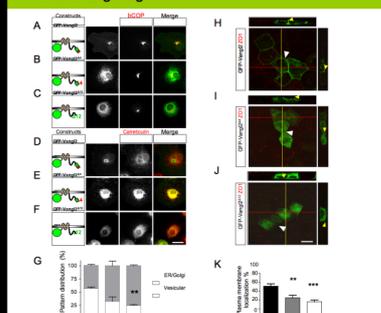
4. The PDZ-BM of Vangl2 is necessary for basolateral retention in Hair cells



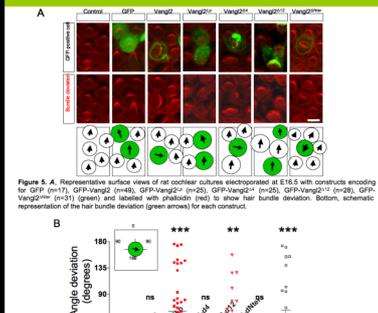
7. Vangl2 controls epithelium patterning



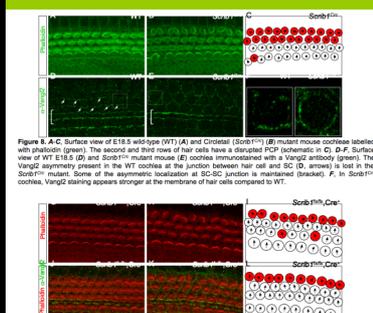
2. Vangl2 PDZ-BM is required for cellular trafficking and membrane targeting



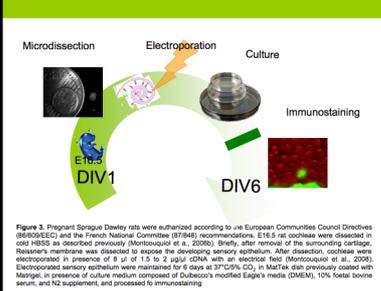
5. The last 12 aa of Vangl2 are necessary for its function



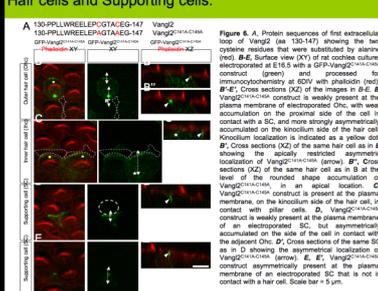
8. Scrib1 is required cell autonomously for PCP



3. In vitro cochlea electroporation



6. GFP-Vangl2 is asymmetrically localized in Hair cells and Supporting cells.



9. Conclusion

