

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**  
**FACULTE DE PHARMACIE**  
**INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES**  
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2014

THESE n° 13-2014

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Travail effectué dans l'Equipe 1 de l'Unité INSERM U781  
Génétique et embryologie des malformations congénitales  
Hôpital Necker – Enfants Malades  
Sous la direction du Professeur Tania ATTIE-BITACH

Présenté et soutenu publiquement le 3 septembre 2014 par

Madame **LEGRAND Anne**  
Née le 8 Novembre 1983 à Bayonne (64)

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GENE DANS LE SYNDROME  
MICRO-WARBURG**

**JURY**

<b>Président :</b>	Madame le Professeur Christine VINCIGUERRA
<b>Membres du Jury :</b>	Monsieur le Professeur Damien SANLAVILLE
	Monsieur le Docteur Alexandre VASILJEVIC
	Madame le Professeur Tania ATTIE-BITACH

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- |   |                        |
|---|------------------------|
| • Président de l'Université                                       | M. François-Noël GILLY |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration                      | M. Hamda BEN HADID     |
| • Vice-Président du Conseil Scientifique                          | M. Germain GILLET      |
| • Vice-Président du conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe LALLE      |

## Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

### SANTE

- |   |  |
|---|--|
| • UFR de Médecine Lyon Est  | Directeur : M. Jérôme ETIENNE          |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux                            | Directrice : Mme Carole BURILLON       |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques                | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie   | Directeur : M. Denis BOURGEOIS         |
| • Institut des Techniques de Réadaptation                             | Directeur : M. Yves MATILLON           |
| • Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine | Directeur : Mme Anne-Marie SCHOTT      |

### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies                                       | Directeur : M. Fabien DE MARCHI  |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| • Ecole polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)                       | Directeur : M. Pascal FOURNIER   |
| • I.U.T. LYON 1  | Directeur : M. Christophe VITON  |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)                    | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE  |
| • ESPE   | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE  |

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon**  
**Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA**  
**Directeurs Adjoints : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS**  
**Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD**

**Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (MCU-HDR)  
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr-PAST)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)  
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE – COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Madame Joëlle BARDON (MCU-HDR)  
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU-HDR)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Monsieur Fabrice PIROT (MCU-PH-HDR)  
Monsieur Patrice SEBERT (MCU-HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU-PH)  
Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU-PH)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU-PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU-HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)  
Madame Carole SIANI (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU-PH)

- **INGENIEURIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU-PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
 Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)  
 Monsieur François COMET (MCU)  
 Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)  
 Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
 Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)  
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
 Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU-HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
 Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
 Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
 Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU-HDR)  
 Madame Christelle MARMINON (MCU)  
 Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)  
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
 Monsieur Roland BARRET (Pr)  
 Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)  
 Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU-HDR)  
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
 Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
 Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
 Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)  
 Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)  
 Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)  
 Madame Catherine RIOUFOL (MCU-PH)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- **TOXICOLOGIE**  
 Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)  
 Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
 Madame Sylvain GOUTELLE (AHU)  
 Madame Léa PAYEN (MCU – HDR)
- **PHYSIOLOGIE**  
 Monsieur Christian BARRES (Pr)  
 Monsieur Daniel BENZONI (Pr)  
 Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
 Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)  
 Monsieur Michel TOD (PU-PH)  
 Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)  
 Madame Bernadette ASTIER (MCU- HDR)  
 Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
 Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
 Monsieur Nicolas KUCZEWSKI (MCU)  
 Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)  
 Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)  
 Madame Corinne FEUTRIER (MCU PAST)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU-PH)  
 Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)  
 Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU-HDR)  
 Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU-PH)  
 Madame Brigitte DURAND (MCU-PH)  
 Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)  
 Monsieur Jean FRENEY (PU-PH)  
 Madame Florence MORFIN (PU-PH)  
 Monsieur Didier BLAHA (MCU)  
 Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)  
 Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)  
 Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)  
 Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE FONDAMENTALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr-HDR)  
 Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
 Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
 Monsieur Alain PUISIEUX (PU-PH)  
 Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)  
 Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH)  
 Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU-HDR)  
 Madame Angélique MULARONI (MCU)  
 Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
 Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
 Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
 Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr-HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Monsieur Patrice SEBERT (MCU-HDR)  
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)
  
- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**  
Madame Emilie BLOND  
Madame Christelle MOUCHOUX  
Madame Florence RANCHON
  
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85ème section  
Monsieur Boyan GRIGOROV 87ème section  
Madame Mylène HONORAT 85ème section  
Monsieur Abdalah LAOUINI 85ème section  
Madame Marine CROZE 86ème section

**Pr : Professeur**

**PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier**

**MCU : Maitre de Conférences des Universités**

**MCU-PH : Maitre de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier**

**HDR : Habilitation à Diriger des Recherches**

**AHU : Assistant Hospitalier Universitaire**

**PAST : Personnel Associé Temps Partiel**

## Remerciements

**A Madame le Professeur Christine Vinciguerra,**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous suis reconnaissante de m'accueillir dans votre laboratoire pour mon dernier semestre d'interne.

**A Monsieur le Professeur Damien Sanlaville,**

Un grand merci d'avoir accepté de juger ce travail. Vous m'avez beaucoup aidé au cours de mon parcours et de ma spécialisation en génétique et j'ai beaucoup appris pendant mon semestre de cytogénétique. Soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

**A Monsieur le Docteur Alexandre Vasiljevic,**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez accepter mes profonds remerciements pour votre présence dans ce jury et trouver ici la marque de mes plus respectueuses considérations.

**A Madame le Professeur Tania Attié-Bitach,**

Tania, tu m'as confié ce travail passionnant et j'ai beaucoup appris au cours des quelques mois passés auprès de toi. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton soutien, pour le temps et l'énergie que tu as consacrés à encadrer ce travail. J'ai découvert grâce à toi toute la complexité de la transmission synaptique et j'espère que *LRRTM4* sera un jour validé.



## **A L'équipe de Necker,**

Sophie, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci de m'avoir accordé de ton temps pour me former et m'aider à la rédaction de cette thèse. J'ai beaucoup apprécié de te connaître et de travailler avec toi. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites.

Caroline, merci pour ton soutien et ton aide et toutes nos discussions pendant les quelques mois que nous avons partagés. A notre amitié qui en découle. Tu as toute mon admiration pour avoir su concilier ta vie professionnelle et ta grande famille. Je te souhaite beaucoup de succès dans le futur.

Lucile, merci également pour ton soutien et ton aide pendant les quelques mois que nous avons partagés. A nos escapades dijonnaises pour le DU NGS et nos plans foireux Airbnb ! Tu es devenue une amie et je t'admire pour ton courage et ton optimisme dans les épreuves auxquelles tu fais face actuellement.

Nadia, Géraldine, Amale et Joffrey, merci pour votre aide et votre sympathique accueil. J'ai passé de très bons moments avec vous.

Stan, Anna, Jeanne, Chris, Alexandra, Alice, merci pour tous vos précieux conseils.

## A ma famille

Mes parents

Merci pour votre confiance et vos encouragements pendant ces longues études. Vous avez toujours été là pendant mes moments de doute et manque de confiance en moi, et ils ont été très nombreux !

Merci de m'avoir si bien guidée et aidée à me construire pour devenir une adulte, même si je resterai toujours, Papa, "ta petite Anne" . Vous avez tout mon amour.

Céline

Nous avons choisi des voies très différentes, mais je suis si fière de la famille que tu as construite avec Jean Baptiste. Je vous souhaite tout le bonheur du monde avec Antoine, Quitterie, ma filleule préférée, Bénédicte, Grégoire et Armelle. A quand le prochain ?

Béatrice

Tu es ma grande sœur (comme tu le disais quand nous étions plus jeunes), mais je te considère plus comme ma presque jumelle, nous avons partagé tant de moments. Tu es ma confidente, merci d'être toujours présente quand j'ai besoin de toi. A Nicolas et Mathis, mon futur filleul préféré !

Cyril

Tu as toute mon admiration, tu es si brillant. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans la vie que tu t'es construite à Londres. Les occasions de nous voir sont rares mais sont toujours des moments de bonheur et l'occasion de discussions animées.

Marc et Hélène

Ma thèse aura été l'occasion d'un séjour à Lyon pour vous. Merci d'être venus.

Bon Papa

De manière très indirecte, tu as contribué à mon orientation en pharmacie par l'organisation d'un dîner... Merci de m'avoir donné cette impulsion ainsi que pour ton soutien et ton intérêt dans les études que je débutais. Tu as toute mon affection.

## A mes amis

Aux fidèles, ceux de toujours,

Fabienne, merci d'être venue de nombreuses fois à Lyon pendant mes années d'internat. A tous les moments que nous avons passés ensemble et ceux du futur, à nos escapades.

Adeline, nous avons partagées quasiment toutes nos années de collège et de Lycée. A nos rendez-vous à la sortie du Louvre. Sache que tu as beaucoup de talent.

Stéphanie, les relations à distance ne sont pas mon fort et les occasions de nous voir sont si rares, mais à chaque fois nous retrouvons notre complicité comme si nous nous étions quittées la veille. Merci pour tous ces moments.

Axel, merci pour ton humour si décalé.

Capucine, Elizabeth.

Aux rencontres pendant le M2,

Laure, nous nous croisons, je reviens à Paris et tu t'installes à Lyon. Merci pour tous les filons pour m'aider dans la quête d'un poste ! Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur pour ta future vie de Maman.

Sophie, aux moments partagés à Necker et à nos retrouvailles à Paris. Je te souhaite aussi beaucoup de réussite dans ton futur poste.

Camille, bon retour à Paris auprès de ton mari et tous mes vœux de bonheur à tous les deux.

A tous mes amis internes à Lyon,

Oriane, à tous nos doutes évoqués, pourtant je suis sûre de ta réussite dans ce que tu entreprends. Merci de m'avoir si souvent accueillie chez toi et à nos nombreux futurs voyages, à commencer par la Réunion.

Marie, pour tous les bons moments passés ensemble avec Sara pendant ce semestre en cytogénétique. Merci pour ta gaité.

Cécile, merci pour toutes les soirées barbecue que tu as organisées pour rassembler la promo. A nos retrouvailles prochaines lors de ton retour en Métropole.

Charlotte et Raphaël, Laetitia et Cyril, Aristide, Cécile.

Et toute la promo : Joffrey, Raphaëlle, Emilie, Anthony...

Mes co-internes du moment, Sabine, Ludivine et Marion.

A tous ceux que j'ai oubliés...

# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>16</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>20</b>
<b>I. Le syndrome Micro-Warburg .....</b>	<b>20</b>
A. Clinique .....	20
1. Signes ophtalmologiques.....	20
2. Anomalies cérébrales .....	21
3. Anomalies du développement.....	22
4. Hypogénitalisme .....	22
5. Dysmorphie faciale .....	23
6. Atteintes rénales .....	23
B. Epidémiologie .....	23
C. Diagnostic.....	23
D. Diagnostic différentiel.....	24
1. Fœtopathies infectieuses .....	24
2. Anomalie chromosomique .....	25
3. Le syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique COFS .....	25
4. Le syndrome CAMAK ou CAMFAK .....	25
5. Le syndrome de Neu-Laxova.....	26
6. La microphthalmie de Lenz .....	26
7. Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz.....	27
8. Cataracte congénitale-dysmorphie faciale-neuropathie.....	27
E. Prise en charge.....	28
<b>II. Physiopathologie du syndrome Micro-Warburg.....</b>	<b>28</b>
A. Bases génétiques et mode d'hérédité .....	28
1. <i>RAB3GAP1 et RAB3GAP2</i> .....	28
2. <i>RAB18</i> .....	31
3. <i>TBC1D20</i> .....	35
B. Rappels sur la transmission synaptique et la plasticité neuronale .....	36
1. Rappels sur la transmission synaptique.....	36
2. La plasticité synaptique .....	40
C. Les protéines Rabs .....	42
1. Généralités .....	42
2. Le cycle des Rabs GTPases .....	44
3. Les protéines effectrices des Rabs.....	45
D. Les protéines Rab3.....	46
1. Expression des Rab3 .....	47
2. Structure des Rab3 .....	47

3.	Rôle de la protéine Rab3A dans la transmission synaptique.....	49
4.	Les effecteurs de Rab3A .....	52
4.1.	La Rabphiline.....	52
4.2.	RIM1 $\alpha$ /2 $\alpha$ .....	53
<b>PATIENTS ET METHODES .....</b>		<b>56</b>
I.	<b>Données cliniques.....</b>	<b>56</b>
A.	Famille étudiée.....	56
B.	Cohortes testées .....	60
II.	<b>Extraction d'ADN .....</b>	<b>60</b>
III.	<b>Analyse de liaison par puce Affymetrix 250K .....</b>	<b>61</b>
IV.	<b>Séquençage d'exome sur plateforme à haut débit SOLiD4 (Life Technologies) .....</b>	<b>62</b>
A.	Préparation des banques d'ADN .....	62
B.	Capture par hybridation en phase liquide .....	63
C.	Le séquençage.....	64
1.	Amplification clonale sur billes par PCR en émulsion et enrichissement des billes .....	64
2.	Séquençage sur SOLiD4™ .....	65
3.	Analyse bioinformatique .....	67
V.	<b>Séquençage direct.....</b>	<b>68</b>
A.	Choix des amorces .....	68
B.	Le séquençage.....	68
VI.	<b>Extraction des ARN totaux .....</b>	<b>69</b>
VII.	<b>RT PCR .....</b>	<b>69</b>
VIII.	<b>Western-blot .....</b>	<b>70</b>
A.	Extraction des protéines .....	70
B.	Western-blot de LRRTM4.....	71
1.	Dénaturation des échantillons.....	71
2.	Dépôt et migration des échantillons .....	72
3.	Transfert .....	72
4.	Hybridation.....	72
5.	Révélation.....	74
IX.	<b>Immuno-histochimie .....</b>	<b>74</b>
A.	Préparation des lames .....	74
B.	Démasquage des antigènes .....	75
C.	Hybridation .....	75
D.	Révélation .....	76
<b>RESULTATS .....</b>		<b>77</b>
I.	<b>Analyse de liaison sur puce Affymetrix 250K.....</b>	<b>77</b>

II.	Séquençage d'exome .....	79
III.	Séquençage direct de LRRTM4.....	87
IV.	Expression de l'ARNm.....	87
V.	Expression de la protéine.....	90
VI.	Immuno-histochimie .....	91
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>92</b>
I.	Etude génétique.....	92
II.	Les protéines LRRTM.....	93
III.	Fonction des LRRTM / voie de signalisation .....	95
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>99</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>102</b>
Annexe 1 : Amorces utilisées pour le séquençage direct et conditions de PCR .....		103
Annexe 2: Mix pour la PCR, la purification de PCR, la réaction de séquence et la purification de séquence .		105
Annexe 3 : Protocole d'extraction des ARN à partir de tissus .....		107
Annexe 4 : Composition du Master Mix pour la Reverse transcription .....		113
Annexe 5 : Amorces utilisées pour la RT PCR et conditions de PCR.....		114
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>115</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Ensemble des mutations identifiées dans les gènes <i>RAB3GAP1</i> , <i>RAB3GAP2</i> et <i>RAB18</i> d'après Handley et al. (17). .....	34
Figure 2 : Les étapes de la libération des VS d'après Südhof (43).....	37
Figure 3 : Mécanisme de fusion membranaire impliquant les protéines SNARE au cours de l'exocytose vésiculaire d'après Südhof (43). .....	39
Figure 4 : Les complexes protéiques de la machinerie de l'exocytose dans les zones actives d'après Südhof (43). .....	40
Figure 5 : Localisation intracellulaire des Rabs d'après Stenmark et al. (46).....	43
Figure 6 : Le cycle de régulation de l'activité des protéines Rabs d'après Corbeel et al. (49). .....	45
Figure 7 : Les effecteurs des Rabs d'après Stenmark et al. (46).....	46
Figure 8 : Structure de Rab3A d'après Tuvim et al. (53). .....	49
Figure 9 : RIM composant central du réseau protéique au niveau des zones actives des terminaisons nerveuses d'après Mittelstaedt et al. (72). .....	55
Figure 10 : Arbre généalogique de la famille d'origine algérienne. ....	56
Figure 11 : Anomalie des extrémités (pieds bots bilatéraux) du premier enfant atteint. ....	57
Figure 12 : Coupes d'IRM représentatives du cas index au terme corrigé 38 semaines et 2 jours en séquence T2.....	58
Figure 13 : Suivi échographique de la troisième grossesse du couple.....	59
Figure 14 : Troisième grossesse du couple: Anomalie des extrémités du fœtus de 27 SA (examen foetopathologique). ....	59
Figure 15 : Etapes de la préparation des banques et de la capture.....	63
Figure 16 : Principe de la technologie de capture Sureselect <sup>XT</sup> d'Agilent. ....	64
Figure 17 : Principe du séquençage sur la plateforme SOLiD <sup>TM</sup> .....	67
Figure 18 : Résultats de l'étude de liaison génome entier sur puces Affymetrix 250K dans la famille sur la base de la consanguinité. ....	78
Figure 19 : Filtration des variations retrouvées par séquençage de l'exome chez le cas index. ....	81
Figure 20 : L'épissage alternatif du gène LRRTM4. ....	82

Figure 21 : Localisation des amorces de la RT PCR pour la détection des deux isoformes de <i>LRRTM4</i> . .....	88
Figure 22 : Expression des isoformes longues et courte de <i>LRRTM4</i> .....	89
Figure 23 : Expression des isoformes courte et longue de l'ARNm de <i>LRRTM4</i> dans la moelle épinière chez le 2 <sup>e</sup> fœtus interrompu à 14 SA de la famille étudiée (par rapport à un témoin de 13,5 SA). .....	90
Figure 24 : Expression des isoformes courte et longue de la protéine LRRTM4 dans la moelle épinière. .....	91
Figure 25 : Domaines de l'isoforme longue de la protéine LRRTM4.....	94
Figure 26 : Analyse semi quantitative de l'expression des ARNs des gènes <i>LRRTMs</i> par RT PCR d'après Lauren et al. (74). ....	95
Figure 27 : Représentation des neurexines (NRXN), neuroligines (NLGN) et des LRRTM interagissant au niveau de la synapse glutamatergique d'après Francks (104). ....	96



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats de l'étude de liaison génome entier sur puces Affymetrix 250K dans la famille sur la base de la consanguinité. ....	77
Tableau 2 : Résultats de l'étude de liaison génome entier sur puces Affymetrix 250K dans la famille en ne tenant pas compte de la consanguinité. ....	79
Tableau 3 : Description des variations trouvées par exome dans le cas où la consanguinité n'est pas prise en compte.....	85

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BMP	Bone morphogenetic proteins
bp	Paire de bases
CCV	Clathrin-coated vesicle
CDR	Complementary determining regions
CGH	Comparative genomic hybridization
Chr	chromosome
cM	centimorgan
CNV	Copy number variation
CPDPN	Centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal
DAG	Diacylglycérol
EC	Extracellulaire
EJC	Exon junction complexe
ESE	Exonic splicing enhancer
F	Forward
FGF	Fibroblast growth factor
GAP	GTPase activating protein
Gb	Gigabases
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GGT	Geranylgeranyl-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
hCG	human chorionic gonadotropin
HDL	High density lipoprotein

hmz	Homozygote
htz	Hétérozygote
HSP	Hereditary spastic paraplegia
IC	Intracellulaire
IC	Pre-golgi intermediate compartment
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
IVG	Interruption volontaire de grossesse
JPC	Jour post coïtum
KO	Knockout
LD	Lipid droplet
LRRTM	Leucin rich repeat transmembrane
LRR	Leucin rich repeat
LTP	Long term potentiation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mb	Mégabases
NMD	Nonsense mediated decay
PAS	Preautophagosomal structure
PI	Phosphate inositol
PC	Périmètre crânien
PCR	Polymerase chain reaction
	<u>P</u> ost synaptic density protein 95
PDZ	<u>D</u> rosophila disc large tumor suppressor 1
	<u>Z</u> onula occludens 1 protein
PFA	Paraformaldéhyde
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPF	Paired pulse facilitation
R	Reverse
RAB3GAP	Rab3 GTPase-activating protein
Rab	Ras-associated binding
RE	Reticulum endoplasmique

REP	Rab escort protein
RRP	Readily releasable pool
SA	Semaine d'aménorrhée
SHH	Sonic Hedgehog
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
SNC	Système nerveux central
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	Peptide signal
TGN	Trans golgi network
TM	Transmembranaire
UTR	Untranslated region (région transcrite et non traduite)
VAMP	Vesicular Associated Membrane Protein
VS	Vésicule synaptique
WARBM	Warburg Micro

# Introduction

## I. Le syndrome Micro-Warburg

Le syndrome Micro-Warburg a été décrit pour la première fois en 1993 par Warburg et al. (1) chez trois apparentés issus d'une famille consanguine pakistanaise.

### A. Clinique

Les principaux signes cliniques sont un retard mental sévère, une microcéphalie, une hypoplasie/agénésie du corps calleux, une cataracte congénitale, une microphthalmie, une microcornée et un hypogénitalisme (2)(3)(4).

Pendant la période postnatale, à l'exception des signes ophtalmologiques, les signes cliniques et dysmorphiques sont peu marqués. La majorité des patients naissent avec une taille normale et développent un retard de croissance postnatal (à l'exception de quelques patients qui présentent un retard de croissance intra-utérin).

#### 1. Signes ophtalmologiques

C'est l'atteinte oculaire qui suggère à la naissance le diagnostic de Micro-Warburg (5). Les anomalies oculaires comprennent une cataracte congénitale bilatérale, une microphthalmie (définie par une longueur axiale de l'œil diminuée d'au moins -2DS par rapport à la moyenne à un âge donné), une microcornée (diamètre cornéen entre 5,5 et 7,5 mm versus 9 et 10,5 pour la normale) et des pupilles de petite taille avec une membrane pupillaire persistante à l'origine de la cataracte. Les pupilles sont également atoniques : elles ne réagissent pas à la lumière ou aux agents mydriatiques. Malgré une chirurgie de la cataracte recommandée, l'acuité visuelle des patients reste très faible (perception uniquement de la lumière) en raison d'une atrophie optique progressive et d'un déficit visuel cortical, confirmé par un électrorétinogramme normal et l'absence de potentiels évoqués

visuels (6). D'autres anomalies ont été décrites : colobome rétinien (2) et synéchie postérieure (1).

## **2. Anomalies cérébrales**

Les anomalies cérébrales associées au Micro-Warburg incluent une microcéphalie postnatale (-4 à -6 DS), une microcéphalie congénitale a été rarement observée. Des malformations telles qu'une polymicrogyrie et une hypoplasie/agénésie du corps calleux, sont mises en évidence par IRM et sont certainement responsables de l'épilepsie dont souffrent certains patients. La polymicrogyrie est le plus souvent localisée au niveau des lobes frontaux et pariétaux, mais elle peut être plus étendue aux lobes temporaux ou à l'ensemble du cortex. Des fissures sylviennes élargies et des espaces sous-duraux augmentés sont également constants. D'autres anomalies ont été rapportées : pachygyrie, lissencéphalie, atrophie corticale ou subcorticale, ventriculomégalie, citerne cérébello-médullaire élargie, hypoplasie cérébelleuse, hypoplasie du vermis cérébelleux, anomalies de la myélinisation.

La polymicrogyrie, la pachygyrie et la lissencéphalie sont des dysgénésies corticales, pathologies développementales liées à un trouble de la mise en place du cortex cérébral.

- La polymicrogyrie est une malformation corticale caractérisée par une surface corticale irrégulière et un nombre excessif de petits gyri partiellement fusionnés et séparés par des sillons peu profonds. On peut observer à l'IRM un aspect en chou-fleur correspondant à ce plissement excessif. Elle résulte d'une anomalie de l'organisation corticale.
- La pachygyrie est définie par une giration rudimentaire avec de rares sillons et des circonvolutions espacées et un cortex anormalement épais, alors que l'agyrie est caractérisée par une surface du cortex lisse et un cortex également épaissi. Elles résultent d'une anomalie de migration neuronale.
- La lissencéphalie qui signifie « cerveau lisse » est une malformation cérébrale qui consiste en une agyrie ou une pachygyrie diffuse.

Dans le cas où une microcéphalie et une simplification gyrale sont associées, le mécanisme peut être un défaut de prolifération neuronale ou gliale (7).

Le corps calleux est la principale commissure interhémisphérique. Sa mise en place est complexe comme le reflète la fréquence d'une anomalie du corps calleux (agénésie partielle ou totale ou hypoplasie) dans de nombreuses anomalies chromosomiques, et plus de 60 syndromes, mais également des causes exogènes (8). Au cours du développement, deux mécanismes principaux conduisent à une agénésie complète du corps calleux: 1/ un défaut de la neurogenèse conduit à une absence d'axone 2/ les axones du corps calleux existent mais ne parviennent pas à traverser la ligne médiane : dans ce cas ils vont former des faisceaux nommés bandelettes de Probst qui resteront de part et d'autre de la ligne médiane.

### **3. Anomalies du développement**

Un retard de développement moteur et mental sévère apparaît progressivement. Au cours des 4 premiers mois, le développement semble normal puis le retard apparaît. Les patients n'acquièrent pas la parole ou seulement quelques mots, ils sont incapables de marcher et de s'asseoir. Une hypotonie congénitale est caractéristique, puis à partir de 8-12 mois de vie, une spasticité des membres inférieurs s'installe, entraînant des contractures. Cette spasticité est progressive et peut atteindre les membres supérieurs conduisant à une quadriplégie. L'étude de la conduction nerveuse met en évidence une neuropathie périphérique axonale progressive.

D'autres signes peuvent être présents : scoliose et cyphose ainsi que des anomalies des extrémités (9).

### **4. Hypogénitalisme**

Le microgénitalisme associé au Micro-Warburg, à la naissance, est surtout visible chez les garçons avec micropénis et cryptorchidie, mais il peut être aussi recherché chez les filles (hypoplasie des petites lèvres et du clitoris, orifice vaginal de petite taille). Cet

hypogonadisme semblerait être d'origine centrale : en effet, chez un patient l'administration d'hCG a été efficace (9). Ensuite la puberté est retardée, l'hypogénitalisme est alors évident chez les filles atteintes avec l'absence de menstruations et de développement des seins.

## **5. Dysmorphie faciale**

La dysmorphie faciale est peu caractéristique, mais associée au phénotype oculaire, elle est reconnaissable. Elle inclut une racine de nez proéminente, un nez court avec des narines antéversées, des fentes palpébrales courtes, des yeux enfoncés dans les orbites, une micrognathie, de grandes oreilles ou des oreilles implantées basses et orientées vers l'arrière, un philtrum marqué long ou court et un palais haut arqué. Une ligne simienne et une hypertrichose peuvent être également présentes.

## **6. Atteintes rénales**

Quelques cas d'anomalies rénales ont été rapportés : hydronéphrose (5), fusion postérieure des deux reins et un rein gauche ectopique (4).

## **B. Épidémiologie**

Le WARBM est un syndrome extrêmement rare dont la prévalence reste inconnue. Il est possible qu'il soit sous-diagnostiqué en raison d'une méconnaissance du syndrome.

## **C. Diagnostic**

Un examen ophtalmologique complet est recommandé chez tout enfant suspecté d'être atteint de WARBM, puisque les signes oculaires sont primordiaux pour le diagnostic. Celui-ci inclut un examen général de l'œil pour estimer la taille du globe oculaire et une échographie oculaire permettant de mesurer précisément le globe et de visualiser les structures internes de l'œil.



L'IRM cérébrale et des orbites permet de vérifier la présence du nerf optique et des muscles extra oculaires et de détecter les anomalies cérébrales associées. Une échographie rénale doit être également effectuée puisque quelques malformations rénales ont été décrites dans le WARBM.

Le syndrome de Martsolf (OMIM 212720) est une entité clinique très proche mais moins sévère que le WARBM, qui a été décrite par Martsolf en 1978 (10). En effet, l'atteinte oculaire comprend une microphthalmie et une cataracte congénitale bilatérale. Par contre l'atrophie optique et le déficit visuel cortical sont absents. La microcéphalie et la déficience intellectuelle sont également moins prononcées que dans le WARBM. Les autres anomalies cérébrales (polymicrogyrie, pachygyrie, agénésie/hypoplasie du corps calleux) sont absentes. La spasticité progressive des membres semble limitée aux membres inférieurs. Et il n'existe pas de dysmorphie faciale notable si ce n'est une hypertrichose. Cette similitude s'explique par le fait que ces deux syndromes appartiennent au spectre phénotypique de la même maladie due à des mutations des mêmes gènes.

Le diagnostic moléculaire confirmera le diagnostic de WARBM ou Martsolf par la recherche de mutations dans les 4 gènes actuellement connus : ***RAB3GAP1***, ***RAB3GAP2***, ***RAB18*** et ***TBC1D20***.

## **D. Diagnostic différentiel**

Le WARBM appartient à un groupe de syndromes associant un retard mental sévère, une cataracte infantile, des contractures, un hypogénitalisme et une microcéphalie. Il doit être considéré dans le diagnostic différentiel des cataractes congénitales.

### **1. Foetopathies infectieuses**

Pour tout enfant présentant une atteinte oculaire et une microcéphalie, des sérologies permettront d'exclure une cause infectieuse (cytomégalovirus, rubéole, toxoplasmose) pouvant donner les mêmes signes cliniques.

## **2. Anomalie chromosomique**

Les microdélétions 1p36 (11) et 1q21.1 (12) sont associées à un retard mental modéré, une microcéphalie, des anomalies cardiaques et une cataracte. Une CGH-array permettra d'éliminer la présence d'une de ces deux anomalies.

## **3. Le syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique COFS**

Ce syndrome (OMIM 214150) initialement décrit par Pena et Shokeir (13) est caractérisé par une microcéphalie congénitale, une cataracte congénitale et/ou microphthalmie, une arthrogrypose, une hypotonie axiale, un retard de développement psychomoteur sévère, un retard de croissance staturo-pondéral (principalement postnatal), une cypho-scoliose et une ostéoporose. La dysmorphie faciale associe un nez proéminent, des oreilles larges, une suture métopique proéminente, un micrognathisme. Une photosensibilité cutanée, une neuropathie périphérique, une surdité de perception et une rétinopathie pigmentaire peuvent être observées. Le syndrome COFS constitue la forme extrême, prénatale, du spectre clinique du syndrome de Cockayne, appartenant à la famille des maladies de la réparation de l'ADN. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'un défaut de réparation de l'ADN sur fibroblastes en culture par un test d'irradiation aux ultraviolets. De transmission autosomique récessive, il est dû à des mutations des gènes *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5* et *ERCC6*.

## **4. Le syndrome CAMAK ou CAMFAK**

Le CAMFAK ou CAMAK syndrome (acronymes désignant les différents signes observés, OMIM 212540) correspond à l'association d'une cataracte, une microcéphalie, une hypoplasie cérébelleuse, une agénésie du corps calleux, un retard mental sévère, une cypho-scoliose, avec ou sans arthrogrypose ou retard staturo-pondéral et un hypogénitalisme. Microcornée et microphthalmie sont absentes du tableau clinique. De plus l'électrorétinogramme et les potentiels évoqués visuels sont normaux. La transmission serait

autosomique récessive (14), mais la réalité de cette entité clinique est discutée, certains auteurs ayant suggéré que l'association CAMFAK ou CAMAK pouvaient être des formes à début précoce du syndrome Cockayne (15) avec démyélinisation centrale et périphérique, ou encore représenter des équivalents du syndrome COFS. Cette hypothèse sera confirmée lorsque les bases moléculaires de ce syndrome seront élucidées.

## **5. Le syndrome de Neu-Laxova**

Le syndrome de Neu-Laxova (OMIM 256520) est un syndrome polymalformatif létal rare. Les nouveau-nés atteints sont morts nés ou décèdent peu après la naissance.

Les principales manifestations sont un retard de croissance intra-utérin (RCIU), une microcéphalie sévère, une ichthyose et une dysmorphie faciale. D'importantes anomalies du système nerveux central sont présentes : lissencéphalie, hypoplasie cérébelleuse et du tronc cérébral, ventricules élargis et anomalie ou agénésie du corps calleux. Les caractéristiques faciales incluent un proptosis sévère avec ectropion (donnant l'impression d'une absence de paupières), un hypertélorisme, une micrognathie, un nez aplati, et des oreilles malformées. Les lèvres sont épaisses, la bouche est arrondie et ouverte. D'autres malformations peuvent être présentes de manière variable, incluant anomalies des membres (contractures et parfois anomalies du rayon radial), anomalies de l'appareil génital externe, cataracte congénitale, microcornée et arthrogrypose multiple. Pendant la grossesse, l'échographie du 2<sup>e</sup> trimestre peut montrer un hydramnios, un RCIU, des structures osseuses hypoéchogènes, une microcéphalie, des yeux proéminents avec absence de paupières, une rétrognathie, une activité foetale réduite, une restriction des mouvements foetaux avec déformation des membres en flexion et un oedème.

La transmission est autosomique récessive et récemment le gène *PHGDH* qui code pour une enzyme du métabolisme de la sérine, a été impliqué (16).

## **6. La microphthalmie de Lenz**

La microphthalmie de Lenz (OMIM 309800 et 300166) est un syndrome comprenant une atteinte oculaire avec microphthalmie ou plus rarement anophthalmie. La microphthalmie

est souvent associée à une microcornée, un glaucome et une cataracte. Un colobome est présent dans 60% des cas. Des malformations des oreilles, des dents, du squelette (clavicules mal développées, cypho-scoliose) et des doigts (syndactylie, clinodactylie, camptodactylie), de l'appareil génito-urinaire (hypoplasie rénale, cryptorchidie) et une microcéphalie sont souvent associées. Environ 60% des garçons atteints (transmission liée à l'X) présentent un retard mental et un retard de croissance. Deux gènes ont été identifiés sur l'X : *BCOR* et *NAA10*.

## **7. Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz**

Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (OMIM 270400) est caractérisé par des anomalies congénitales multiples, un déficit intellectuel et des troubles du comportement. Les patients présentent aussi un retard de croissance avec rhizomélie. Les troubles du comportement sont multiples : traits autistiques, hyperactivité, comportements d'automutilation et troubles du sommeil. Les anomalies sont cérébrales (hypoplasie ou agénésie du corps calleux, holoprosencéphalie et microcéphalie), cranio-faciales (ptosis, arête nasale large, racine du nez courte, narines antéversées, micrognathie, strabisme, nystagmus, cataracte, fente palatine ou luette bifide), génitales (micropénis, hypospadias, organes génitaux ambigus), cardiovasculaires (auriculaires et défauts du septum ventriculaire : persistance du canal artériel, canal atrio-ventriculaire), gastro-intestinales (reflux gastro-oesophagien, sténose du pylore, malrotation, et aganglionose colique). Des anomalies des extrémités sont également présentes (polydactylie post-axiale des mains ou des pieds, syndactylie des 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> orteils, pouces courts). Le SLOS est dû à un déficit de la synthèse du cholestérol, causée par des mutations dans le gène *DHCR7* (11q13.4). La transmission est autosomique récessive.

## **8. Cataracte congénitale-dysmorphie faciale-neuropathie**

Ce syndrome (OMIM 604168) est caractérisé par une cataracte congénitale, une microcornée, une dysmorphie faciale (nystagmus, rétrognathie) et une neuropathie. Les autres signes présents sont un retard de développement et un hypogonadisme. La

neuropathie périphérique motrice est progressive jusqu'à l'âge adulte et est associée à des déformations du squelette. La biopsie des nerfs montre une hypomyélinisation à laquelle peut s'ajouter une démyélinisation et une dégénération axonale chez les sujets plus âgés. Il est dû à des mutations du gène *CTDP1*. La transmission est autosomique récessive.

## **E. Prise en charge**

Il n'existe pas de traitement spécifique du WARBM et la prise en charge est symptomatique. Le traitement conventionnel de la cataracte ainsi qu'un suivi ophtalmologique est conseillé. Un traitement antiépileptique et un suivi neurologique doivent être mis en place. Les patients atteints de WARBM nécessitent une assistance continue en raison de la sévérité de leur retard mental et moteur. Une kinésithérapie est essentielle pour l'hypotonie puis la spasticité et les contractures dont souffrent les patients.

## **II. Physiopathologie du syndrome Micro-Warburg**

### **A. Bases génétiques et mode d'hérédité**

Le WARBM se transmet sur un mode autosomique récessif.

Actuellement 4 gènes ont été identifiés : *RAB3GAP1*, *RAB3GAP2*, *RAB18* et *TBC1D20* qui codent pour des protéines impliquées dans le transport membranaire.

#### **1. *RAB3GAP1* et *RAB3GAP2***

*RAB3GAP1* (OMIM 602536) est un gène de 118,45 kb localisé en 2q21.3. Il est constitué de 24 exons et code pour une protéine de 981 acides aminés (transcrit majoritaire), qui est la sous-unité catalytique du complexe Rab3GAP. Rab3gap1 a été isolé pour la première fois à partir de la fraction soluble synaptique issue de cerveau de rat, et il a été montré que cette protéine de 130 kDa possédait une activité GAP spécifique pour Rab3

*in vitro* (c'est à dire qu'elle active l'activité GTPase de Rab3). De plus elle est particulièrement présente au niveau synaptique, mais elle est également exprimée dans le cytosol et dans de nombreux tissus. L'activité catalytique est localisée dans la région C-terminale (acides aminés 601 à 981) (17). Un autre transcrit comprenant 22 exons (exon 1 alternatif et exons 2 et 3 absents) a été décrit, il code pour une protéine plus petite de 50 acides aminés en N-terminal, mais qui partage le domaine RabGAP en C-terminal (18).

Ce gène a été le premier impliqué dans le WARBM par Aligianis et Al. (19) en 2005. Une analyse de liaison dans 8 familles consanguines d'origine pakistanaise et marocaine, a permis d'identifier une région d'homozygotie dans 5 familles, puis le séquençage des 6 gènes candidats de la région a mis en évidence des mutations inactivatrices de *RAB3GAP1*. Pour conforter le rôle de *RAB3GAP1* dans le WARBM, son expression au cours du développement, chez la souris a été étudiée : elle est élevée dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans les yeux. Depuis de nombreuses autres mutations ont été décrites dans le WARBM (18)(20)(21)(22) essentiellement dans des familles originaires du Moyen Orient. La plupart des mutations décrites sont des mutations avec décalage du cadre de lecture, mutations d'épissage ou mutations non-sens qui affectent la fonction de la protéine ou entraînent une dégradation de l'ARNm par le NMD (nonsense mediated decay), elles sont compatibles avec l'hypothèse que le WARBM est dû à une perte de fonction de *RAB3GAP1*. Deux mutations avec décalage du cadre de lecture ont été décrites dans le dernier exon du gène, les transcrits qui en résultent ne sont donc pas soumis au NMD, ceci montre que la fin du domaine C-terminal de la protéine est essentiel à l'activité catalytique ou à la stabilité de la protéine. Récemment deux mutations faux-sens affectant des acides aminés très conservés ont été identifiées chez des patients WARBM. Enfin pour la première fois en 2013, une mutation avec décalage du cadre de lecture (c.9delC, p.Asp4Thrfs\*51) a été décrite dans une famille avec un phénotype de Martsolf (18). Les auteurs ont montré que l'effet délétère de cette mutation était en partie corrigé par l'augmentation de l'expression du transcrit alternatif de *RAB3GAP1*, ce qui expliquerait le phénotype moins sévère des patients.

Afin de mieux comprendre le rôle de *RAB3GAP1*, la souris KO *rab3gap1*<sup>-/-</sup> a été étudiée. Elle est viable, fertile et ne présente aucune des anomalies oculaires ou cérébrales

décrites dans le WARBM. La forme active de Rab3A s'accumule dans le cerveau, ce qui confirme l'activité de *RAB3GAP1 in vivo* et son rôle de limiter le nombre de Rab3A actives. De plus, l'absence de *rab3gap1* chez la souris, entraîne une inhibition de la libération de glutamate médiée par le calcium dans les synaptosomes cérébro-corticaux et altère la plasticité à court terme dans la région CA1 d l'hippocampe (23).

*RAB3GAP2* (OMIM 609275) est un gène de 124,23 kb localisé en 1q41. Il est constitué de 35 exons et code pour une protéine de 1393 acides aminés, qui est la sous-unité non catalytique de RAB3GAP. En effet, Rab3GAP2 a été isolée pour la première fois avec Rab3GAP1, puis il a été montré que les deux protéines formaient un complexe *in vitro* et co-immunoprécipitaient *in vivo*. Rab3GAP2 ne modifie pas l'activité de Rab3GAP1 *in vitro*, son rôle serait donc de stabiliser, réguler ou localiser Rab3GAP1. Chez le poisson zèbre, son expression au cours du développement est plus restreinte que celle de Rab3GAP1 : Rab3GAP1 a une expression ubiquitaire alors que celle de Rab3GAP2 est limitée au niveau du SNC. De plus, les deux protéines ont un profil d'expression partiellement chevauchant mais tout de même distinct dans le cerveau et l'œil (24).

La première mutation décrite de *RAB3GAP2* a été identifiée chez 3 enfants consanguins d'origine pakistanaise atteints de Martsolf (24). Cette mutation faux-sens (c.2154G>T, p.Gly1051Cys), entraîne un saut hors phase de l'exon 28 avec une expression résiduelle du transcrit sauvage. Alors il était difficile de déterminer si la perte de Rab3GAP2 était moins délétère que celle de Rab3GAP1 ou si l'expression résiduelle de la protéine normale expliquait le phénotype moins sévère des patients Martsolf. Une mutation de *RAB3GAP2* a ensuite été identifiée chez une petite fille atteinte de WARBM, issue d'une famille consanguine turque, accréditant la deuxième hypothèse (25). En effet cette mutation, délétion en phase de 9 pb dans l'exon 6, entraîne la perte de 3 acides aminés très conservés et n'a pas d'impact sur l'épissage. Ainsi des mutations hypomorphes de *RAB3GAP2* expliqueraient le phénotype du Martsolf, alors que des mutations perte de fonction sévères donneraient un WARBM. Et plus récemment Handley et Al. ont identifié d'autres mutations de *RAB3GAP2* à l'origine de WARBM ou de syndrome de Martsolf qui confirment comme pour *RAB3GAP1* la corrélation génotype-phénotype : des mutations avec

décalage du cadre de lecture et non sens conduisent au WARBM et des mutations faux sens conduisent à un Martsolf.

## **2. *RAB18***

*RAB18* (OMIM 602207) est un gène de 38.06 kb localisé en 10p12.1. Il est constitué de 7 exons et code pour une protéine de 206 acides aminés. Cette protéine est très conservée au cours de l'évolution, elle est exprimée dans de nombreux tissus avec un niveau d'expression élevé dans le cerveau et le cœur. De nombreuses localisations cellulaires et fonctions ont été décrites. Par exemple, dans les cellules neuroendocrines l'expression inducible de *RAB18* serait liée à la répression de l'exocytose des granules de sécrétion (26). Il est intéressant de noter que *Rab3A* a un rôle similaire dans les cellules neuroendocrines mais que les deux GTPases s'associent à des populations de vésicules différentes, ce qui suggère qu'elles agissent à des étapes différentes du processus de sécrétion. Dans les adipocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales, *Rab18* est localisée d'une part au niveau des vacuoles lipidiques et jouerait un rôle dans le métabolisme des lipides (lipogénèse et lipolyse) (27)(28)(29). Et d'autre part elle serait aussi localisée au niveau du RE et de l'appareil de Golgi où elle participerait aux échanges entre ces deux compartiments (30) ; ainsi qu'au niveau des peroxysomes (31). Mais la fonction de *Rab18* dans le SNC, ses partenaires (effecteurs et régulateurs), ainsi que son lien avec *Rab3GAP1* et *Rab3GAP2* restent aujourd'hui inconnus.

Chez des patients atteints d'acromégalie, il a été montré que l'expression de *RAB18* est inhibée dans les cellules somatotropes hypophysaires, ce qui pourrait en partie expliquer l'hypersécrétion d'hormone de croissance (32).

*RAB18* a été impliqué dans le WARBM par Bem et al. grâce à l'étude de familles consanguines d'origine pakistanaise et turque (33). Par analyse de liaison puis séquençage des gènes de la région candidate identifiée, 4 mutations de type perte de fonction ont été ainsi mises en évidence dans le gène *RAB18*. Deux mutations (c.71T>A, p.Leu24Gln et c.277\_279del, p.Arg93del) entraînent une perte de liaison au GTP/GDP, qui est indispensable à la fonction et la bonne localisation subcellulaire de la protéine; une mutation (c.619T>C,



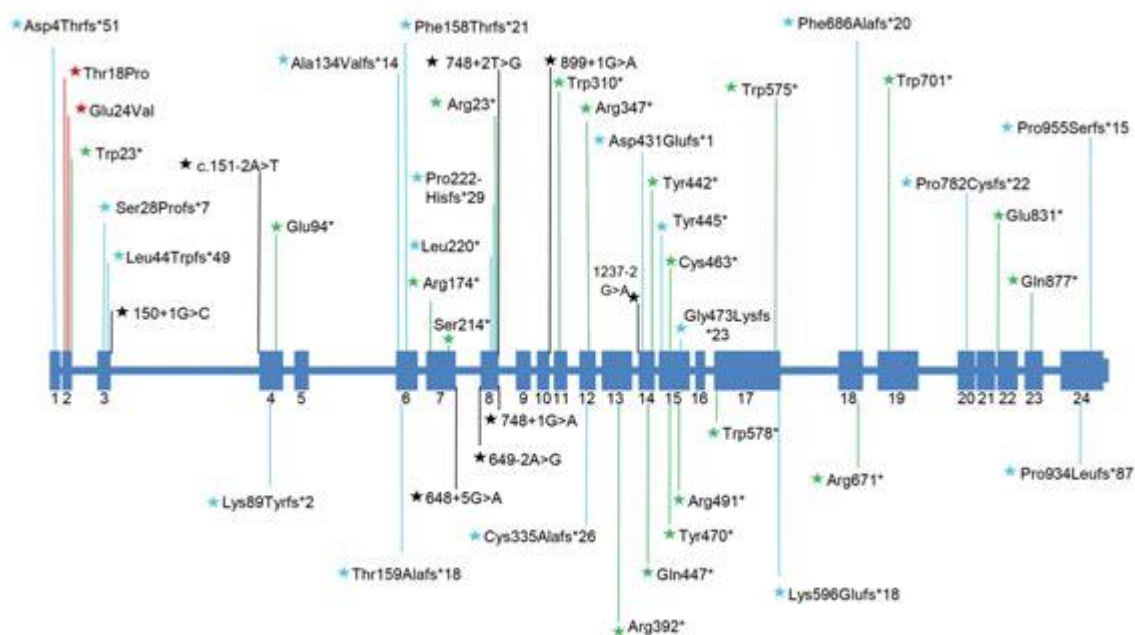
p.X207GlnextX20) abolirait le site de prénylation en C-terminal et ainsi l'adressage de la protéine à la membrane, et une délétion de l'exon 2 responsable d'un décalage du cadre de lecture pourrait être à l'origine d'une dégradation du transcrit par le NMD ou donnerait une protéine de 25 acides aminés sans le site catalytique du domaine RAB (son effet n'a pas été étudié). Une autre mutation de *RAB18* a par la suite été identifiée par Handley et Al. (18).

Les auteurs ont étudié le rôle de *Rab18* chez le poisson zèbre par morpholino afin de confirmer son implication dans le WARBM. Les anomalies observées étaient : microcéphalie, microphthalmie, œdème péricardique, développement retardé de la mâchoire, taille diminuée et un retard global du développement. Ce phénotype montre bien le rôle de *RAB18* dans le développement et son rôle conservé au cours de l'évolution. Les auteurs ont fait également plusieurs hypothèses pour expliquer l'implication de *RAB18* dans le WARBM. Tout d'abord son rôle dans le métabolisme des lipides pourrait expliquer le phénotype neuronal. En effet, le cholestérol est impliqué dans de nombreux processus comme la prolifération des cellules gliales, la croissance des neurites, la synaptogénèse, la myélinisation. Il joue un rôle dans la formation des vésicules synaptiques, leur exocytose et la plasticité neuronale. Des études protéomiques suggéraient la présence de Rab18 au niveau synaptique, mais le rôle synaptique de Rab18 était alors inconnu et le lien entre l'altération du métabolisme du cholestérol et le phénotype dans le WARBM n'a pas encore été démontré. Il est intéressant de noter que, bien que différentes, des malformations cérébrales, oculaires et génitales sont aussi présentes dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz, qui est dû à une altération du métabolisme du cholestérol. Une autre hypothèse était un lien entre les voies Rab3 et Rab18 et notamment que RAB3GAP1 ne serait pas spécifique de la voie Rab3, mais pourrait aussi réguler l'activité de Rab18. Handley et Aliaginis ont également fait cette hypothèse en se basant sur le fait que les vésicules de sécrétion et les vésicules synaptiques partageaient de nombreuses protéines, ainsi au niveau synaptique les 3 protéines pourraient interagir au sein d'une même voie (34).

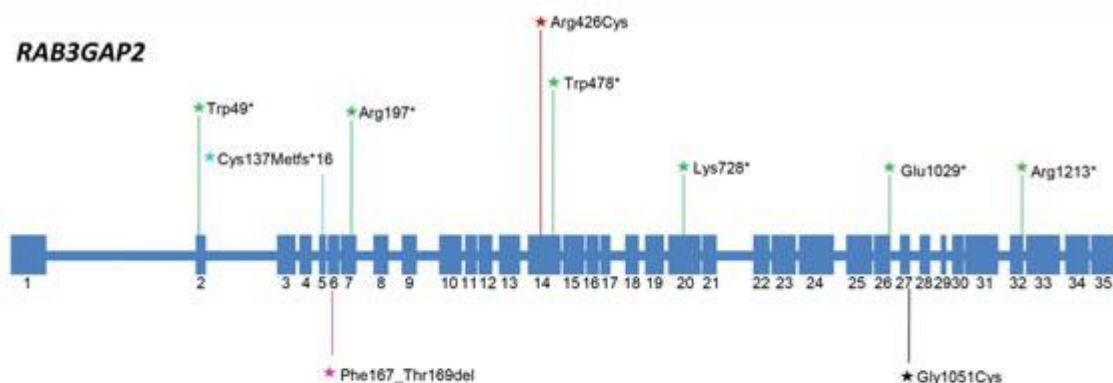
L'étude de nouvelles familles ainsi que celles déjà décrites dans la littérature, soit au total 153 familles présentant un phénotype caractéristique (144 avec un WARBM et 9 avec un Martsolf), a permis d'identifier des mutations de *RAB3GAP1* dans 41% des cas, des mutations de *RAB3GAP2* dans 7% des cas et des mutations de *RAB18* dans 5% des cas (ces mutations sont toutes représentées dans la figure 1). L'étude de corrélation génotype-phénotype établit clairement que ces deux syndromes appartiennent à un continuum

phénotypique en relation avec la nature et la sévérité de la mutation : les mutations de type perte de fonction donnent un WARBM, alors que les mutations hypomorphes (c'est-à-dire que le gène a une fonction résiduelle) conduisent à un syndrome de Martsolf. Elle montre également qu'aucune distinction clinique ne peut être faite en fonction du gène impliqué. La seule distinction possible a été observée à l'IRM pour les patients avec une mutation de *RAB3GAP2*, où le phénotype semble moins sévère avec une polymicrogyrie limitée au cortex frontal, sans atteinte cérébelleuse ou de la substance blanche. Cette étude suggère aussi une plus grande hétérogénéité génétique du fait que près de la moitié des cas seulement sont expliqués par des mutations de ces 3 gènes (18).

## RAB3GAP1



## RAB3GAP2



## RAB18



Figure 1 : Ensemble des mutations identifiées dans les gènes *RAB3GAP1*, *RAB3GAP2* et *RAB18* d'après Handley et al. (18).

### 3. *TBC1D20*

Très récemment un nouveau gène *TBC1D20* a été identifié grâce à la comparaison du phénotype observé chez des souris bs (bs pour blind sterile) et celui du WARBM. En effet ces souris présentent une cataracte congénitale ainsi qu'une infertilité. Par contre, elles ne présentent aucune anomalie cérébrale ou neuromusculaire comme les souris KO *rab3gap1*. Par clonage positionnel, une mutation dans le gène *Tbc1d20* a été identifiée. Chez la souris la protéine *tbc1d20* a une activité GAP pour RAB1 et RAB2 et la mutation causale du phénotype bs conduit à une perte de fonction de la protéine. Le phénotype cellulaire a été étudié sur fibroblastes d'embryons de souris bs : une hypertrophie de l'appareil de Golgi et une formation aberrante de gouttelettes lipidiques cytosoliques ont été mises en évidence. Les auteurs ont fait l'hypothèse que *TBC1D20* pouvait être impliqué chez l'homme dans le WARBM, ils ont ainsi séquencé *TBC1D20* chez 77 familles atteintes de WARBM sans mutation retrouvée dans les 3 gènes connus et ils ont identifié 5 mutations homozygotes de type perte de fonction dans ce gène. De plus, ils ont montré que les fibroblastes humains déficients en *TBC1D20*, *Rab3GAP1* et *Rab18* présentaient tous une augmentation de la taille des vacuoles lipidiques. Ainsi une anomalie du métabolisme des lipides pourrait être associée pour la première fois au WARBM (35). Les mutations de *TBC1D20* expliquent environ 5% des cas de WARBM, ce qui suggère que d'autres gènes sont encore à découvrir.

Les RabGTPases ont un rôle dans les transports vésiculaires et dans le remodelage des organites intracellulaires. Rab1 et Rab2 jouent un rôle dans l'arrimage et la fusion des vésicules au cours du transport entre le RE et l'appareil de Golgi (36)(37). Il est possible que *TBC1D20* ait un rôle critique dans ce remodelage au cours de la maturation des cellules des testicules et du cristallin à l'origine du phénotype chez la souris et l'homme.

Le défaut du métabolisme des lipides commun au déficit en *TBC1D20*, *Rab3GAP1* ou *Rab18* suggère une voie cellulaire commune impliquée dans le WARBM. En effet, *Rab18* était déjà connu comme une protéine associée aux vacuoles lipidiques et son implication dans le métabolisme des lipides a été démontrée (38). Une étude chez la drosophile avait également montré un lien entre Rab1 et la taille des vacuoles lipidiques, ce qui conforte le rôle de *TBC1D20* dans le métabolisme des vacuoles lipidiques (39). Par contre le complexe *Rab3GAP*

n'a jamais été impliqué dans le métabolisme des vacuoles lipidiques ou des lipides; des études d'association ont seulement montré un lien entre *RAB3GAP1* et le taux de cholestérol total et de cholestérol HDL (40).

Des anomalies des vacuoles lipidiques pourraient avoir un rôle en pathologie humaine. Leur accumulation a été observée dans plusieurs paraplégies spastiques héréditaires comme le syndrome neurodégénératif sévère par déficit en *BSCL2*, la paraplégie spastique autosomique dominante type 17 et la paraplégie spastique autosomique récessive type 20 (41). Une diminution de la taille des vacuoles lipidiques a également été observée en cas d'inactivation du gène *ATL1* (OMIM 606439). Celui-ci code pour une GTPase, l'Atlastine qui a un rôle dans la formation du RE tubulaire impliqué dans la synthèse des lipides. Des mutations de *ATL1* sont décrites dans la paraplégie spastique type 3A responsable de spasticité progressive comme dans le WARBM (42). Enfin la cutis laxa de type 3A caractérisée par un chevauchement phénotypique avec le WARBM : cataracte, microcéphalie, hypogénésie du corps calleux, retard mental, hypotonie et spasticité progressive avec contractures, est due à des mutations de *ALDH18A1*. Le chevauchement des deux syndromes s'étend au niveau cellulaire avec la mise en évidence de vacuoles lipidiques de grande taille dans les fibroblastes de patients atteints (43).

La souris *bs* pourrait ainsi être un modèle pour le WARBM, malgré la différence phénotypique entre la souris et l'homme qui a été attribuée à des différences inter-espèces de la redondance des voies Rab. Une autre hypothèse serait que des gènes modificateurs pourraient expliquer la variabilité phénotypique.

## **B. Rappels sur la transmission synaptique et la plasticité neuronale**

### **1. Rappels sur la transmission synaptique**

La transmission synaptique correspond à la libération de neurotransmetteurs à partir des vésicules synaptiques. Ce processus est initié par l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison synaptique après sa propagation le long de l'axone. La dépolarisation de la membrane de la terminaison nerveuse induit l'ouverture de canaux

calciques voltage-dépendants situés sur la membrane présynaptique, au niveau des zones actives. L'augmentation brutale de la concentration intracellulaire présynaptique de  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne la fusion des membranes des vésicules présynaptiques avec la membrane plasmique de la terminaison axonique. Les vésicules présynaptiques déversent leur contenu dans la fente synaptique. Les vésicules libérées sont déjà "arrimées" (docking) aux zones actives de la synapse et compétentes c'est à dire "amorçées" (priming) pour l'étape de fusion induite par le calcium (figure 2).

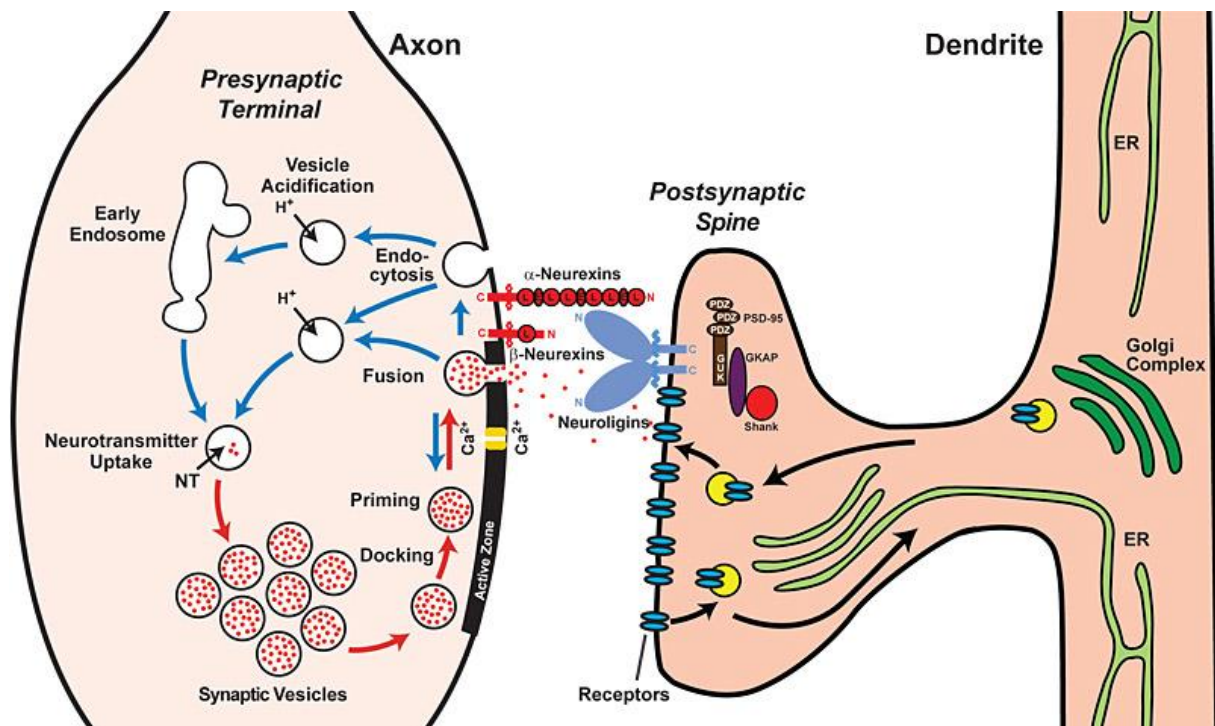


Figure 2 : Les étapes de la libération des VS d'après Südhof (44)

Les processus de fusion membranaire intracellulaires dépendent de l'interaction de protéines membranaires de la superfamille SNARE soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor, situées sur les deux membranes qui vont fusionner, et qui assurent la spécificité et la régulation spatio-temporelle de la fusion. Ces protéines sont caractérisées par un motif SNARE (séquence homologue de 70 résidus formant une hélice  $\alpha$ ) situé dans la région C-terminale de leur domaine cytoplasmique. La formation d'un complexe trans-SNARE impliquant 4 motifs SNARE (4 hélices  $\alpha$  parallèles) permet de rapprocher les membranes et initie leur fusion. Dans les terminaisons nerveuses, les vésicules contenant les neurotransmetteurs qui seront libérés dans l'espace synaptique,

expriment une protéine v-SNARE (v pour vesicle membrane) appelée synaptobrévine ou VAMP Vesicular Associated Membrane Protein. La membrane plasmique du neurone au niveau présynaptique exprime quant à elle la protéine t-SNARE (t pour target membrane) syntaxine 1. Ces deux protéines SNARE fournissent chacune une hélice alpha au complexe trans-SNARE. Enfin, la protéine SNAP25 Synaptosome Associated Protein of 25 kD est une protéine t-SNARE périphérique qui fournit deux hélices alpha au complexe trans-SNARE (45). Lorsque le complexe est formé, les complexines, petites protéines, vont le stabiliser en se fixant dans un sillon formé entre la syntaxine et la synaptobrévine.

La formation du complexe SNARE et ainsi la fusion synaptique, est contrôlée par Munc18-1 appartenant à la famille des protéines SM (Sec1/Munc18-like proteins). Munc18-1 se lie à la syntaxine 1 lorsqu'elle a une conformation fermée, masquant ainsi son motif SNARE. Cette interaction bloque ainsi la formation du complexe SNARE. L'intervention de Munc13, protéine de la zone active, permet le déplacement de Munc18-1 et le changement de conformation de la syntaxine 1, ce qui permet la formation du complexe trans-SNARE (46). Plus précisément, Munc13 provoque l'amorçage des VS en se liant au diacylglycérol DAG, ce qui permet l'activation de la PKC, qui va à son tour phosphoryler plusieurs protéines synaptiques dont Munc18-1. Cette phosphorylation diminue son affinité pour la syntaxine 1 et permet la libération de celle-ci. Munc18-1 reste liée au complexe SNARE et stabilise ensuite le complexe trans-SNARE formé (47) et permet ainsi la fusion membranaire (48)(49).

La fusion synaptique est provoquée par le calcium. L'action du calcium dépend des synaptotagmines qui possèdent 2 domaines C2 nommés C2A et C2B capables de lier le calcium. La synaptotagmine s'associe au complexe trans-SNARE en interagissant avec la syntaxine. L'influx de calcium dans la terminaison permet à celui-ci de se fixer sur les domaines C2 de la synaptotagmine. Ces domaines vont alors s'insérer dans les phospholipides de la membrane, ce qui induirait une perturbation mécanique permettant un changement de conformation du complexe SNARE en cis-SNARE et ainsi l'ouverture du pore de fusion. En présence de calcium, la synaptotagmine est également capable de déplacer les complexines du complexe SNARE, ce qui participe aussi à la formation du pore de fusion. Il a été proposé que ces 2 protéines agiraient de manière séquentielle : les complexines stabilisant le complexe trans-SNARE intermédiaire et la synaptotagmine induisant ensuite la fusion (voir la figure 3) (50)(51).

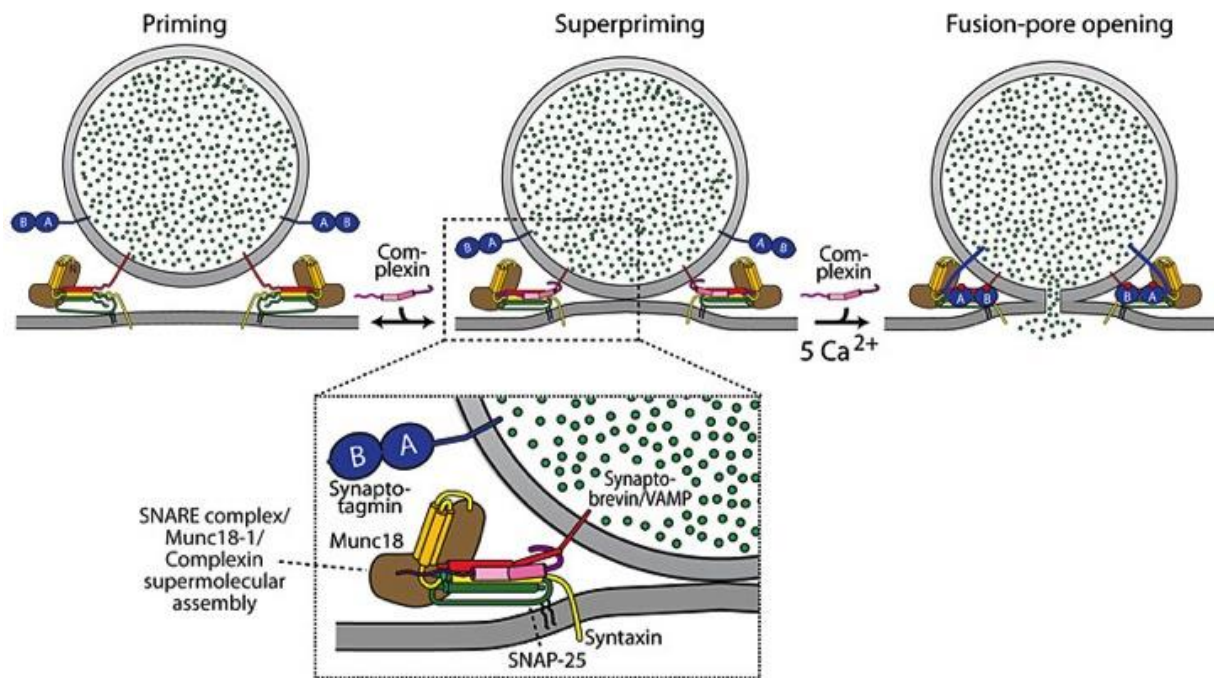


Figure 3 : Mécanisme de fusion membranaire impliquant les protéines SNARE au cours de l'exocytose vésiculaire d'après Südhof (44).

Les étapes séquentielles de la fusion sont : l'amorçage par l'assemblage du complexe SNARE/SM, la stabilisation du complexe par les complexines et l'ouverture du pore de fusion provoquée par l'influx de calcium et la synaptotagmine.

Dans les terminaisons présynaptiques, la libération de neurotransmetteurs a lieu au niveau des zones actives, constituées de grands complexes multiprotéiques, dont les protéines Munc13s et RIMs, mais aussi les RIM-BPs, les liprines  $\alpha$ , et les ELKs. Les protéines Munc13s et RIMs sont des composants majeurs des zones actives, elles contiennent de nombreux domaines qui jouent un rôle dans l'arrimage des vésicules synaptiques puis leur amorçage pour l'exocytose. Elles recrutent également les canaux calciques à proximité des sites de libération grâce à une interaction directe des protéines RIM avec les canaux calciques (figure 4). De plus Munc13 et RIM participent à la plasticité synaptique à court terme et à long terme, qui sont deux phénomènes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire.



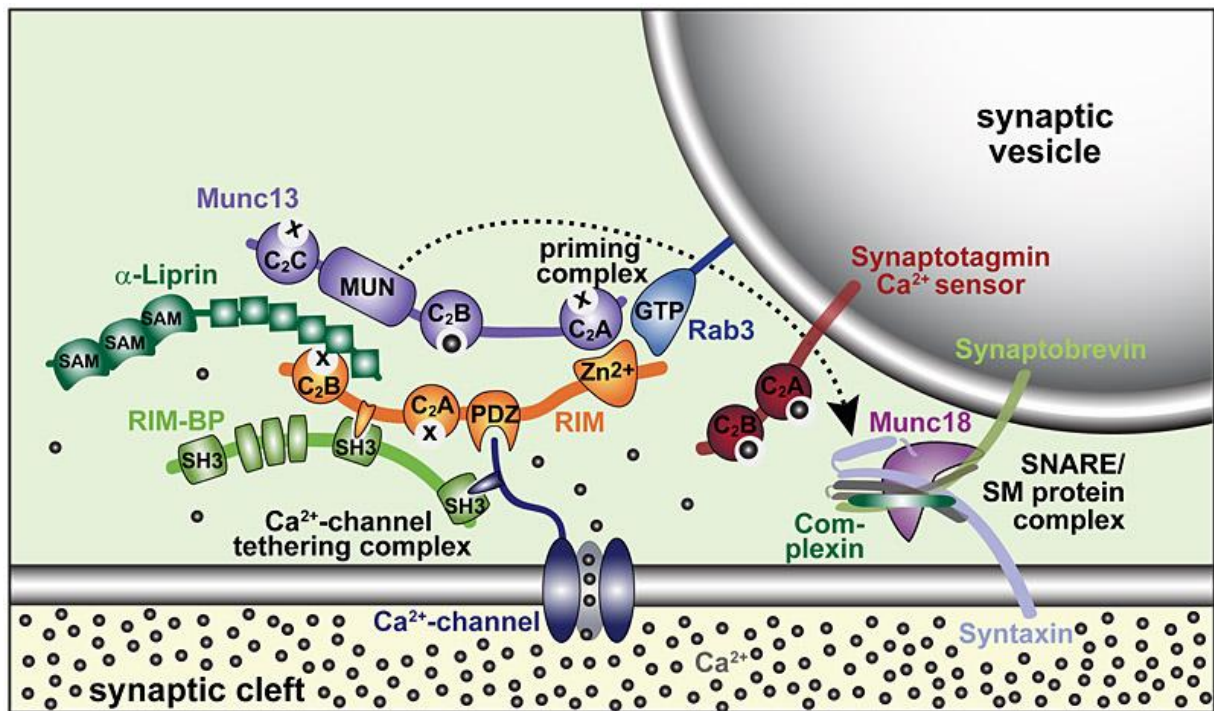


Figure 4 : Les complexes protéiques de la machinerie de l'exocytose dans les zones actives d'après Südhof (44).

## 2. La plasticité synaptique

La plasticité synaptique correspond à la propriété des synapses de modifier leur efficacité en fonction de leur usage. Elle englobe de multiples mécanismes intervenant dans la modification de la transmission synaptique au cours du temps. La connexion entre deux neurones n'est donc pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones.

L'objectif ici n'est pas d'expliquer de manière exhaustive tous ces mécanismes, mais les termes utilisés ultérieurement seront définis.

La dépression est une forme de plasticité à court terme. Elle correspond à une diminution de la libération de neurotransmetteurs lors de stimuli répétés. Elle peut être expliquée par la déplétion en pool compétent pour la libération ou RRP readily releasable pool, c'est à dire l'ensemble des vésicules de neurotransmetteurs ancrées à la membrane prêtes à être libérées ; mais aussi l'inactivation des sites de libération, le temps que les protéines vésiculaires soient recyclées par endocytose ; ou encore une diminution de l'influx de calcium par inactivation des canaux calciques.

La PPF paired-pulse facilitation est également une forme de plasticité à court terme

(à l'échelle de la dizaine de ms). Elle correspond à l'augmentation de la probabilité de libération des neurotransmetteurs lors de stimuli rapprochés dans le temps, qui est expliquée par la rémanence du calcium dans la terminaison présynaptique après une stimulation pendant un laps de temps. Un autre mécanisme a été proposé : la présence de protéines liant le calcium induirait une diminution de la probabilité de libération des neurotransmetteurs lors d'une première stimulation, puis lors des stimulations suivantes, ces protéines étant déjà saturées, la probabilité de libération des neurotransmetteurs s'élèverait (52).

La LTP long term potentiation ou potentialisation à long terme est une forme de "mémoire", très différente de la PPF dans ses mécanismes. Il existe au moins deux formes distinctes de LTP dans l'hippocampe. Une LTP d'origine post-synaptique dans la région CA1, faisant intervenir l'activation des récepteurs NMDA. Lors de la libération de glutamate, le canal NMDA ne s'ouvre que si la membrane post synaptique est suffisamment dépolarisée. Les ions calcium qui pénètrent dans le neurone par ce canal activent des protéines kinases post-synaptiques. Ces kinases peuvent agir au niveau post synaptique pour insérer de nouveaux récepteurs AMPA dans la membrane et augmenter ainsi la sensibilité au glutamate.

Et une LTP pré-synaptique dans la région CA3, cette LTP nécessite un très fort stimulus tétnique voire plusieurs, qui conduit à l'élévation de l'AMPc intracellulaire, le recrutement de plusieurs kinases la PKA puis la MAPK, et la phosphorylation de nombreuses cibles dont le facteur de transcription CREB. Cela aboutit à la modification de l'expression de gènes cibles codant pour la synthèse des protéines nécessaires à une modification structurale des contacts synaptiques. Les fibres moussues de la couche CA3 de l'hippocampe constituent un modèle privilégié pour l'étude de cette forme de plasticité, alors dénommée mfLTP mossy fiber LTP, et qui s'étend sur des échelles de temps allant d'une à plusieurs dizaines de minutes.

## C. Les protéines Rabs

### 1. Généralités

Les Rabs sont des petites protéines G de la superfamille Ras. Le terme de protéine G vient de la capacité de ces molécules à lier les nucléotides guanyliques, GDP ou GTP. On distingue généralement 2 types : les protéines G hétérotrimériques et les protéines G monomériques, encore appelées petites protéines G, auxquelles appartiennent les Rab.

Les protéines G de la superfamille de Ras sont impliquées dans une multitude de processus cellulaires, allant du transport intracellulaire à la dynamique du cytosquelette, en passant par le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire. On compte dans la superfamille de Ras cinq sous-familles dont celle des Rab.

La sous-famille Rab est la plus étendue de la superfamille de Ras, puisque plus de 60 Rab ont été identifiées chez les mammifères mais seulement la moitié d'entre-elles a été caractérisée sur le plan fonctionnel. Les protéines Rab sont impliquées dans la régulation de l'exocytose et l'endocytose, le transport membranaire vésiculaire, ainsi que dans l'identité membranaire. Leur très grand nombre montre leur importance dans la régulation des différentes étapes du processus vésiculaire avec des rôles multiples dans la sélection du cargo, la formation des vésicules de transport au niveau du compartiment donneur, leur transport le long du cytosquelette, ainsi que leur arrimage et leur fusion avec le compartiment accepteur (53).

Elles jouent un rôle dans l'adressage des vésicules aux différents organites cellulaires et leur compartimentation confère aux réactions de fusion intracellulaire leur spécificité et déterminent l'identité des organites (54). En effet, chaque Rab a une localisation préférentielle (figure 5). Cette spécificité de localisation est notamment assurée par l'interaction des Rab avec leurs effecteurs et leur GEF. La formation d'un complexe entre le GEF et un des effecteurs crée en plus une boucle de rétrocontrôle positif qui permet de coupler la localisation et l'activation de la Rab avec l'action de ses effecteurs. De plus, plusieurs Rab peuvent être localisées au niveau d'une même membrane. Dans ce cas, des interactions entre plusieurs effecteurs d'une même Rab permettent la formation de micro-domaines membranaires appelés «Rab domains». Ces domaines empêchent que différentes

Rab ne se mélangent, et participent également à la spécificité de leur localisation. Ils peuvent alors être impliqués simultanément dans différentes étapes du transport vésiculaire au niveau d'un même organe (55).

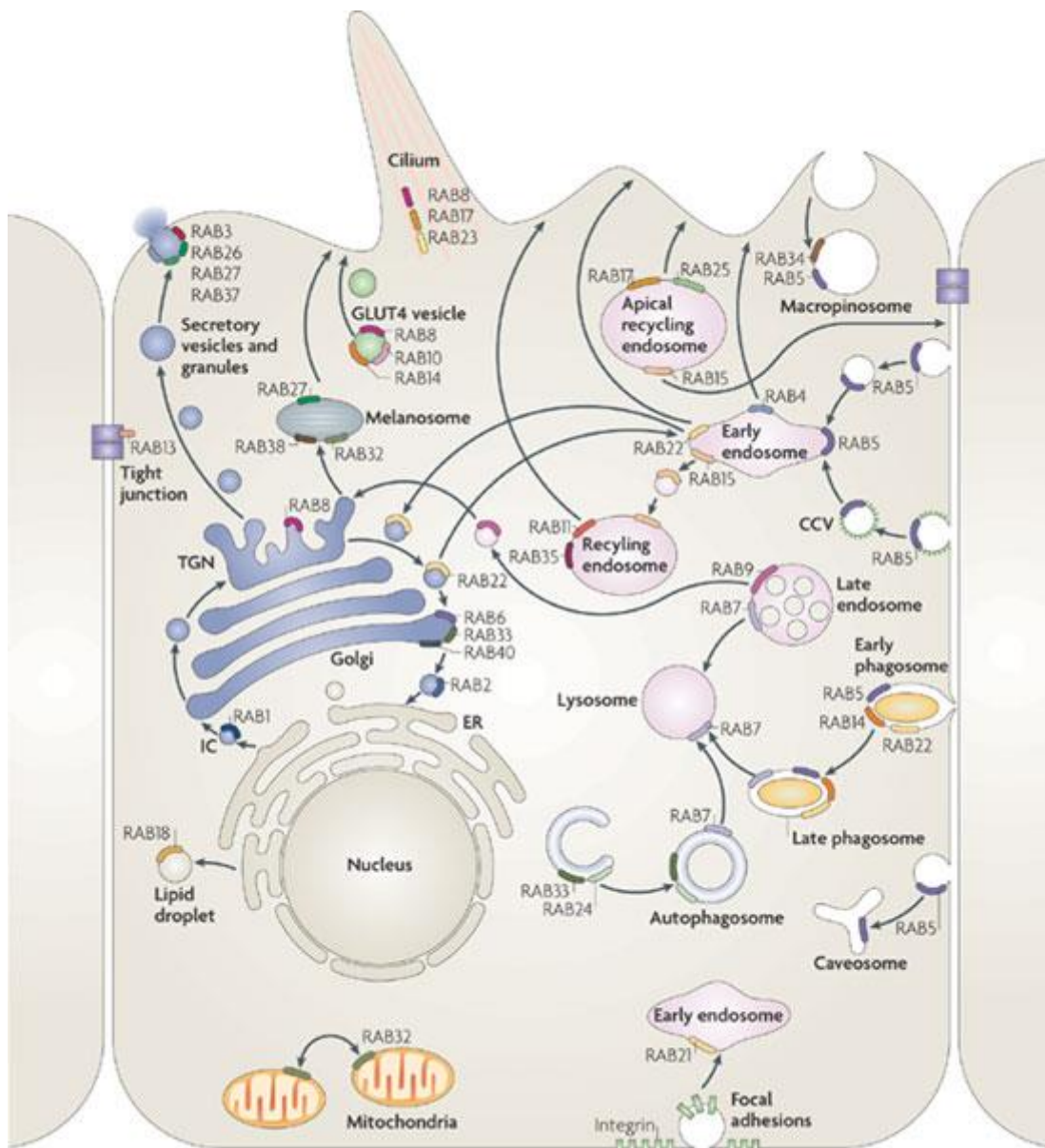


Figure 5 : Localisation intracellulaire des Rabs d'après Stenmark et al. (53).

## 2. Le cycle des Rabs GTPases

La spécificité et la dynamique des interactions membranaires des Rab sont assurées par leurs interactions avec de nombreuses protéines associées aux Rab au cours d'un cycle. En effet, ces protéines modulent le passage entre la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP, leur adressage à la membrane puis leur recyclage, ainsi que leur interaction avec leurs effecteurs. Il existe 4 grandes classes de protéines régulatrices : les GAP GTPase-Activating Proteins, les GEF Guanine nucleotide Exchange Factors, les GDI GDP Dissociation Inhibitors et les GDF GDI displacement factors.

Les Rab sont synthétisées sous la forme de protéines solubles dans le cytosol. Elles sont prises en charge par une protéine chaperonne REP Rab escort protein pour former un complexe stable. Cette protéine les met en contact avec la RabGGT ou Rab géranylgéranyl transférase qui leur transfère des groupements hydrophobes géranylgéranyl (isoprényl en C20, ajout d'un seul isoprényl dans le cas d'un motif C-C et de deux isoprényles dans le cas d'un motif C-X-C comme pour Rab3) au niveau de l'extrémité C-terminale (par liaison covalente de type thioether à des résidus cystéines). Cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour permettre l'insertion des Rab dans les membranes cellulaires et assurer leur activité biologique (56). REP permet aussi de limiter l'activation des Rab avant leur adressage à la membrane appropriée. En l'absence de REP ou de GGT, la protéine Rab reste dans le cytosol sous forme inactive.

Une protéine Rab agit comme un interrupteur moléculaire. En effet, elle alterne entre deux états : un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Une protéine Rab peut passer de la forme active à la forme inactive et réciproquement, de manière très rapide grâce à l'intervention facilitatrice des GEF et des GAP. A l'état initial, un facteur inhibiteur de la dissociation du GDP, GDI maintient la Rab à l'état inactif dans le cytosol. Au niveau de la membrane, GDF déplace GDI ce qui permet au facteur d'échange GEF d'activer la Rab en catalysant l'échange du GDP en GTP. La forte concentration cytosolique de GTP permet la fixation de celui-ci, aussitôt le GDP libéré. La forme GTP de la Rab insérée dans la membrane est capable de recruter de nombreux types d'effecteurs tels que des protéines cargo pour la formation des vésicules, des protéines motrices pour le transport vésiculaire et des complexes d'arrimage pour la fusion avec la membrane acceptrice. L'inactivation de la Rab,

qui correspond à la conversion du GTP en GDP, est assurée par l'activité GTPasique de la protéine Rab mais est aussi catalysée par une GAP. L'hydrolyse du GTP a lieu pendant ou après la fusion de la vésicule avec la membrane acceptrice. A la fin du cycle, GDI détache la Rab de la membrane et la séquestre sous forme inactive jusqu'au prochain cycle. GDI facilite ainsi le recyclage des Rab entre le compartiment accepteur et le compartiment donneur (figure 6).

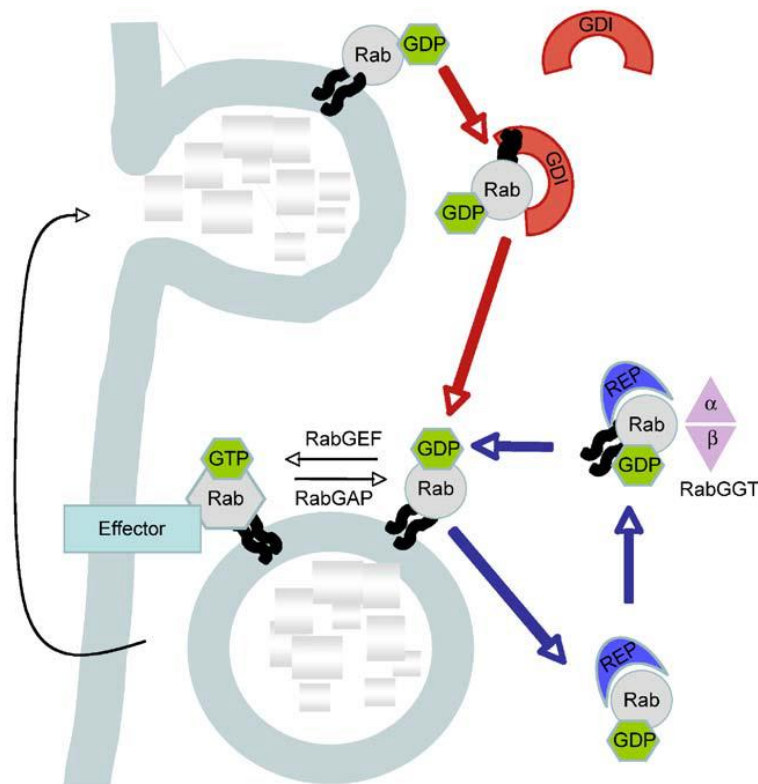


Figure 6 : Le cycle de régulation de l'activité des protéines Rabs d'après Corbeel et al. (56).

### 3. Les protéines effectrices des Rabs

Les protéines Rab activées interagissent avec un répertoire spécifique de molécules effectrices notamment pour assurer la mobilité et le ciblage des vésicules auxquelles elles sont liées. Les effecteurs sont caractérisés par leur grande diversité (figure 7) :

- les molécules qui permettent la sélection des cargos et le bourgeonnement des vésicules,
- les PI (phosphate inositol) kinases et les PI phosphatases qui permettent de modifier la composition de la membrane des vésicules,

- les moteurs moléculaires qui permettent la mobilité des vésicules le long des filaments d'actine ou des microtubules,
- les facteurs d'arrimage qui permettent la spécificité d'adressage des vésicules,
- ainsi que les protéines SNARE qui contrôlent le ciblage et la fusion des vésicules avec la membrane acceptrice.

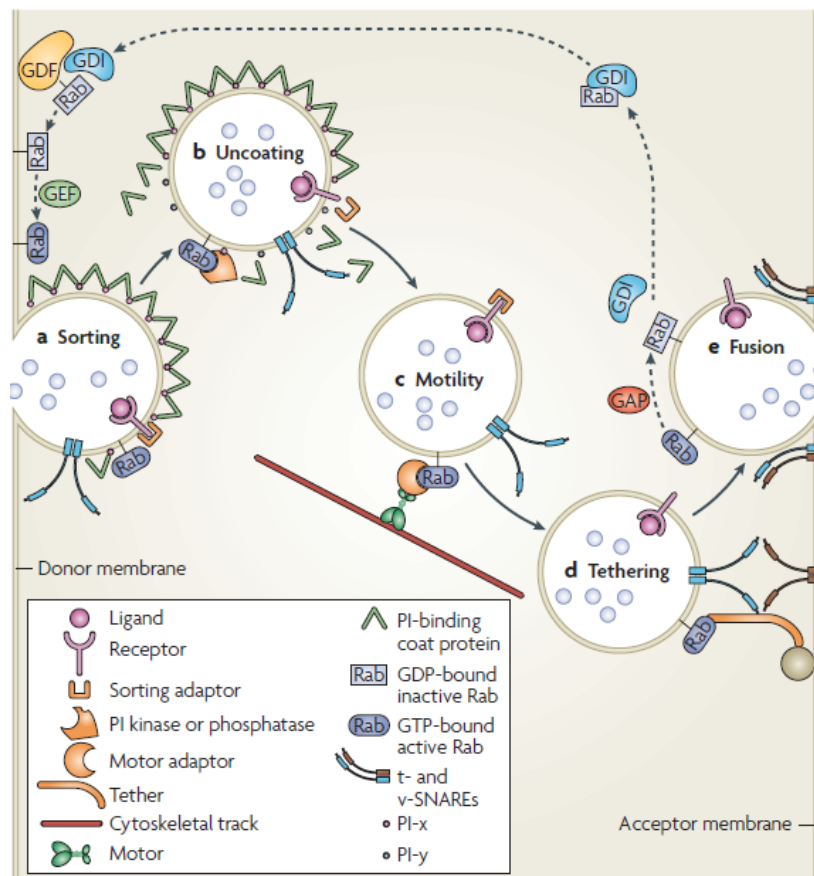


Figure 7 : Les effecteurs des Rabs d'après Stenmark et al. (53).

Les effecteurs sont en orange. a. la sélection des cargos b. la perte du manteau de la vésicule c. la mobilité le long du cytosquelette d. l'arrimage de la vésicule e. la fusion avec le compartiment accepteur.

## D. Les protéines Rab3

La sous famille Rab3 est constituée de 4 isoformes : Rab3A, Rab3B, Rab3C et Rab3D, toutes impliquées dans la régulation de l'exocytose de neurotransmetteurs et d'hormones. Cette régulation fait intervenir le calcium. Il existe une autre voie d'exocytose constitutive dans laquelle les protéines Rab3 n'ont pas de fonction.

## **1. Expression des Rab3**

La famille Rab3 présente, à l'inverse des autres Rab qui sont exprimées de façon relativement ubiquitaire, une expression plus restreinte à certains types cellulaires en particulier les neurones et les cellules endocrines. La forte similarité de leurs séquences (75% d'identité) suggère une certaine redondance fonctionnelle. Cependant, les profils d'expressions tissulaire et cellulaire des quatre isoformes ne sont pas identiques, suggérant des rôles distincts, même si ces profils ne sont pas mutuellement exclusifs.

Rab3A, Rab3B et Rab3C sont exprimées majoritairement dans le cerveau et les cellules endocrines, alors que Rab3D a un profil d'expression très différent avec des taux élevés dans les glandes exocrines (lacrymales, parotides, sous-maxillaires, le pancréas) et dans le tissu adipeux. Elles sont toutes exprimées dans l'hypophyse. Dans le cerveau, Rab3A, Rab3B et Rab3C sont colocalisées au niveau des vésicules synaptiques mais sont caractérisées par un profil d'expression distinct dans les différentes régions. Rab3A, la plus abondante Rab dans le cerveau, est uniformément exprimée dans toutes les régions du cerveau. Rab3B est présente uniquement dans quelques régions notamment le bulbe olfactif et l'antéhypophyse. Rab3C est exprimée dans toutes les régions mais avec des taux variables (57).

## **2. Structure des Rab3**

Toutes les protéines de la famille Rab partagent un certain nombre d'éléments communs intangibles, comme des déterminants structuraux majeurs liés à l'activité d'hydrolyse du GTP par ces protéines. Ces éléments sont identifiables par l'étude des alignements des séquences primaires de ces protéines et de leur structure cristallographique (figure 8).

Ces éléments sont :

- La boucle P commune à toutes les GTPases et ATPases. Ce domaine, situé en N-terminal contient une sérine interagissant avec le phosphate  $\gamma$  du GTP, limitant ainsi l'approche de la glutamine 81, indispensable à l'hydrolyse.



- Les régions "switch" (ou "charnières"), au nombre de 2, subissent un remaniement conformationnel en fonction de la nature du nucléotide lié (GDP ou GTP). Ces régions sont importantes : elles comportent des résidus cruciaux pour le mécanisme d'hydrolyse du GTP ; et comme ces régions adoptent des conformations distinctes selon l'état de liaison au nucléotide, elles sont le siège principal de la reconnaissance par les effecteurs spécifiques de l'état de liaison au GTP. La région "switch I" contacte les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du GTP, par l'intermédiaire de l'ion  $Mg^{2+}$ . D'autres résidus sont également importants pour la stabilisation du nucléotide au site actif par des interactions de type Van der Waals avec le ribose du nucléotide. La région "switch II" a deux déterminants majeurs : le motif DX2G, contactant le phosphate  $\gamma$ , et le résidu Gln 81, directement impliqué dans l'hydrolyse du GTP et la stabilisation de l'état de transition.
- Les Rab-CDR Complementary Determining Region sont au nombre de 4 : CDR-1, CDR-2, CDR-3, et CDR-4. La comparaison des séquences primaires de Rab3 avec ceux d'autres Rab montre que les CDR sont très bien conservées au sein du groupe Rab3, et divergent des CDR d'autres groupes de la famille Rab ; ceci montre le rôle des CDR comme déterminants de première importance de la spécificité des effecteurs reconnus.
- Les Motifs NKXD et EXSAK : Le motif NXKD (positions 135 à 138 de Rab3) permet la stabilisation du nucléotide au site actif et le motif EXSAK (positions 163 à 167 de Rab3a) permet une stabilisation de la molécule.

Rab3GAP présente peu d'homologie avec les autres GAP décrites y compris les RabGAP. Les GAP régulent l'activité des protéines G en limitant la durée de leur état actif en accélérant l'hydrolyse du GTP, l'activité intrinsèque GTPasique des Rab étant très faible. Les différentes GAP semblent contribuer à l'hydrolyse du GTP de différentes manières. Les Ras-GAP et les Rho-GAP agissent sur les régions "switch" des Rab afin de positionner correctement un résidu glutamine important pour l'hydrolyse et en apportant également un résidu arginine ("arginine-finger") dans la poche catalytique pour contribuer à la catalyse. Les ARF-GAP stabilisent le switch II, mais ne possèdent pas d'"arginine finger". L'activité des RabGAP est généralement due à la présence d'un domaine TBC qui fournit deux résidus catalytiques en trans très conservés, une arginine ("arginine finger") et une glutamine ("glutamine finger"), qui se substitue à la glutamine de la Rab (58). Cependant Rab3GAP ne

possède pas de domaine TBC, mais catalyserait l'hydrolyse du GTP sur les Rab3 par un mécanisme similaire aux Ras-GAP/Rho-GAP, impliquant une "arginine-finger", et par une action sur les régions "switch" pour permettre l'accès au site catalytique (59).

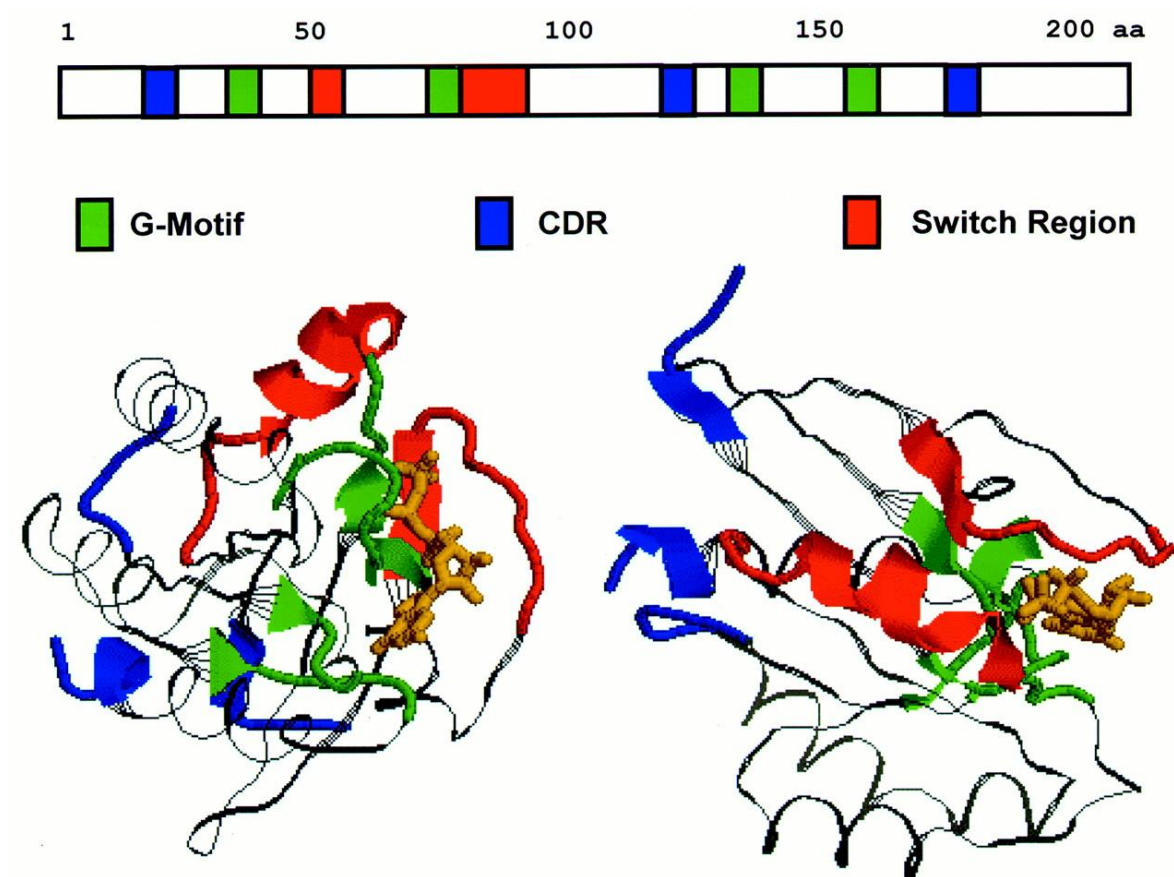


Figure 8 : Structure de Rab3A d'après Tuvim et al. (60).

En haut les domaines dans la séquence primaire et en bas deux représentations de la structure tridimensionnelle liée au GTP. Les motifs G impliqués dans la liaison au GTP sont en vert, les régions switch sont en rouge et les CDRs en bleu.

### 3. Rôle de la protéine Rab3A dans la transmission synaptique

Malgré de nombreuses études, le rôle des protéines Rab3 dans l'exocytose synaptique n'a pas été totalement élucidé.

Rab3A a été la première isoforme Rab3 décrite (61) et est la plus étudiée en raison de son abondance dans le cerveau. L'étude de sa fonction a probablement été rendue difficile en raison d'une redondance entre les différentes isoformes. Son cycle

d'association/dissociation avec la VS est couplé à l'exocytose provoquée par le calcium, ce qui suggérerait un rôle majeur de Rab3A dans la transmission synaptique.

Mais l'étude des souris KO *rab3a*<sup>-/-</sup> est en contradiction avec cette hypothèse. En effet, leur phénotype est très peu marqué, elles sont viables et fertiles. Des études électrophysiologiques approfondies ont révélé un dysfonctionnement synaptique modéré, montrant plutôt un rôle modulateur de Rab3A au cours de l'étape de fusion des VS. Dans un premier temps, une altération de la plasticité synaptique à court terme a été observée dans les cellules pyramidales de la région CA1 hippocampique avec augmentation significative de la dépression en cas de stimulations répétées, due à une altération du renouvellement du RRP (62). Ensuite une autre étude réalisée par la même équipe a montré une augmentation du nombre moyen de quanta libérés par terminaison après stimulation, ainsi qu'une augmentation de la PPF, forme de plasticité à court terme, dans les cellules pyramidales de la région CA1 chez la souris KO *rab3a*<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent un rôle inhibiteur de Rab3A sur l'exocytose (63). Enfin dans la région hippocampique CA3, la plasticité à court terme n'est pas détériorée. Par contre, Rab3A y joue un rôle important dans la LTP des fibres moussues. En effet cette forme de plasticité synaptique est abolie en l'absence de Rab3A (64). Ces études suggèrent que Rab3A régule le nombre de VS libérées en fonction de la concentration en calcium et qu'elle agirait au moment de la fusion des vésicules de neurotransmetteurs avec une action opposée à celle de la synaptotagmine (65).

Leenders et al. ont montré ensuite que *rab3A* jouait également un rôle en amont, au cours du transport des VS. En effet, la stimulation des terminaisons nerveuses par dépolarisation provoque une redistribution des VS près de la zone active, augmentant ainsi le nombre de VS arrimées en temps normal. Ce phénomène est aboli chez la souris KO. Il a été aussi observé une altération de la reconstitution du RRP, déjà décrite auparavant. Les auteurs suggèrent que Rab3A joue un rôle facilitateur dans l'arrimage des VS puisque la distribution des VS est normale chez le KO en cas de faible activité et la reconstitution du RRP a lieu mais est plus lente (66). En 2008, Wang et al. ont montré que le diamètre du pore de fusion était diminué et que la vitesse de la fusion des VS était plus lente (pore de fusion ouvert plus longtemps) dans les cellules chromaffines de la souris KO (67).

Une étude plus complète des KO des différentes *rab3* chez la souris, a montré que tous les KO simples et doubles sont viables. Les KO triples ne survivent pas dès que Rab3A est une des isoformes délétées, et enfin les KO quadruples présentent un développement

normal mais décèdent de détresse respiratoire en période postnatale. L'étude électrophysiologique chez ce quadruple KO a montré que les Rab3 agissaient sur une partie du RRP en augmentant la libération des vésicules synaptiques, et ainsi diminuerait la quantité de calcium requise pour l'exocytose régulée (68). Ainsi les Rab3 sont conjointement essentielles pour la survie dans le modèle murin et sont redondantes dans leur fonction.

En dehors de l'étude des modèles murins, de nombreux travaux ont également essayé de décrire les fonctions de Rab3A dans la transmission synaptique.

En effet après la découverte de l'implication de Rab3A dans les étapes d'arrimage et de fusion des VS, elle a été décrite dans un complexe ternaire avec Munc13 et RIM $\alpha$ , deux protéines de la zone active, impliquées dans l'amorçage des VS. La mise en évidence de ce complexe montre pour la première fois le rôle possible des Rab3 dans cette étape de l'exocytose mais aussi une connexion possible entre Rab3 et le complexe SNARE (69). Par la suite, il a été proposé que la fonction de Munc13 est inhibée lorsqu'elle interagit avec RIM. Ensuite, lorsque RIM recrute Rab3A, l'hydrolyse du GTP lié à Rab3A induirait la dissociation du complexe et rapprocherait Munc13 de la membrane, ce qui permettrait son interaction avec le DAG et ainsi l'amorçage des VS. De plus, une interaction entre Rab3A et Munc18-1 a été mise en évidence. Une autre hypothèse en découle : Munc18-1 interagirait avec Rab3A-GDP, ce qui conduirait à la dissociation de Rab3A de la VS et déclencherait la fusion (70).

Rab3A a aussi récemment été identifiée comme un partenaire de la synaptotagmine 1 qui entre en compétition avec la syntaxine 1B pour se lier au domaine C2B de la synaptotagmine 1. Ainsi Rab3A participerait à la régulation de l'exocytose des VS en modulant par compétition l'interaction entre la synaptotagmine et le complexe SNARE (71).

En résumé, Rab3A semble avoir de multiples fonctions dans la régulation de l'exocytose et intervient aux différentes étapes d'arrimage, d'amorçage et de fusion des VS. Elle semble également impliquée dans la plasticité synaptique. Certaines études sont contradictoires et finalement il semble impossible de déterminer à ce jour si elle a un rôle plutôt inhibiteur ou activateur de la transmission synaptique.

## 4. Les effecteurs de Rab3A

### 4.1. La Rabphiline

La Rabphiline découverte en 1992 (72), est une protéine cytosolique dont l'expression est spécifique des cellules sécrétrices. Dans les neurones, la Rabphiline est exclusivement localisée dans les terminaisons présynaptiques, où elle s'associe aux VS et son expression dépendrait pour une part de la présence de Rab3a ou de Rab3c. En effet, chez la souris KO *rab3a*<sup>-/-</sup>, l'expression de la Rabphiline est largement diminuée (de 70% malgré un taux normal d'ARNm) (62) et la Rabphiline s'accumule dans le corps cellulaire des neurones (73). Ceci montre l'implication de Rab3 dans la stabilité de la Rabphiline et l'adressage de celle-ci aux sites de libération des VS.

Elle est divisée en 3 domaines distincts :

- Le segment N-terminal constitué d'un domaine hélical suivi d'un domaine en doigt de zinc, tous deux participant à l'interaction avec Rab3-GTP. La Rabphiline interagit aussi avec des motifs CDR de Rab3 par un motif SGAWFF.
- Le domaine central qui comprend deux régions riches en prolines, qui contribueraient à la liaison de la Rabphiline aux membranes ainsi que des sites de phosphorylation par la PKA.
- Le segment C-terminal constitué de deux domaines C2, C2A et C2B, liant les phospholipides acides (phosphatidylsérine et phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) de manière dépendante du calcium.

Le fait que la Rabphiline soit un effecteur de rab3A est soumis à controverse. Tout d'abord sa localisation sur les VS et les granules de sécrétion évoquait un rôle dans l'exocytose régulée. De plus son recrutement par la forme active de Rab3 avec une affinité importante ainsi que la dissociation de Rab3A et de la Rabphiline de la vésicule après sa fusion, suggéraient que la Rabphiline est un effecteur de Rab3 (74). Des études ont progressivement montré que la Rabphiline pourrait avoir des fonctions indépendantes de Rab3 et réciproquement. Un effet stimulateur sur la libération d'hormones dans les cellules PC12 et HIT-T15 a été mis en évidence (75)(76) mais cet effet serait indépendant de Rab3.

De plus, chez les souris KO pour la Rabphiline, l'altération de la transmission synaptique observée chez les souris KO *rab3A*<sup>-/-</sup> n'a pas été observée (77).

Plus récemment Deak et al. ont proposé que la Rabphiline ralentissait le réamorçage des vésicules synaptiques après une stimulation prolongée par le biais de son interaction par son domaine C2B avec la protéine SNARE SNAP25. En effet, l'assemblage du complexe SNARE est le facteur limitant dans la reconstitution du RRP après sa déplétion lors d'une stimulation prolongée. Le complexe Rab3/Rabphiline régulerait finement la transition entre le stade où les vésicules ont un complexe SNARE partiellement ou totalement assemblé et celui où elles deviennent sensibles à l'influx de calcium et ainsi le complexe participerait au phénomène de dépression au cours d'une activité synaptique accrue (78).

La Rabphiline semble également capable d'interagir avec de nombreuses autres protéines par son domaine C2B notamment CASK. Cette interaction permettrait de guider les VS vers les domaines où se situent les neurexines, molécules d'adhésion synaptique, et ainsi d'augmenter l'efficacité de la transmission synaptique (79).

Dans les cellules PC12, la rabphiline interagit par son domaine N-terminal avec l'actinine  $\alpha$ , ce qui permet l'association des granules de sécrétion avec les filaments d'actine F (80). Elle pourrait également jouer un rôle dans le processus d'endocytose après la régulation de l'exocytose avec Rab3A, par son interaction avec la Rabaptine 5, un effecteur de Rab5 impliqué dans l'endocytose (81).

De nombreux mécanismes d'action pour la Rabphiline sont ainsi proposés, mais il n'existe aucun consensus sur les étapes ou les mécanismes dans lesquels la Rabphiline intervient.

#### **4.2. RIM1 $\alpha$ /2 $\alpha$**

Plus récemment, un autre effecteur de Rab3 a été isolé par l'approche du double hybride et dénommé RIM, pour Rab3 Interacting Molecule (82). En fait, il existe 2 protéines RIM, dénommées RIM1 $\alpha$  et RIM2 $\alpha$ , codées par des gènes distincts.

Ces protéines partagent certains domaines structuraux avec la Rabphiline dont :

- Le domaine hélical N-terminal suivi d'un domaine en doigt à zinc,
- Les deux domaines C2, qui par contre sont incapables de se lier au calcium,

- Des sites de phosphorylation par la PKA,
- Et le motif SGAWFF, important pour l'interaction de la Rabphiline avec les domaines CDR de Rab3.

Par contre, ils se distinguent de la Rabphiline par l'existence d'un domaine central PDZ.

L'expression des RIM est exclusivement neuronale. Ces protéines sont absentes des VS et associées à la membrane plasmique, plus spécifiquement au niveau de la zone active, site de la libération des neurotransmetteurs. Cette localisation implique que les RIM $\alpha$  interagissent avec Rab3 uniquement lorsque les VS se déplacent au niveau de la zone active.

La délétion de *rim1 $\alpha$*  chez la souris induit une altération de l'exocytose des VS et altère la plasticité neuronale à court terme (83), mais aussi la potentialisation à long terme dans les fibres moussues de la région CA3 de l'hippocampe ainsi que dans les fibres parallèles du cervelet. La souris KO *rim1 $\alpha$* <sup>-/-</sup> présente aussi une diminution de 60 à 70% de l'expression de la protéine Munc13-1, probablement déstabilisée en l'absence de Rim1 $\alpha$ . Munc13-1 n'est pas correctement recrutée au niveau de la zone active. Les souris KO présentent également des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation (84).

Les études électrophysiologiques réalisées sur des neurones où *Rim1 $\alpha$*  est délétée montrent que les conséquences sont variables selon le type cellulaire considéré. En résumé RIM1 $\alpha$ , grâce à son interaction avec Rab3 joue un rôle essentiel dans l'induction de plusieurs formes de plasticité présynaptique dépendantes de la PKA, aussi bien au niveau de synapses excitatrices que de synapses inhibitrices ; et elle pourrait même intervenir dans le maintien de la plasticité postsynaptique à long terme.

Au contraire, la souris KO *rim2 $\alpha$* <sup>-/-</sup> ne présente aucune perturbation de la transmission synaptique excitatrice ou inhibitrice, suggérant un effet compensateur de RIM1 $\alpha$  dans les neurones. Alors que les KO simples sont viables, les KO double meurent au cours de la période postnatale en raison de défaillance respiratoire (85).

Le rôle de RIM au cours de l'exocytose régulée est bien défini. L'interaction de RIM avec la protéine Rab3 localisée au niveau de la VS induit l'arrimage de la VS, ensuite son interaction avec Munc13 permet l'amorçage de la VS et enfin son interaction directe ou indirecte via les RIM-BP avec les canaux calciques permet le positionnement de ces canaux à proximité des VS pour déclencher la libération des neurotransmetteurs en couplant de manière efficace les étapes d'excitation et de sécrétion (86).

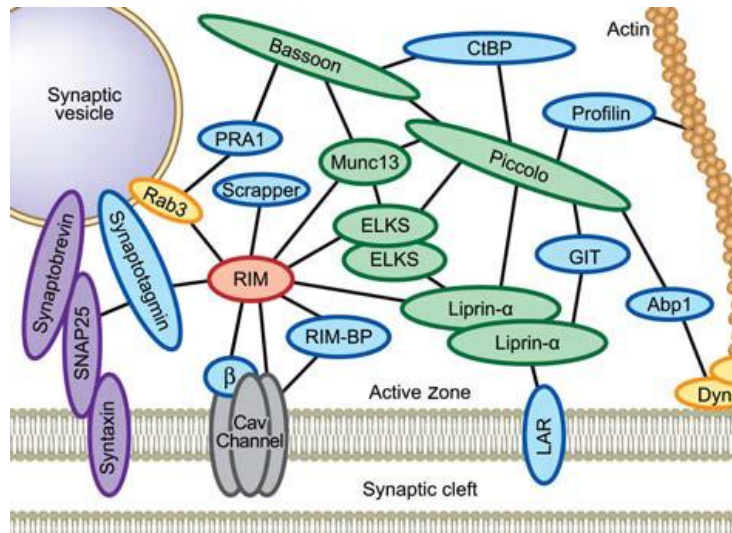


Figure 9 : RIM composant central du réseau protéique au niveau des zones actives des terminaisons nerveuses d'après Mittelstaedt et al. (87).

RIM (en rouge) interagit avec les protéines de la zone active (en vert) ainsi qu'avec d'autres protéines fonctionnelles présynaptiques. Les protéines SNARE sont en violet et les GTPases en jaune.

(Abp1) Amiloride-binding protein; ( $\beta$ ) Ca<sub>2</sub>qchannel subunit  $\beta$ 4; (CtBP) C-terminal binding protein; (Dyn) Dynamin; (ELKS) ERC/RAB6-interacting/CAST; (GIT) G-protein coupled receptor kinase-interactor; (LAR) LCA-related protein tyrosine phosphatase; (PRA) prenylated Rab acceptor; (Rab) Ras-related in brain; (RIM) Rab interacting molecule; (RIM-BP) RIM-binding protein; (SNAP) synaptosome associated protein.



## Patients et méthodes

### I. Données cliniques

#### A. Famille étudiée

La famille étudiée est d'origine algérienne et consanguine, les parents sont cousins germains (Figure 10), bien portants. Le premier garçon est bien portant.

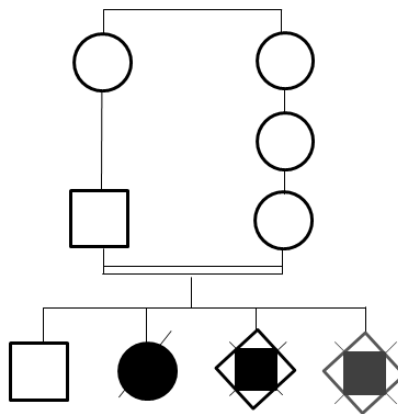


Figure 10 : Arbre généalogique de la famille d'origine algérienne.

Le 2<sup>e</sup> enfant de la fratrie, une fille, était atteinte de WARBM, elle est décédée à l'âge de 13,5 mois. Au cours de la grossesse, l'échographie de 24 SA avait montré des pieds bots bilatéraux pour lesquels une amniocentèse avait été effectuée, le caryotype était normal 46,XX. La grossesse a ainsi abouti à la naissance à 34 SA d'une fille présentant à l'examen clinique une dysmorphie faciale avec une microcéphalie (PC à 28,5 cm au 3<sup>e</sup> percentile), des oreilles implantées bas et orientées vers l'arrière et de petite taille, un aspect pointu de la partie occipitale du crâne, un petit nez court, un philtrum long, une petite bouche, et la lèvre supérieure surplombant la lèvre inférieure. Elle présentait également un retard de croissance (taille à 39 cm très inférieure au 3<sup>e</sup> percentile), une cataracte congénitale

bilatérale, une arthrogrypose distale avec des pieds bots bilatéraux sévères (figure 11). Le scanner montrait une atrophie corticale diffuse, et l'IRM une gyration simplifiée, des sillons corticaux courts, une épaisseur de la substance blanche réduite, une petite atrophie cérébelleuse et l'absence d'une microphthalmie (figure 12). Par ailleurs elle ne présentait aucune anomalie cardiaque ou rénale. Elle est décédée à l'âge de 13,5 mois. Parmi les explorations réalisées, des sérologies (CMV, herpès et rubéole) ont permis d'éliminer une foetopathie virale, et une CGH-array normale n'a pas mis en évidence de remaniement chromosomique. Un syndrome COFS a été évoqué mais éliminé devant l'absence d'anomalie de la réparation de l'ADN sur cultures de fibroblastes. Un WARBM a été suspecté et le séquençage du gène *RAPB3GAP1*, seul gène identifié à l'époque a été entrepris, mais aucune mutation n'a été mise en évidence.



Figure 11 : Anomalie des extrémités (pieds bots bilatéraux) du premier enfant atteint.

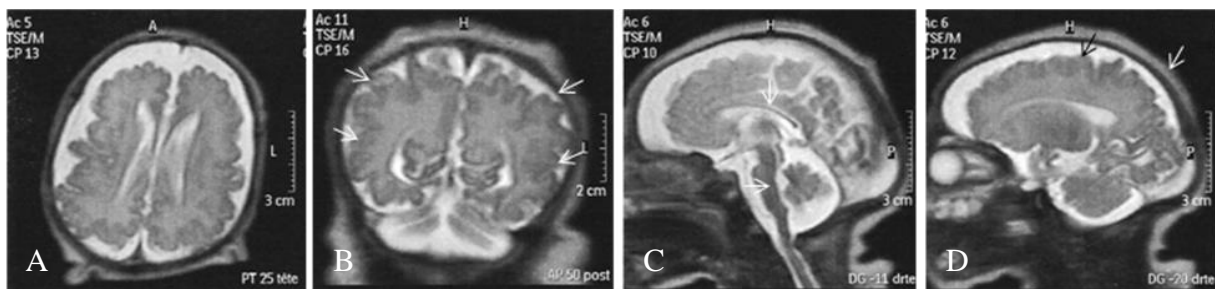


Figure 12 : Coupes d'IRM représentatives du cas index au terme corrigé 38 semaines et 2 jours en séquence T2.

A : en coupe axiale, on note un cortex épaissi et irrégulier de façon diffuse, prédominant dans les régions pariéto occipitales, de type polymicrogyrique. B : en coupe coronale postérieure, on retrouve un cortex polymicrogyrique (flèches). C : en coupe sagittale médiane, le corps calleux est fin mais complet, et le tronc cérébral paraît modérément hypoplasique (perte du relief de la protubérance). D : en coupe parasagittale, on retrouve le cortex polymicrogyrique dans la région pariétale (flèches).

Pour la 3<sup>e</sup> grossesse du couple, une demande d'interruption médicale de grossesse pour récurrence du syndrome polymalformatif a été réalisée à 27 SA. Le suivi échographique avait révélé une hyperclarté nucale à 12 SA, une fosse postérieure large à 22 SA, un corps calleux non visualisé; puis une hyperclarté nucale persistante, des cristallins hyperéchogènes et une cataracte bilatérale à 26 SA (figure 13). Aucune IRM cérébrale anténatale n'avait été réalisée. A l'examen foetopathologique, le fœtus de sexe masculin présentait une dysmorphie faciale (avec microphthalmie, petites fentes palpébrales, hypertélorisme, oreilles grossières, petit nez avec narines légèrement antéversées, petite bouche tombante, cheveux bas implantés, épicanthus bilatéral), une agénésie des os propres du nez, des pieds bots bilatéraux (figure 14), une hypertrichose, des anomalies du SNC (microcéphalie, hypoplasie du corps calleux, hypoplasie ponto-cérébelleuse et micropolygyrie) et des anomalies oculaires (microphthalmie et cataracte bilatérale), confirmant qu'il s'agissait d'une récurrence de WARBM.



Figure 13 : Suivi échographique de la troisième grossesse du couple.

Anomalies du développement cérébral avec hypoplasie du corps calleux (A : corps calleux court, partie postérieure manquante), un tronc cérébral fin (B) et une cataracte bilatérale révélée par des cristallins hyperéchogènes (C), à l'échographie de 26 SA.



Figure 14 : Troisième grossesse du couple: Anomalie des extrémités du fœtus de 27 SA (examen foetopathologique).

Pour la 4<sup>e</sup> grossesse du couple, l'échographie de 12 SA révélait une hyperclarté nucale et une fosse postérieure semblant anormale avec des cristallins trop visibles suggérant une possible récurrence de WARBM. La recherche de la mutation du gène *LRRTM4* alors déjà identifiée par l'exome a été acceptée par le CPDPN de l'hôpital Necker, avec les réserves liées à l'absence de validation fonctionnelle expliquées au couple. Celle-ci a montré que le fœtus était homozygote pour la mutation, et une 2<sup>e</sup> interruption médicale de grossesse, cette fois ci précoce et par aspiration a ainsi été réalisée.

## B. Cohortes testées

Deux cohortes internationales de patients atteints de WARBM, sans mutation dans les 3 gènes connus au moment de la réalisation de ce travail : *RAB3GAP1*, *RAB3GAP2* et *RAB18*, nous ont été adressées : 30 patients de l'Institut de Génétique Humaine de Fribourg (Dr Deborah Morris-Rosendahl) et 37 patients de l'Institut de Génétique et Médecine Moléculaire d'Edimbourg (Dr Irena Aligianis). Un patient atteint de WARBM, de l'hôpital Robert Debré, et sans mutation dans les gènes connus, nous a été également adressé.

Par la suite, Les ADNs d'une cohorte de 126 patients/foetus présentant des anomalies de la plaque corticale explorés à l'Institut Cochin de Paris (Dr Karine Poirier, Dr Nadia Bahi-Buisson), et sans gène identifié, nous ont été transmis. Les échantillons d'ADN en provenance de Fribourg et Edimbourg portaient uniquement un numéro d'identification, aucun renseignement clinique n'a été transmis mais il s'agit de patients atteints ou suspects de WARBM. Pour les ADNs en provenance de l'Institut Cochin, la clinique des patients nous a été partiellement transmise :

- parmi les patients avec microcéphalie, 11 patients présentent une polymicrogyrie, 3 patients une pachygyrie, un patient a une simplification gyrale et un patient est sans anomalie de la plaque corticale,
- parmi les patients avec un PC normal, 21 patients présentent une polymicrogyrie, 4 une agyrie postérieure, et l'un une lissencéphalie,
- parmi les patients dont le périmètre crânien est inconnu, 13 présentent une polymicrogyrie, 2 une agyrie postérieure et un une simplification gyrale,
- parmi les patients dont le phénotype ophtalmologique était connu, aucun ne présentait d'anomalie oculaire (soit 39 patients).

## II. Extraction d'ADN

L'ADNg du cas index a été extrait à partir de sang total grâce au kit QIAamp DNA Blood Maxi (Qiagen) et dosé au nanodrop, à l'hôpital Robert Debré, où elle était suivie. Après obtention des consentements, les ADNs des autres membres de la famille (les parents

et le frère sains) ont été extraits à partir de prélèvement de sang total grâce au kit Nucleon BACC3 (GE Healthcare). L'ADNg du fœtus interrompu en 2009 a été extrait à partir de tissus de poumon par la méthode de phénol-chloroforme-alcool isoamylique selon la procédure du laboratoire d'Embryologie Moléculaire de Necker. L'ADNg du fœtus interrompu en 2012 a été extrait à partir d'une biopsie de trophoblaste par la méthode au chlorure de guanidium (dénaturant des structures protéiques) selon une procédure du laboratoire de Génétique Médicale de Necker.

Les ADNs ont ensuite été dosés au nanodrop par spectrophotométrie et leur qualité a été estimée par dépôt sur un gel d'agarose à 1% contenant du Bromure d'Ethidium.

La méthode d'extraction des ADNs des patients issus des différentes cohortes ne nous a pas été précisée.

### **III. Analyse de liaison par puce Affymetrix 250K**

Une analyse de liaison génome entier a été réalisée dans la famille, en utilisant les ADNs des deux enfants atteints, du frère sain et des parents, par puce Affymetrix génotypant 262 000 SNPs (Affymetrix 250K, plateforme génomique Hôpital Necker, Christine Bole-Feysot). Les puces ont été hybridées sur la plateforme Affymetrix et les génotypes ont été calculés par le logiciel Genotyping console qui utilise l'algorithme BRLMM (Affymetrix). L'analyse des données a été réalisée par calcul des lodscores multipoints avec le logiciel MERLIN en supposant un modèle récessif à pénétrance complète (Dr. Patrick Nitschke, Plateforme bio-informatique, Institut *Imagine*, Hôpital Necker – Enfants malades et Université Paris Descartes, Paris).

L'objectif des analyses de liaison est de localiser les régions pouvant contenir le locus responsable de la maladie (dans le cas d'une maladie monogénique). La méthode des lodscores est basée sur la co-ségrégation des allèles de marqueurs polymorphes, cette co-ségrégation étant due à l'existence d'une liaison génétique. Le lodscore Z cherche à quantifier la probabilité que les résultats obtenus pour 2 marqueurs résultent d'une liaison génétique plutôt que du hasard. Z est le logarithme du rapport des vraisemblances entre l'hypothèse de liaison génétique et l'hypothèse contraire (pas de liaison).

$$Z(\theta_i) = \log_{10}[L(\theta_i)/L(\theta=0,5)]$$

$L(\theta_i)$  : liaison

$L(\theta=0,5)$  : pas de liaison

$\theta$  est le taux de recombinaison en cM.

Ainsi deux loci sont liés génétiquement si  $Z = 3$ . La liaison est exclue, si  $Z < -2$  et on ne peut pas conclure si  $-2 < Z < 3$ .

Dans le cas d'une famille consanguine, l'étude de marqueurs polymorphes SNPs permet d'identifier les régions homozygotes du génome, candidates pour contenir le gène responsable de la maladie.

#### **IV. Séquençage d'exome sur plateforme à haut débit SOLiD4 (Life Technologies)**

L'exome est l'ensemble des exons du génome. Le séquençage d'exome a été réalisé chez le cas index par la plateforme Génomique de l'Institut *Imagine* (financement genoscope/GIS-maladies rares), à l'aide d'une banque de capture Agilent, sur séquenceur SOLiD4.

##### **A. Préparation des banques d'ADN**

Pour chaque individu, une banque d'ADN est produite à partir de 3  $\mu\text{g}$  d'ADNg (le dosage doit être réalisé au Qubit avec le kit Qubit dsDNA BR Assay kit dans un premier temps, puis si la concentration est inférieure à 100 ng/ $\mu\text{l}$ , un dosage plus précis avec le kit Qubit dsDNA HS Assay kit est fait). Au cours de la préparation des échantillons, l'ADNg est fragmenté par sonication (obtention de fragments de 200 pb). L'ADN fragmenté est réparé aux extrémités pour ajouter par ligation deux adaptateurs universels différents aux extrémités nommés P1 et P2, qui permettront d'amplifier et de séquencer des milliers de molécules d'ADN en parallèle en utilisant un seul type d'amorces.

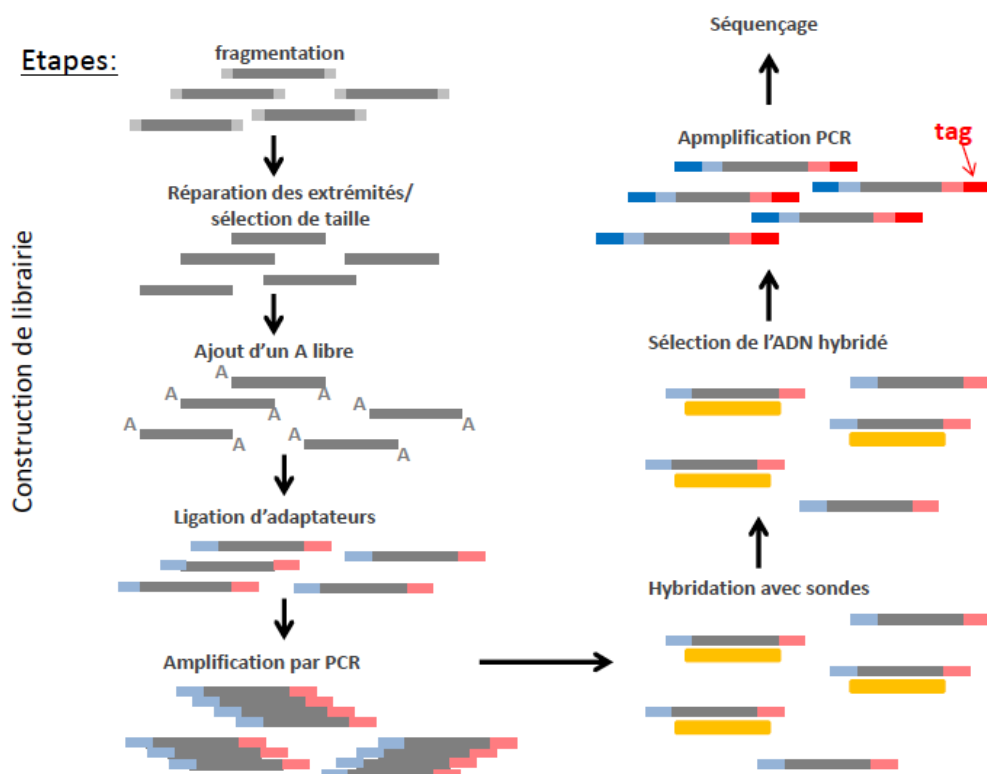


Figure 15 : Etapes de la préparation des banques et de la capture.

## B. Capture par hybridation en phase liquide

L'enrichissement des séquences d'intérêt (exons et jonctions intron-exon) est obtenu par capture par hybridation en solution. Cette technologie utilise un pool de sondes d'ARN simple brin biotinylées dont les séquences sont complémentaires des séquences d'intérêt (System Agilent SureSelect<sup>XT</sup>, kit Human All Exons 50Mb). La taille des sondes (120 pb) permet une grande spécificité de capture.

Au cours d'une incubation de 24 heures à 65°C, les sondes s'hybrident sélectivement aux régions génomiques d'intérêt. Puis les complexes ADN/sonde sont capturés grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine et des lavages successifs permettent d'éliminer les fragments d'ADN non hybridés. Enfin les fragments correspondant aux séquences d'intérêt sont élués. La dernière étape consiste en l'addition d'une séquence spécifique, appelée barcode (ou tag) à chaque banque en vue de pooler plusieurs banques



pour le séquençage. Le séquençage du barcode permettra l'identification de chaque banque au sein d'un pool.

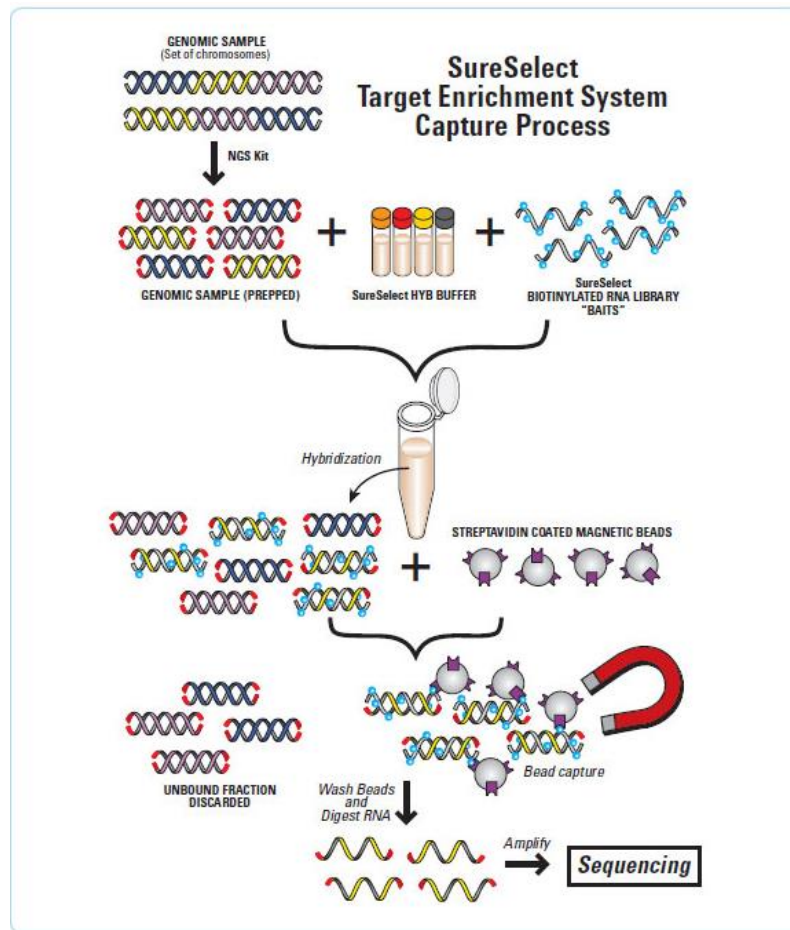


Figure 16 : Principe de la technologie de capture Sureselect<sup>XT</sup> d'Agilent.

## C. Le séquençage

### 1. Amplification clonale sur billes par PCR en émulsion et enrichissement des billes

Une PCR en émulsion est réalisée sur un pool de 4 banques d'ADN grâce au système EZBead (Life Technologies) afin d'amplifier de façon clonale les fragments d'ADN sur des billes.

Les billes sont couplées à une sonde qui est complémentaire de l'adaptateur P1 ajouté à une extrémité des fragments d'ADN lors de la constitution des banques. Cette sonde permet aux fragments de se fixer sur les billes.

La phase aqueuse contient les réactifs de PCR, les fragments d'ADN et les billes. La phase huileuse permet la formation de microgouttelettes de phase aqueuse, chacune étant équivalente à un microréacteur. Les quantités de billes et de molécules d'ADN utilisées pour la PCR en émulsion sont optimisées de façon à obtenir le maximum de gouttelettes qui contiennent un seul fragment d'ADN et une seule bille afin de n'avoir que des billes monoclonales. En effet, si plusieurs fragments d'ADN sont présents dans une microgouttelette, il y aura formation de billes polyclonales pour lesquelles les données de séquençage sont ininterprétables et sont éliminées, ce qui diminue la qualité du séquençage.

Une étape d'enrichissement à la fin de la PCR en émulsion permet d'augmenter la proportion de billes recouvertes d'ADN (de 30 à 80%), les billes sans ADN sont éliminées.

L'extrémité 3' des fragments d'ADN est ensuite modifiée chimiquement pour permettre la fixation covalente au support de séquençage, une lame de verre recouverte d'un revêtement spécial permettant cette fixation.

Une réaction de séquence aura lieu au niveau de chaque bille fixée à la lame de verre et ainsi plusieurs millions de réactions de séquence ont lieu simultanément.

## **2. Séquençage sur SOLiD4™**

La technologie SOLiD™ (Support Oligonucleotide Ligation and Detection) est basée sur une synthèse par ligation et non pas par polymérisation. La fluorescence est utilisée comme mode de détection avec 4 fluorophores différents. L'encodage est à 2 bases, c'est à dire qu'un fluorophore correspond à un enchainement des 2 bases. Avec 16 combinaisons possibles de 2 bases chaque fluorophore correspond à 4 dinucléotides.

La ligation est réalisée à l'aide de sondes d'interrogation spécifique. Chaque sonde est un octamer composé de 3' vers 5' : de 2 bases spécifiques (les bases de l'encodage), suivies de 6 bases dégénérées puis d'un des quatre marqueurs fluorescents. La nature du marqueur est fonction de la séquence des 2 premières bases. Ces octamers fluorescents présentent entre la 5<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> base un site de clivage.

Une amorce de séquençage universelle se fixe sur l'adaptateur P1 puis les sondes d'interrogation sont ajoutées. Dès que l'une d'entre elles correspond à la séquence adjacente à l'amorce, la ligase la fixe et la fluorescence émise est détectée afin d'identifier la sonde fixée et ainsi ses deux premières bases. Un clivage chimique retire les bases 6 à 8 ainsi que le fluorophore. Ensuite les sondes d'interrogation sont à nouveau ajoutées : les bases 6 et 7 du fragment à séquencer sont alors identifiées. Dans un troisième temps les bases 11 et 12 sont à leur tour identifiées, et ainsi de suite jusqu'aux bases 31 et 32. Un deuxième cycle de ligation est alors entamé avec une amorce universelle se fixant en position n-1 et les bases en position 0 et 1, 5 et 6, et ainsi de suite jusqu'aux bases 30 et 31 sont identifiées. 3 nouveaux cycles de ligation sont effectués grâce à des amorces se fixant en n-2, n-3 puis n-4. Le nombre de cycles de ligation, détection et clivage détermine ainsi la longueur de lecture, de 35 bases dans le cas présenté ici jusqu'à 75 bases.

Chaque base étant lue deux fois, cette technologie est caractérisée par une grande précision, elle est particulièrement adaptée pour des projets de reséquençage du génome ou l'analyse de polymorphismes. Néanmoins, la complexité de fonctionnement de cette technologie qui implique un lourd travail d'analyse, le séquençage de fragments courts (au maximum 75 pb), son faible débit et son coût sont autant d'inconvénients, qui expliquent qu'elle est de moins en moins utilisée.

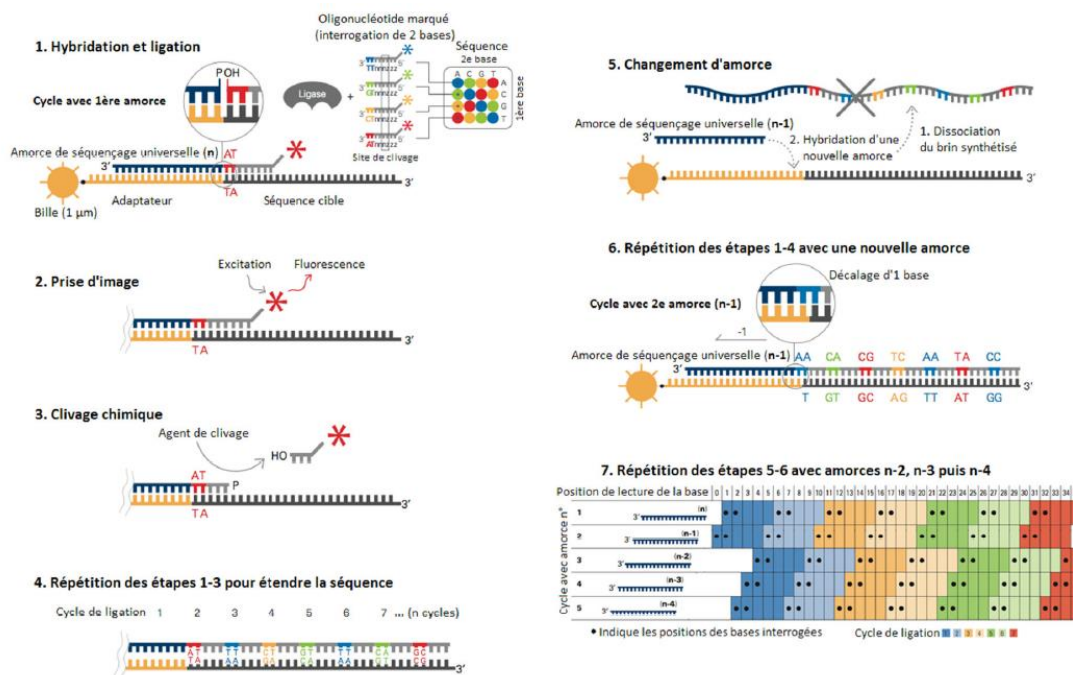


Figure 17 : Principe du séquençage sur la plateforme SOLiD™.

### 3. Analyse bioinformatique

Les 4 à 5 Gb de données produites par exome sont ensuite transmises à la plateforme Bioinformatique (Université Paris Descartes, Institut *Imagine*).

Après démultiplexage, les séquences sont alignées sur la séquence de référence du génome humain (hg19, UCSC Genome Browser) à l'aide du logiciel LifeScope (Life Technologies) pour les données issues du SOLiD. Les variations génétiques sont détectées à l'aide du logiciel Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, et Picard et seules sont considérées les variations répondant aux critères de qualité établis.

Une fois l'alignement et la détection de variants réalisés, les résultats sont transmis par la plateforme Bioinformatique (Université Paris V, Institut *Imagine*) grâce à l'interface Polyweb développée par la plateforme. Cette interface permet de filtrer les résultats selon la présence des variants dans les bases publiques dbSNP (build 135), Exome Variant Server (EVS, ESP6500SI-V2), et 1000 Genomes (May 21, 2011), ainsi que les variants identifiés dans les exomes locaux (>3000). Il est ensuite possible de sélectionner les variations en fonction de leur position (intergéniques, introniques, transcrits, séquences codantes, sites d'épissages), ou de leur effet prédit (variations neutres, faux-sens, non sens etc...). Après ces

étapes de filtration, une liste de variants est obtenue. Les variations retenues sont vérifiées par séquençage direct selon la méthode Sanger décrite au paragraphe suivant.

## **V. Séquençage direct**

### **A. Choix des amorces**

Toutes les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Les amorces des gènes *LRRTM4* et *VRK2* ont été choisies dans les introns en dehors de SNPs de façon à amplifier chaque exon et les séquences introniques flanquantes. Pour *LRRTM4*, l'exon 1 qui n'est pas codant n'a pas été séquencé. Deux amorces forward ont été utilisées successivement pour l'exon 2 en raison d'un homopolymère de 18 T dans l'intron 1 rendant difficile le séquençage de l'exon 2 avec la première amorce située en amont de cet homopolymère, c'est pourquoi une 2<sup>e</sup> amorce a été choisie ensuite en aval afin de faciliter le séquençage. L'exon 3 a été divisé en quatre amplicons chevauchants en raison de sa grande taille (1547 pb). Pour *VRK2*, l'exon 1 n'étant pas codant également, il n'a pas été séquencé. Et l'exon 13 (572 pb) a été divisé en 2 amplicons.

Les amorces des autres gènes candidats ont été choisies de manière à encadrer la variation trouvée en exome afin de vérifier sa présence chez le cas index, puis de faire une ségrégation familiale pour celles confirmées.

### **B. Le séquençage**

Les réactions de PCR ont été réalisées avec le kit Taq Roche sur un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

La PCR ainsi que sa spécificité ont été vérifiées sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium avec le marqueur de taille GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermoscientific). Les dépôts sont faits à l'aide du bleu de migration 6X DNA Loading Dye (Thermoscientific).

Les produits de PCR ont été purifiés avec l'Exo-SAP cleanup kit (USB), les amorces et les dNTPs non utilisés sont dégradés par digestion enzymatique.

Les réactions de séquence sont réalisées sur les produits de PCR purifiés avec le BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), purifiées à l'aide du BigDye XTerminator™ purification kit (Applied Biosystems). Le séquençage en lui-même est réalisé par méthode Sanger sur les séquenceurs ABI 3130 ou ABI 3500 (Applied Biosystems, polymère POP-7™), et les séquences ont été analysées grâce au logiciel Seqscape.

## **VI. Extraction des ARN totaux**

Les ARNs totaux de différents tissus témoins et d'un fœtus atteint ont été extraits afin d'étudier l'expression du gène candidat *LRRTM4*. L'extraction des ARNs a été réalisée à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen) pour le cortex cérébral et la moelle épinière. L'extraction a été réalisée en suivant les recommandations du fabricant (Annexe 3 : le  $\beta$ -mercaptoéthanol a été utilisé comme agent réducteur pour dénaturer les ribonucléases libérées lors de la lyse des cellules, l'homogénéisât a été obtenu selon l'étape décrite en 3.c, et l'étape optionnelle 10 n'a pas été effectuée).

Pour les fibroblastes, l'extraction a été effectuée avec le kit RNeasy Midi kit (Qiagen), selon les recommandations du fabricant.

Pour les lymphocytes témoins, l'extraction a été effectuée avec le kit PAXgene™ Blood RNA kit (Qiagen), selon les recommandations du fabricant.

## **VII. RT PCR**

La reverse transcription a été réalisée avec le kit RNA PCR core kit GeneAmp (Applied Biosystems) en utilisant comme amorces les random hexamers.

Protocole

- Le Master mix est préparé selon le tableau présenté en annexe 4,
- 1  $\mu$ g d'ARN au maximum est introduit dans le milieu réactionnel,

- dans un thermocycleur un programme décrit dans l'annexe 4 est lancé afin d'obtenir les ADNc correspondants.

Le succès de la reverse transcription est contrôlé par PCR de l'ADNc du gène *SMN*, gène ubiquitaire utilisé comme témoin de la reverse transcription. Les amorces utilisées sont spécifiques de l'ADNc et 2 bandes correspondant aux 2 isoformes de l'ARNm sont observées sur le gel.

Les amorces pour la PCR de l'ADNc de *LRRTM4* ont été choisies de manière à être spécifiques des 2 isoformes de l'ARNm, et si possible spécifiques de l'ADNc (c'est-à-dire n'amplifiant pas l'ADNg). Dans un premier temps, j'ai choisi d'utiliser des amorces utilisées pour le séquençage direct de *LRRTM4*. Mais le couple spécifique de l'isoforme longue correspondait à un amplicon de grande taille : 836 pb, j'ai donc choisi un autre couple d'amorces grâce au logiciel Primer 3 avec une taille d'amplicon de 481 pb, dans le cas où l'absence d'amplification serait due à la taille de l'amplicon et non l'absence d'expression de l'isoforme. Le couple d'amorces spécifique de l'isoforme courte n'étant pas spécifique de l'ADNc, l'absence de contamination par de l'ADNg a été vérifiée par PCR en utilisant un couple d'amorces spécifique de l'ADNg (amplicon 3-1 avec une amorce intronique). Les amorces et conditions PCR sont présentées dans l'annexe 5.

## **VIII. Western-blot**

### **A. Extraction des protéines**

Les protéines sont extraites à partir de tissus congelés et conservés à -80°C.

Les protéines ont été extraites à partir de moelle épinière de 4 fœtus témoins et du fœtus muté interrompu en 2012 dans la famille.

Un lysat cellulaire est obtenu par broyage du tissu congelé dans l'azote liquide et ajout de tampon RIPA buffer 1X (Thermoscientific) additionné d'un cocktail d'antiprotéases et antiphosphatases (Antiprotéase/phosphatase 100X Thermoscientific).

Protocole

- Ecraser le tissu congelé dans le mortier refroidi avec de l'azote avec le pilon jusqu'à l'obtention d'une poudre
- Resuspendre dans le RIPA (500 µl de RIPA pour 200 mg de tissus)
- Laisser 30 minutes dans la glace
- Homogénéiser par aller-retour avec une pipette
- Centrifuger 30 minutes à +4°C à 10000 rpm
- Conserver à -80°C si l'échantillon n'est pas utilisé immédiatement.

Le dosage des protéines se fait grâce au kit BCA (Thermoscientific). Il s'agit d'une méthode colorimétrique : le dosage par la méthode du Biuret est couplé avec l'acide bicinchoninique. L'ion  $\text{Cu}^{2+}$  est réduit à pH alcalin grâce à certains acides aminés (et par les liaisons peptidique à haute température, >37°C). Ensuite 2 molécules de BCA chélatent spécifiquement le  $\text{Cu}^{+1}$  et le complexe absorbe à 562nm (pourpre).

#### Protocole

- Préparer la solution WR : 1 ml de réactif A est ajouté à 20 µl de réactif B
- Préparer la gamme BSA (sérum albumine bovine) : 0,5-1-2-4-6-8-10 µg/µl
- Mélanger 5 µl de la solution de protéines à doser et 40 µl de WR
- Mélanger de la même manière les différentes solutions de la gamme dans la solution WR
- Incubation 30 minutes dans une étuve à 37°C
- Dosage au Nanodrop.

## B. Western-blot de LRRTM4

### 1. Dénaturation des échantillons

Les protéines doivent être dénaturées avant leur migration sur gel.

Pour chaque échantillon 50 µg de protéines sont additionnés de bleu de migration 4X NuPAGE LDS sample buffer 4X (Life Technologies) additionné de β-mercaptoéthanol et sont dénaturées sur une plaque chauffante à 95°C pendant 10 minutes. Les tubes doivent être mis dans la glace immédiatement après les avoir retirées de la plaque chauffante puis centrifugés rapidement.



## **2. Dépôt et migration des échantillons**

Les échantillons préparés précédemment sont déposés sur un gel prêt à l'emploi, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gel (Life Technologies), ainsi que 10 µl de marqueur de taille, Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (Life Technologies).

Le tampon de migration utilisé est le NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X (Life Technologies), qui convient pour les protéines de poids moléculaire élevé (16 à  $\geq 200$  kDa) et qui est à diluer dans l'eau milliQ.

La migration débute à 50 V (0,02 A) pendant 10 minutes afin de faire pénétrer les échantillons dans le gel, puis se fait à 150 V pendant 1 à 1h30.

## **3. Transfert**

Pour le transfert le tampon utilisé est le NuPAGE Transfer Buffer 20X (Life Technologies) à diluer dans l'eau milliQ.

La membrane, Immun-Blot PVDF membrane 7x8,4cm, (Biorad) doit être préalablement immergée dans du méthanol puis rincée deux fois dans l'eau avant d'être mise dans le bac contenant le tampon de transfert. Quatre papiers Wattman épais sont également mouillés dans le tampon de transfert. Le gel est retiré de son support en plastique dans le bac puis le montage constitué de : 2 Wattman épais en dessous, puis la membrane, au dessus le gel et enfin 2 wattman épais est réalisé dans le bac. Les bulles éventuellement présentes doivent être éliminées pour ne pas gêner le transfert. Le montage est déposé sur le Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic transfer cell (Biorad). Le transfert se fait à 15 V pendant 30 minutes.

## **4. Hybridation**

Deux anticorps différents ont été testés pour la mise au point du Western-blot :

- Anticorps anti-LRRTM4 ab94520 d'Abcam (la région de la protéine ciblée est : résidus 450 à 550), dilution au 1/1000
  - Anticorps anti-LRRTM4 AF5377 de R&D (la région ciblée est : résidus 31 à 424) dilution au 1/1000
- L'actine est utilisée comme contrôle :
- Anticorps anti- $\beta$ actine sc-81178 de Santa Cruz Biotechnology, dilution au 1/10000 ou 1/5000

Selon les recommandations des fabricants, deux solutions de blocage ont été préparées. Pour l'anticorps Abcam, une solution de blocage à 2% est réalisée à partir d'ECL blocking agent (GE Healthcare) dans du PBS-Tween à 0,05%. Pour l'anticorps R&D, une solution de blocage de BSA à 3% est réalisée dans du PBS-Tween à 0,05%. A cette étape, le Tween 20 prévient la fixation non spécifique des anticorps.

La membrane est incubée sous agitation pendant 30 minutes (voire 1 heure) dans la solution de blocage afin d'éviter la fixation non spécifique et ainsi le bruit de fond.

Une dilution des différents anticorps est préparée dans la solution de blocage à 2% pour l'anticorps Abcam et l'anticorps anti-actine ou dans une solution BSA 0,5%-Tween 0,05% pour l'anticorps R&D.

La membrane est insérée dans un tube falcon de 50 ml (la surface où sont déposées les protéines à l'intérieur) afin de réaliser 3 lavages successifs de 5 minutes dans le PBS-Tween 0,05% sous agitation (5 ml de PBS-Tween 0,05%). Puis les solutions d'anticorps primaires d'intérêt sont ajoutées et le tout est incubé toute la nuit à 4°C sous agitation.

Le lendemain 3 lavages successifs de 5 minutes sont effectués dans le PBS-Tween 0,05% sous agitation. Les solutions d'anticorps secondaires sont ensuite ajoutées dans le tube correspondant en fonction de l'anticorps primaire à température ambiante pendant 1 heure, sous agitation.

Les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de Raifort (HRP) utilisés sont :

- Anticorps anti-lapin NA934V de GE Healthcare, dilution 1/10000
- Anticorps anti-souris NA931V de GE Healthcare, dilution au 1/10000
- Anticorps anti-chèvre AP180P de Merck Millipore, dilution au 1/20000

## **5. Révélation**

La révélation est faite par chimioluminescence (ECL Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare).

Dans un premier temps, 3 lavages de 5 minutes dans le PBS-Tween 0,05% sont réalisés sous agitation. Ensuite la membrane est incubée 5 minutes en présence de la solution de révélation. Puis la membrane est mise dans une cassette.

Dans la chambre noire, les films autoradiographiques sont disposés dans la cassette face à la membrane et sont exposés différents temps (10 secondes à 20 minutes) avant d'être développés.

## **IX. Immuno-histochimie**

### **A. Préparation des lames**

Les tissus ont été préalablement fixés dans le formol ou le paraformaldéhyde (PFA) puis inclus en paraffine avant la réalisation de coupes de 5  $\mu$ m au microtome.

Les lames doivent donc préalablement être déparaffinées et réhydratées.

Protocole :

- Les lames sont immergées dans 3 bacs successifs d'Histoclear 3 fois 10 minutes à température ambiante (sous la hotte).
- Les lames sont ensuite immergées dans 2 bains successifs d'éthanol 100% deux fois 5 minutes (sous la hotte).
- Elles sont mises dans des bains décroissants d'éthanol (85%, puis 70%, puis 50% et enfin 30%), 2 minutes dans chaque bain, à température ambiante.
- Les lames sont immergées 5 minutes dans une solution de NaCl à 0,85% à température ambiante (1,45 ml de NaCl eau qsp 50 ml).
- Puis 2 fois 5 minutes dans le PBS 1X (Phosphate buffered saline).

## B. Démasquage des antigènes

Le démasquage des sites antigéniques se fait à une température voisine de 100°C pendant environ 30 minutes dans un tampon citrate.

De plus, le Triton X-100 et le Tween 20 sont des détergents non ioniques qui favorisent la pénétration des anticorps en dissolvant les interactions lipide-lipide et lipide-protéine.

Protocole :

- Les lames sont immergées 2 fois 5 minutes dans du PBS-Triton X-100 0,1%.
- Les lames sont ensuite immergées dans 750 ml de tampon citrate pH 6 (10 mM) + 0,05% de Tween 20 et chauffées au micro-onde à puissance maximale pendant environ 10 minutes (temps nécessaire pour atteindre 100°C).
- Le traitement à 100°C dure ensuite 30 minutes (3 fois 10 minutes afin de ne pas dépasser 100°C et pour vérifier l'évaporation).
- Puis l'ensemble doit refroidir 30 à 40 minutes à température ambiante.
- Les lames sont immergées 5 minutes dans le PBS-Triton X-100 0,1%.
- Les lames sont ensuite incubées 45 minutes à 1h dans du PBS-Tween 0,5%-lait 5% (pour préparer le PBS-Tween 0,5% : mettre 2.5 ml de Tween 20 dans 500 ml de PBS et utiliser du lait Régilait® en poudre : 5 g pour 100 ml de PBS-Tween 0,5%).

Un autre protocole a été testé en utilisant un tampon Tris EDTA à pH 9 au lieu du tampon citrate et en modifiant quelques étapes préliminaires. Ce procédé s'est avéré beaucoup trop agressif pour les lames. En effet, après 30 minutes de traitement par la chaleur, les coupes étaient très abimées et les étapes d'hybridation et de révélation n'ont pas été réalisées.

## C. Hybridation

Les lames sont incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS-Tween 0,5%-lait 1% dans une boîte pour lames en atmosphère humide. 100 µl sont déposés par lame et l'incubation se fait entre lame et lamelle.

Trois anticorps anti-LRRTM4 différents ont été testés pour la mise au point de l'immunohistochimie ainsi que des anticorps anti-NeuN:

- Anticorps anti-LRRTM4 d'Abcam (ab94520 décrit précédemment et ab89949, où la région ciblée est : résidus 324 à 373), dilution au 1/500
- Anticorps anti-LRRTM4 AF5377 de R&D décrit précédemment, dilution au 1/500
- Anticorps anti-NeuN Neuronal Nuclei ABN90P de Merck Millipore, dilution au 1/1000.

L'anti-NeuN a été utilisé comme marqueur neuronal. En effet la majorité des cellules neuronales expriment ce marqueur nucléaire (seules les cellules de Purkinje du cervelet, les cellules mitrales du bulbe olfactif et les cellules photoréceptrices de la rétine ne sont pas NeuN positives). Il est également un marqueur de différenciation neuronale (son expression est restreinte au cours de l'ontogénèse, les cellules de la zone ventriculaire qui contiennent les cellules progénitrices, ainsi que les plaques du plancher, du toit et la zone marginale sont dépourvues de ce marqueur) (88).

## **D. Révélation**

Les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans le PBS-Tween 0,5%.

L'incubation avec les anticorps secondaires se fait à température ambiante pendant une heure. Les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome sont dilués au 1/200 dans du PBS-Tween 0,5%-lait 1% :

- Anticorps anti-lapin (A11008, Life Technologies)
- Anticorps anti-chèvre (A11055, Life Technologies)
- Anticorps anti-cobaye (A11073, Life Technologies)

Puis les lames sont à nouveau lavées 3 fois 5 minutes dans le PBS-Tween 0,5% et le montage est réalisé immédiatement à l'aide du milieu de montage Vectashield with DAPI (Vector Laboratories).

# Résultats

## I. Analyse de liaison sur puce Affymetrix 250K

Nous avons fait l'hypothèse d'un mode de transmission autosomique récessif dans la famille sur la base de la consanguinité dans un premier temps, de l'atteinte de 2 enfants de la même fratrie par une pathologie rare et de l'absence d'atteinte des parents et du frère sain. Nous avons donc présumé que les deux enfants étaient haplo-identiques et homozygotes au locus en cause, ayant reçu le même haplotype de chacun de leurs parents (autozygotie).

L'analyse bio-informatique des résultats a permis la mise en évidence de 3 régions d'autozygotie communes aux 2 enfants (tableau 1 et Figure 18), et pour lesquelles la famille atteint son lodscore maximal de 1,93.

Chromosome	Début de la région	Fin de la région	Nombre de SNPs homozygotes	Taille
2p13.1-q13	rs17009372 (73,955,571)	rs17040773 (112,500,035)	2571	38 Mb
18q11.2-q12.1	rs4800797 (24,758,606)	rs585138 (32,526,034)	801	7,7 Mb
19q13.32-q13.41	rs4804000 (47,276,454)	rs10426 (51,517,798)	151	4,1 Mb

Tableau 1 : Résultats de l'étude de liaison génome entier sur puces Affymetrix 250K dans la famille sur la base de la consanguinité.

Les positions sont données sur la version GRCh37/hg19 du génome.

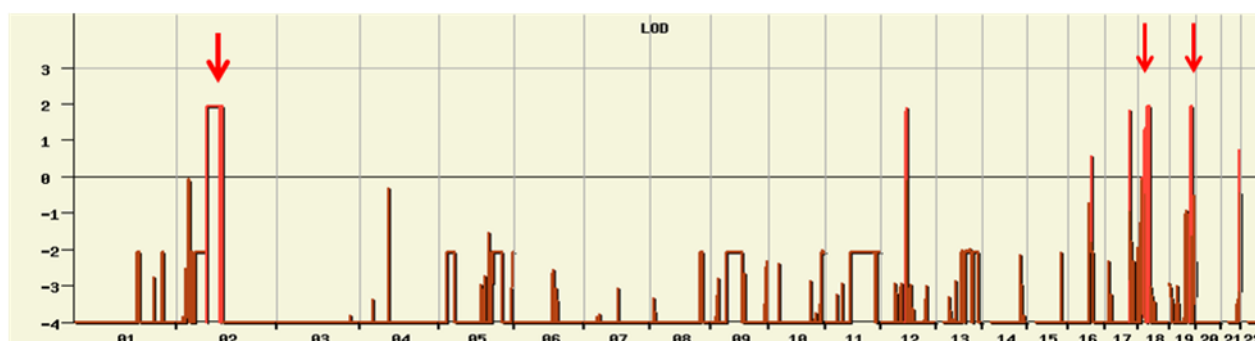


Figure 18 : Résultats de l'étude de liaison génome entier sur puces Affymetrix 250K dans la famille sur la base de la consanguinité.

L'analyse filtrée des résultats met en évidence 3 régions significatives de 38 Mb, 7,7 Mb et 4,1 Mb respectivement sur les chromosomes 2, 18 et 19 avec un Lodscore de 1,93 correspondant au Lodscore maximal atteint dans cette famille.

Nous avons également formulé l'hypothèse récessive ne tenant pas compte de la consanguinité des parents. Nous avons donc présumé que les 2 enfants que nous avons pu étudier étaient alors uniquement haplo-identiques au locus en cause, ayant reçu chacun les deux mêmes haplotypes de chacun de leurs parents, qui peuvent être identiques (variations homozygotes) ou différents (variations hétérozygotes composites).

L'analyse bio-informatique des résultats a permis la mise en évidence de 22 régions haplo-identiques communes aux 2 enfants (tableau 2), et pour lesquelles la famille atteint son lodscore maximal: 0,7. Nous avons ensuite éliminé les régions de moins de 5 Mb (sur les chromosomes 5, 6 et 10) considérées comme trop petites pour être significatives.

Chromosome	Début de la région	Fin de la région	Nombre de SNPs haploidentiques	Taille en Mb
1	153,064,336	159,859,392	489	6,8
	208,589,905	217,124,015	941	8,5
2	23,176,848	73,434,358	5030	50,3
	73,955,571	112,442,218	2570	38,5
5	17,425,508	38,150,689	1979	20,7
	110,794,624	153,904,423	4251	43,1
	176,284,713	180,696,889	260	4,4
6	147,109,823	151,338,476	439	4,2
8	118,274,754	127,464,064	962	9,1
9	22,161,828	27,174,170	569	5
	37,490,577	76,800,597	789	39,3
10	10,228,684	13,714,646	466	3,5
	73,093,924	78,663,894	385	5,6
	127,580,771	135,422,505	794	7,8
11	61,207,310	134,933,972	7247	73,7
12	63,226,289	115,059,361	572	51,8
13	62,123,094	68,070,573	679	5,9
	72,430,863	105,711,151	4066	33,3
16	50,473,548	72,965,194	1944	22,5
17	55,440,184	71,974,611	1177	16,5
18	220,071	32,510,107	2917	32,3
19	47,292,783	59,039,699	651	11,7

Tableau 2 : Résultats de l'étude de liaison génome entier sur puces Affymetrix 250K dans la famille en ne tenant pas compte de la consanguinité.

Les positions sont données sur la version GRCh37/hg19 du génome.

## II. Séquençage d'exome

Devant l'existence de 3 loci potentiels sur la base de la consanguinité et 19 si la consanguinité n'est pas prise en compte, la taille de ces régions et le nombre de gènes présents dans ces régions, nous avons entrepris la réalisation d'un séquençage haut débit de l'exome pour le premier enfant atteint de cette famille (plateforme à haut débit SOLiD4™ (Life Technologies), projet financé par le genoscope/GIS-maladies rares) afin de sélectionner des gènes candidats.



Grâce à l'interface mise en place par la plateforme de bioinformatique (Polyweb, Université Paris Descartes, Institut *Imagine*), nous avons filtré les variations qui nous intéressaient dans le cas de notre première hypothèse, en retirant :

- les polymorphismes/variants présents dans les bases de données dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genomes, EVS,
- les variations identifiées dans d'autres exomes réalisés localement,
- les variations identifiées dans les régions non codantes à distance des sites d'épissages (les variations intergéniques, introniques, dans les pseudogènes ou les UTR),
- les variations neutres (synonymes),
- les variations hétérozygotes,
- les variations présentes en dehors des 3 régions cibles,
- les variations n'ayant pas une couverture suffisante (moins de 5 lectures).

Cette analyse retrouve 1 seule variation correspondant à ces critères (Figure 19) : mutation avec décalage du cadre de lecture dans l'exon 4 du gène *LRRTM4* c.1639delA, avec au niveau protéique la prédiction d'une séquence modifiée à partir de l'acide aminé 547 et l'apparition d'un codon stop prématuré en 585 (p.Thr547ProfsX39).

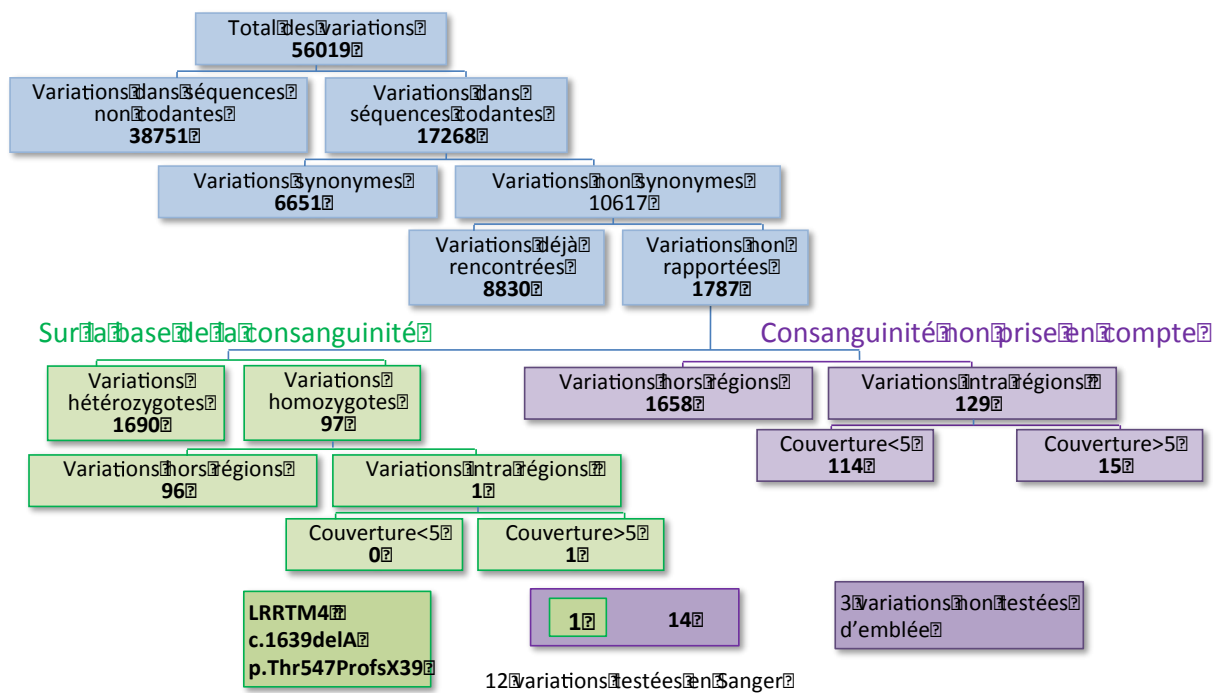


Figure 19 : Filtration des variations retrouvées par séquençage de l'exome chez le cas index. En vert sur la base de la consanguinité et en violet en ne tenant pas compte de la consanguinité.

La présence de cette variation homozygote a été vérifiée par séquençage direct chez le cas index. L'étude de la ségrégation familiale a confirmé sa présence à l'état homozygote également chez le fœtus atteint, et à l'état hétérozygote chez les parents et absente chez le frère sain.

Le gène *LRRTM4* appartient à une famille de 4 gènes, les *LRRTMs* (Leucine Rich Repeat TransMembrane neuronal), qui codent pour des protéines transmembranaires dont l'expression est prédominante dans le cerveau et qui jouent un rôle dans le développement et le maintien du SNC (89).

Le gène *LRRTM4* est localisé en 2p12. Un épissage alternatif conduit à l'expression de 2 transcrits et ainsi 2 isoformes protéiques : l'isoforme a (isoforme longue) de 590 acides aminés, et l'isoforme b (isoforme courte) de 518 acides aminés (figure 20). Parmi les autres protéines LRRTM, LRRTM3 possède également 2 isoformes protéiques, et les autres une seule.

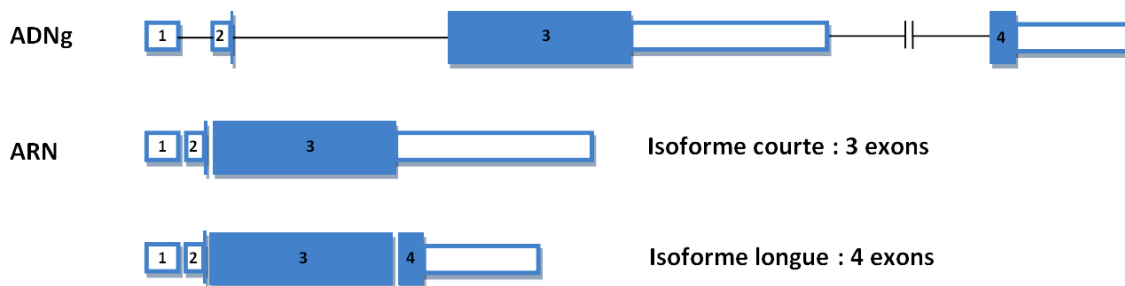


Figure 20 : L'épissage alternatif du gène LRRTM4.

Il conduit à deux transcrits : une isoforme courte (3 exons) et une isoforme longue (4 exons). Les exons sont représentés par des rectangles bleus (pleins pour les séquences codantes et vides pour les séquences non codantes).

J'ai ensuite sélectionné les variations sans tenir compte de la consanguinité. Les filtres appliqués sont les mêmes, à l'exception des régions cibles (19 régions haploidentiques) et j'ai gardé aussi bien les variations homozygotes qu'hétérozygotes.

Cette analyse retrouve 15 variations dont celle du gène *LRRTM4* (figure 19).

J'ai d'abord éliminé 3 variations situées dans des gènes dont la fonction ne semblait pas en relation avec le phénotype de WARBM, ces variations n'ont donc pas été vérifiées en séquençage direct. Ces variations sont toutes homozygotes :

- c.2166-6C>9 dans l'intron 18 de *HYOU1*,
- c.919C>T (p.Arg307Trp) dans l'exon 11 de *NUP107*,
- c.1342C>T (p.His593Asn) dans l'exon 14 de *PMFBP1*.

Nous avons éliminé ces variations selon différents critères : leur nature, la prédiction de leur effet délétère et la fonction du gène.

***HYOU1*** (Hypoxia Up-regulated 1, OMIM 601746) code pour une protéine du réticulum endoplasmique, inductible en cas d'hypoxie et qui a un effet cytoprotecteur rénal (90), neural (91) et cardiaque (92). Ce gène est dérégulé dans les cancers de la prostate(93), du sein (94) et de la vessie (95).

***NUP107*** (Nucleoporin 107kDa, OMIM 607617), joue un rôle dans l'assemblage des pores nucléaires (96)(97). Son rôle au cours du développement embryonnaire est inconnu chez les vertébrés (98), mais le phénotype d'un mutant poisson-zèbre (interruption du gène par insertion d'un transposon) a été décrit, il comprend la perte du squelette pharyngé,

l'absence d'intestin et de vessie et des yeux de petite taille (99). A l'exception du phénotype oculaire, les signes cliniques du WARBM sont très différents.

La fonction de **PMFBP1** (Polyamine Modulated Factor 1 Binding Protein 1). n'est pas connue ; il est dérégulé dans la polyarthrite rhumatoïde : son élévation dans les fibroblastes synoviaux de patients (non apparentés) entraîne l'augmentation du catabolisme et du recyclage des polyamines puis l'hypométhylation de l'ADN et enfin l'activation des fibroblastes (100).

De plus leur étude *in silico* ne permet pas d'avoir des arguments pour leur pathogénicité (HSF-[www.umd.be/HSF/](http://www.umd.be/HSF/), ESE Finder-<http://exon.cshl.edu/ESE/>, PolyPhen-[genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) et Sift-[sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)).

J'ai ensuite vérifié par séquençage direct la présence des 11 autres variations (tableau 3).

Chr	Position (Hg19)	Gène	Hmz/Htz	Mutation	EVS	Prédiction de l'effet délétère	Séquençage direct	Ségrégation familiale	Remarque
2	72,786,596	<b>EXOC6B/Sec15b</b> (Exocyst complex component 6B)	hmz couverture 14 (C 100%)	exon 8 c.901A>G, p.Ile301Val	non	Polyphen: possibly damaging (0,518) - SIFT: tolerated (0,38)	Variation confirmée, homozygote	cas index et fœtus interrompu en 2012 homozygotes, parents hétérozygotes, frère sain non muté, fœtus atteint interrompu en 2009 hétérozygote	
11	73,071,557	<b>ARHGEF17</b> (Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17)	hmz couverture 12 (A 92%, C 8%) 12 (A 92%, C 8%)	exon 11 c.4399G>A p.Asp1467Asn	non	Polyphen: possibly damaging (0,703) - SIFT: tolerated (0,25)	Variation confirmée, hétérozygote	cas index, père et fœtus atteint de 2009 hétérozygotes, mère, frère sain et fœtus de 2012 non porteurs de la variation	rien dans OMIM
2	58,386,484	<b>VRK2</b> (vaccinia related kinase 2)	htz couverture 58 (G 21%, T 36%, N 2%)	exon 15 c.1183G>T p.Glu395X	non		Variation confirmée	cas index, mère, frère sain et deux fœtus hétérozygotes, père non porteur de la variation	
2	29,448,415	<b>ALK</b> (Anaplastic Lymphoma Kinase)	hmz couverture 5 (T 100%)	exon 19 c.3084G>T, p.Glu1028Asp	non	Polyphen: benign (0,010) - SIFT: tolerated (0,10)	Variation non confirmée		
10	134,698,600	<b>TTC40</b> (tetratricopeptide repeat domain 40)	hmz couverture 11 (C 100%)	intron 27, c.3627+7A>G	pas de donnée	ESE-Finder: Création de 2 ESEs	Variation non confirmée		rien dans OMIM.
19	58,579,777	<b>ZNF135</b> (zinc finger protein 135)	hmz couverture 23 (A 30%, C 52%, T 4%, N13%)	exon 5 c.1997C>A p.Ala666Asp	non	Polyphen: possibly damaging (0,684) - SIFT: deleterious (0,03)	Variation non confirmée		rien dans Pubmed

13	76,414,575	<b>LMO7</b> (LIM domain only 7)	htz couverture 22 (G 59%, T 36%, N 5%)	exon 23 c.2680G>T p.Glu 894X	non		Variation non confirmée		
8	125,015,535	<b>FER1L6</b> (fer-1-like 6 (C. elegans))	htz compo couverture 95 (C 63%, T 22%, N 15%)	exon 13 c.1648C>T p.Pro550Ser	non	Polyphen: benign (0,001) - SIFT: tolerated (0,39)	Variation non confirmée		rien dans OMIM, Alamut
8	125,113,523	<b>FER1L6</b> (fer-1-like 6 (C. elegans))	htz compo couverture 30 (A 20%, C 80%)	exon 38 c.5069C>A p.Ala1690Asp	non	Polyphen: probably damaging (0,973) - SIFT: deleterious (0,02)	Variation non confirmée		rien dans OMIM, Alamut
11	78,387,400	<b>ODZ4/TENM4</b> (odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila))	htz compo couverture 36 (A 28%, C 64%, N 8%)	exon 30 c.5293G>T p.Asp1765Tyr	non	Polyphen: probably damaging (1,000) - SIFT: deleterious (0,02)	Variation non confirmée		rien dans OMIM, Alamut
11	78,443,419	<b>ODZ4/TENM4</b> (odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila))	htz compo couverture 26 (G 73%, T 27%)	exon 21 c.3080C>A p.Pro1027Gln	non	Polyphen: probably damaging (0,966) - SIFT: tolerated (0,15)	Variation non confirmée		

Tableau 3 : Description des variations trouvées par exome dans le cas où la consanguinité n'est pas prise en compte.

Sont indiqués le chromosome sur lequel elles sont localisées, leur position génomique en Hg19, le gène impliqué, les données de couverture de l'exome, leur présence dans EVS, la prédiction de leur effet délétère, et le résultat de la vérification en séquençage de Sanger (les variations confirmées sont surlignées en bleu) avec la ségrégation familiale pour les variations confirmées.

Seules 3 variations ont été confirmées en séquençage direct dans les gènes *VRK2*, *ARHGEF17* et *EXOC6B*, malgré une couverture moyenne de l'exome correcte (couverture moyenne de 73X). L'étude de la ségrégation familiale de ces 3 variations confirmées en séquençage direct a été réalisée. Pour *VRK2* et *ARHGEF17*, la ségrégation a été étudiée bien que le cas index soit hétérozygote dans l'hypothèse où une 2<sup>e</sup> mutation au locus n'ait pas été mise en évidence par le séquençage d'exome.

Le gène ***EXOC6B*** (OMIM 607880) est une sous unité de l'Exocyste au niveau cérébral. L'exocyste est impliqué dans l'arrimage des vésicules synaptiques et dans le cerveau une interaction entre l'exocyste et la syntaxine-1 a été observée suggérant un lien entre la machinerie d'arrimage et celle de la fusion (101). De plus, ce gène est impliqué dans deux translocations : t(2;7) impliquant *EXOC6B* et *TNS3* associée à un syndrome avec atteinte rénale, neutropénie, retard de croissance et développement (102), et t(2;8) impliquant *EXOC6B* associée à déficience intellectuelle, épilepsie, troubles autistiques, dysmorphie (103). La fonction du gène *EXOC6B* dans la transmission synaptique en faisait un candidat intéressant, mais la ségrégation n'est pas en faveur de l'implication du gène dans la famille, puisque le fœtus de 2009 est hétérozygote.

Le gène ***ARHGEF17*** (OMIM 612494) est un GEF spécifique des GTPases Rho avec une expression prédominante dans le cœur (104), il a été rapporté comme étant un gène suppresseur de tumeurs, impliqué dans les mélanomes (mutations non sens)(105). Etant donné que le fœtus de 2012 n'est pas porteur de la variation à l'état hétérozygote, le gène n'a pas été retenu comme candidat.

Le gène ***VRK2*** (OMIM 602169) dont la fonction est encore inconnue, a été associé à la prédisposition à la schizophrénie (par des études d'association génome entier)(106)(107). Une diminution de son expression a été rapportée dans les carcinomes (108). Il a été considéré comme un gène candidat dans le glaucome à angle ouvert, par analyse de liaison dans deux familles et sélection de gènes candidats par étude des interactions protéine-protéine (109). Un gène de la même famille, *VRK1* (OMIM 602168) est impliqué dans l'hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 1A (110). *VRK2* ne peut pas être exclu par l'analyse de la ségrégation familiale. J'ai donc vérifié l'absence d'un 2<sup>e</sup> événement à l'aide d'IGV (outil qui permet de visualiser les alignements des séquences sans qu'aucun filtre n'ait été appliqué et constaté que les exons 1 et 3 n'étaient pas couverts. Le séquençage complet des exons et des jonctions intron-exon a donc été réalisé chez le cas index, et a permis d'exclure

définitivement un deuxième événement dans la séquence codante ou aux jonctions introniques qui n'aurait pas été mis en évidence par l'exome.

Ainsi le meilleur candidat reste le gène ***LRRTM4***.

Lors de l'identification du gène *TBC1D20* comme 4<sup>e</sup> gène responsable de WARBM, l'absence de mutation dans ce gène a été vérifiée chez le cas index à partir des données de l'exome. De plus, *TBC1D20* localisé en 20p13, est situé en dehors des régions haplo-identiques identifiées par l'analyse de liaison réalisée dans la famille étudiée, le WARBM ne peut pas lui être imputé dans cette famille.

### **III. Séquençage direct de *LRRTM4***

Afin de valider l'implication du gène *LRRTM4* dans le WARBM, nous l'avons séquencé chez des patients atteints de WARBM pour lesquels aucune mutation n'avait été trouvée dans les 3 gènes connus au moment de l'étude, *RAB3GAP1*, *RAB3GAP2* et *RAB18*. Le séquençage direct de *LRRTM4* chez 68 patients n'a pas permis de retrouver d'autre mutation de *LRRTM4*.

Comme le WARBM est un syndrome rare et le nombre de patients restreint, nous avons décidé de séquencer *LRRTM4* chez des patients avec des caractères phénotypiques du spectre du WARBM: 126 patients ont ainsi été testés, mais aucune mutation n'a été identifiée.

### **IV. Expression de l'ARNm**

La mutation identifiée dans notre famille, localisée dans l'exon 4 (p.Thr547ProfsX39), n'affecte que l'isoforme longue de l'ARNm constituée de 4 exons alors que l'isoforme courte n'en possède que 3. C'est pourquoi nous avons voulu étudier l'expression de chacune de ces deux isoformes de manière spécifique d'abord chez des témoins, puis chez des membres atteints de la famille pour connaître l'effet de la mutation sur le transcrit de l'isoforme



longue. Nous avons donc choisi des amorces spécifiques de chaque isoforme et incluant la mutation identifiée pour les amorces de l'isoforme longue (figure 21).

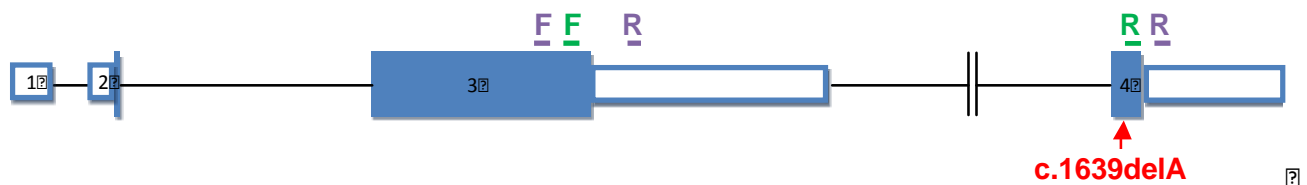


Figure 21 : Localisation des amorces de la RT PCR pour la détection des deux isoformes de *LRRTM4*.

Chaque couple est désigné par une couleur, l'amorce F violette est commune à deux couples d'amorces. La localisation de la mutation qui ségrège dans la famille étudiée est désignée par une flèche rouge.

Les ARNs ont été extraits dans un premier temps, à partir de sang d'un témoin adulte et de fibroblastes d'un fœtus témoin, interrompu à 24,5 SA pour autre syndrome polymaformatif. L'étude de l'expression dans ces cellules était intéressante du fait qu'elles sont facilement disponibles. Dans le cas où l'isoforme longue s'exprimerait dans ces cellules, son expression aurait pu être étudiée chez les membres de la famille à partir de culture de fibroblastes disponible pour un fœtus interrompu ou de prélèvements sanguins chez les parents non atteints. Malheureusement, le gène *LRRTM4* n'est pas exprimé dans les lymphocytes et seule l'isoforme courte est exprimée dans les fibroblastes (données non montrées).

Afin de choisir des tissus cibles à analyser, nous nous sommes intéressés alors au profil d'expression de *LRRTM4*.

Les gènes *LRRTMs* sont tous exprimés de manière prédominante dans les neurones du SNC avec des profils d'expression spécifiques dans les différentes régions du cerveau (ainsi que dans d'autres tissus). Leur expression est aussi régulée au cours du développement (89).

Ainsi ont été analysés le cortex cérébral fœtal issu d'un témoin de 18 SA interrompu pour anomalie chromosomique, la moelle épinière issue de, deux fœtus interrompus respectivement à 10,5 et 13,5 SA par IVG, ainsi que la moelle épinière du 2<sup>e</sup> fœtus de la famille.

La RT PCR montre que les deux isoformes de l'ARNm de *LRRTM4* sont exprimés chez les témoins dans le cortex cérébral et la moelle épinière au cours du développement (figure 22).

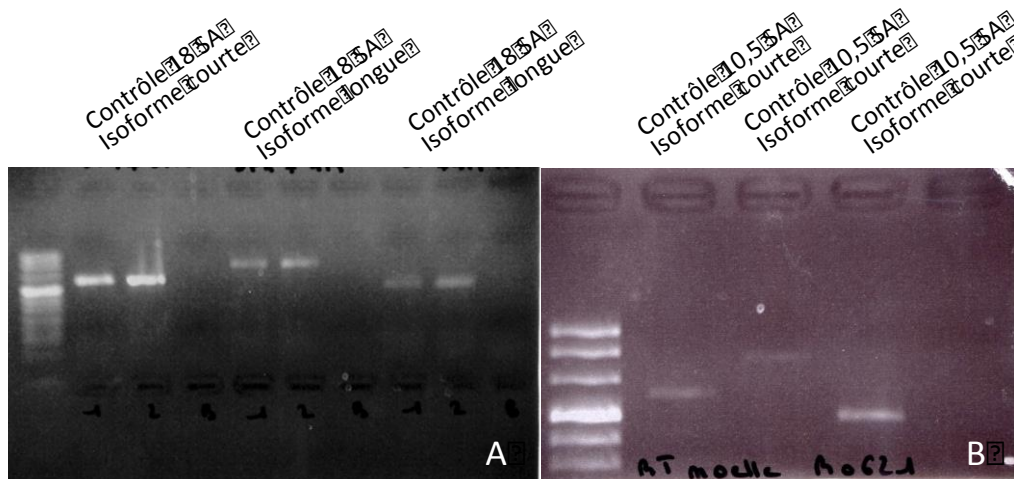


Figure 22 : Expression des isoformes longues et courte de *LRRTM4*. Expression dans le cortex (A) et dans la moelle (B) au cours du développement. L'isoforme longue a été étudiée avec deux couples d'amorces comme indiqué dans la figure 21.

L'expression de l'isoforme longue a été étudiée dans la moelle du fœtus de 2012, porteur de la mutation à l'état homozygote. L'isoforme longue de l'ARNm est présente dans la moelle de ce fœtus (figure 23). Tous les produits des RT-PCR ont été séquencés afin de vérifier qu'ils correspondaient bien aux isoformes longue et courte de l'ARNm de *LRRTM4*. La mutation c.1639delA a bien été retrouvée à l'état homozygote lors du séquençage de l'ADNc correspondant à l'isoforme longue de l'ARNm de *LRRTM4* chez le fœtus atteint. La mutation c.1639delA n'affecte donc pas l'expression de l'isoforme longue de l'ARNm de *LRRTM4*.

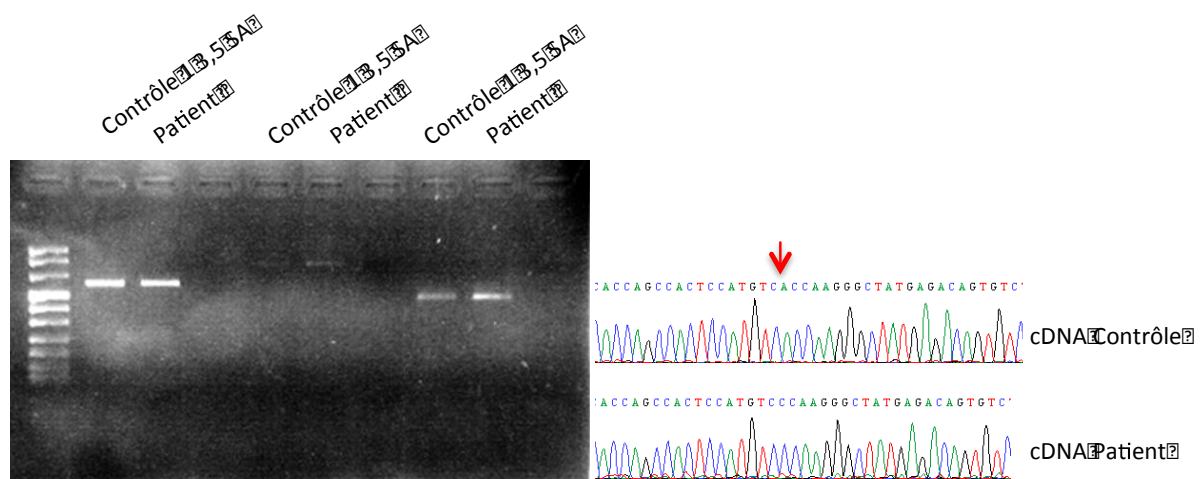


Figure 23 : Expression des isoformes courte et longue de l'ARNm de *LRRTM4* dans la moelle épinière chez le 2<sup>e</sup> fœtus interrompu à 14 SA de la famille étudiée (par rapport à un témoin de 13,5 SA).

La séquence de l'ADNc correspondant montre la présence de la mutation c.1639delA à l'état homozygote.

## V. Expression de la protéine

Le Western blot a été mis au point avec l'anticorps anti-LRRTM4 AF5377 de R&D (figure 24).

Nous avons pu montrer que les deux isoformes sauvages sont exprimées dans la moelle épinière dès 13 SA au cours du développement et que la protéine tronquée est présente chez le fœtus muté interrompu en 2012 avec un ratio isoforme longue/isoforme courte inchangé. En effet, les tailles des bandes obtenues correspondent à la taille attendue des deux isoformes courte et longue qui est respectivement de 59 et 67 kDa.

Par contre le gel n'est pas assez résolutif pour distinguer les isoformes longues sauvage et mutée en terme de taille car la protéine tronquée prédite ne possède que 6 AA en moins par rapport à la sauvage, ce qui est insuffisant en terme de poids moléculaire pour être visualisé en western blot.

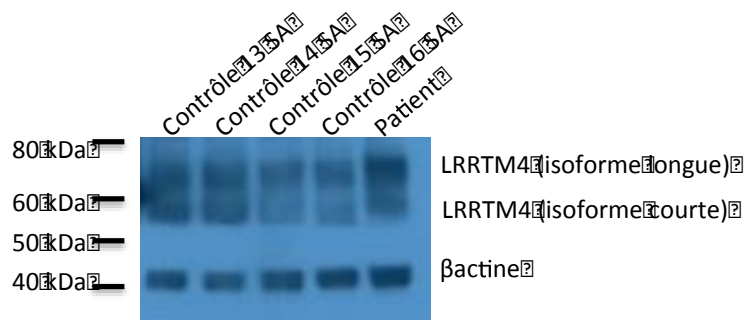


Figure 24 : Expression des isoformes courte et longue de la protéine LRRTM4 dans la moelle épinière.

Etude chez le 2<sup>e</sup> fœtus interrompu à 14 SA de la famille étudiée ainsi que chez 4 fœtus témoins agés de 13, 14, 15 et 16 SA. La βactine a été utilisée comme témoin.

## VI. Immuno-histochimie

Après avoir montré que l'isoforme longue mutée était exprimée, nous avons voulu étudier la localisation de LRRTM4 dans le cerveau au cours du développement chez l'homme. Afin de mettre au point la technique d'immuno-histochimie, plusieurs conditions ont été testées. En effet, 3 anticorps avec une immunogénicité différentes, deux mode de fixation : au formol et au PFA et deux procédés de démasquage : en tampon citrate et en tampon EDTA, ont été réalisés. De plus cette mise au point a été réalisée sur des régions du cerveau différentes. Dans un premier temps, l'étude au niveau du cortex, siège de la polymicrogyrie présente dans le WARBM, a été envisagée. Des coupes sagittales de cortex d'un fœtus témoin de 20 SA ont été choisies. Ensuite devant les difficultés rencontrées, l'étude au niveau du gyrus denté, formation où l'expression de *LRRTM4* est la plus élevée, a également été réalisée avec des coupes de l'hippocampe d'un fœtus témoin de 20 SA. Malgré les différentes conditions testées, aucun anticorps n'a permis de bien révéler LRRTM4. Il faudra désormais tester d'autres conditions de démasquage des anticorps, la fixation étant un paramètre peu variable. En effet, les tissus sont le plus souvent fixés dans le formol ou le PFA en anatomopathologie.

# Discussion

## I. Etude génétique

Dans une famille consanguine présentant un WARBM et excluant les 4 loci connus à ce jour, nous avons utilisé conjointement deux techniques d'exploration du génome entier : les puces SNPs et le séquençage d'exome. La puce SNPs nous a permis de réduire le champ d'exploration à des régions d'intérêt homozygotes ou haplo-identiques et ainsi de sélectionner une mutation tronquante à l'état homozygote dans l'exon 4 de *LRRTM4*, identifiée par séquençage d'exome chez le cas index de la famille. Cette stratégie nous a permis d'identifier un nouveau gène candidat dans le WARBM montrant ainsi la puissance du séquençage au débit, mais aussi ses limites avec les nombreuses variations qui n'ont pas été confirmées en séquençage de Sanger. Dans le futur, l'amélioration de la couverture et de l'efficacité de la capture permettra de mieux distinguer les vraies variations des artéfacts.

L'objectif de mon travail a été d'étudier l'effet délétère de la mutation identifiée dans notre famille. La mutation c.1936delA dans l'exon 4 de *LRRTM4* entraîne par décalage du cadre de lecture, une séquence tronquée à partir de la position 547, ainsi le domaine intracellulaire est manquant dans sa partie C-terminale. L'expression de l'ARNm de l'isoforme longue de *LRRTM4* n'est pas affectée par la mutation, suggérant qu'il n'est pas dégradé par le NMD, principal mécanisme de dégradation des ARNm avec un codon stop prématuré. Le NMD est capable de reconnaître un ARNm aberrant quand le codon stop est en amont du dernier exon (111). La mutation identifiée étant présente dans le dernier exon, l'ARNm ne peut pas être dégradé par le système NMD. De plus, l'isoforme longue de *LRRTM4* tronquée est également présente avec un ratio des deux isoformes apparemment inchangé.

Pour valider l'implication de *LRRTM4* dans le WARBM, j'ai recherché des mutations de ce gène chez des patients atteints de WARBM, pour lesquels aucune mutation dans les 3 gènes connus au moment de ce travail n'avait été retrouvée. Aucune mutation de *LRRTM4* n'a été mise en évidence chez les 68 patients atteints de WARBM. L'implication de ce gène

dans le WARBM pourrait être rare du fait que *LRRTM4* est un gène de petite taille, ainsi d'un point de vue statistique, la probabilité d'une mutation dans ce gène est plus faible. Si le phénotype résulte d'une mutation spécifique de l'isoforme longue, la probabilité de mutation dans l'exon 4 est encore plus faible. A ce jour, seules 144 familles WARBM ont été rapportées (18). Dans le spectre WARBM/Martsof, *RAB3GAP1*, le gène le plus fréquent, est impliqué dans 41% des familles, *RAB3GAP2* dans 7%, *RAB18* dans 5% et *TBC1D20* dans 5% également. La chronologie d'identification de ces gènes suit la fréquence de leur implication, ainsi une implication rare de *LRRTM4* est plausible.

## II. Les protéines LRRTM

Malgré l'absence de mutation identifiée chez un autre patient, *LRRTM4* reste un excellent candidat dans le WARBM par son expression et sa fonction. En effet, le gène *LRRTM4* appartient à une famille de 4 gènes très conservés, les *LRRTMs* (Leucine rich repeat transmembrane neuronal), qui codent pour des protéines transmembranaires. Les protéines LRRTMs possèdent une structure commune constituée d'un domaine extracellulaire lui-même constitué de dix domaines LRR, dont la fonction est d'interagir avec des protéines présynaptiques et qui sont entourés de domaines riches en cystéine ; un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire. Ce domaine contient des sites de phosphorylation, qui pourraient être impliqués dans la transduction du signal ainsi que des sites de glycosylation. Ce dernier domaine est très conservé dans sa partie C-terminal avec une séquence consensus ECEV, commune à tous les LRRTMs, qui ressemble à la séquence consensus de liaison des protéines à domaine PDZ de classe I comme PSD-95 ou d'autres protéines de soutien des synapses glutamatergiques (112)(113)(figure 25). La séquence ECEV de l'isoforme longue de *LRRTM4*, par l'ajout de l'exon 4, est modifiée en ECEM et se retrouve située au milieu du domaine intracellulaire. Ceci suggère l'existence de partenaires intracellulaires spécifiques de l'isoforme longue de *LRRTM4*. Ainsi, la protéine tronquée des 43 derniers acides aminés de l'isoforme longue prédite par la mutation n'affecte pas la séquence ECEM, mais pourrait supprimer un autre site d'interaction protéique. Une analyse par double-hybride avec ces 43 acides aminés comme appât a été réalisée (cf paragraphe suivant).

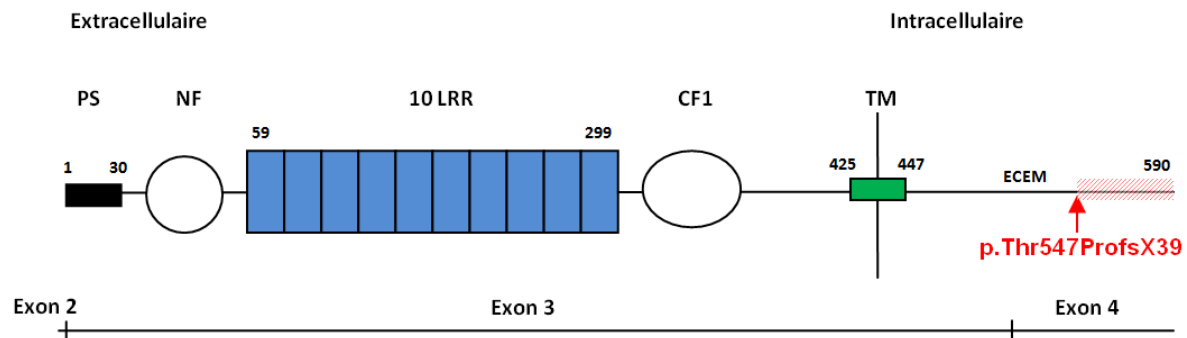


Figure 25 : Domaines de l'isoforme longue de la protéine LRRTM4.

Un domaine extracellulaire constitué d'un peptide signal PS, 10 domaines LRR entourés de 2 domaines riches en cystéine NF et CF1, un domaine transmembranaire TM et un domaine intracellulaire. Les positions des principaux domaines et de la mutation sont indiquées. Les exons codant les différents domaines sont indiqués en dessous.

De plus, les gènes *LRRTM* sont tous exprimés de manière prédominante dans les neurones du SNC avec des profils d'expression spécifiques dans les différentes régions du cerveau. Leur expression est aussi régulée au cours du développement. En effet, l'ARN de *LRRTM4* est exprimé, chez l'homme, de manière prédominante dans le SNC, y compris la moelle épinière et le cervelet, au cours du développement et à l'âge adulte, mais aussi dans d'autres tissus. Et tous les ARNs des *LRRTMs* ont été détectés dans l'amygdale, le noyau caudé, le cervelet, le corps calleux, l'hippocampe et le thalamus (qui sont les 6 régions analysées dans le travail de Lauren et al., (89), figure 26).

L'expression au cours du développement chez la souris a été étudiée par hybridation *in situ*. Tous les *LRRTMs* sont exprimés dans le tube neural avec également un profil d'expression spécifique dans les différentes régions du tube neural. L'expression de *LRRTM4* apparaît à partir du 8e JPC dans le mésoderme caudal, puis s'étend dans le tube neural, le mésenchyme des membres et dans 3 vésicules cérébrales (notamment dans le mésencéphale) (114).

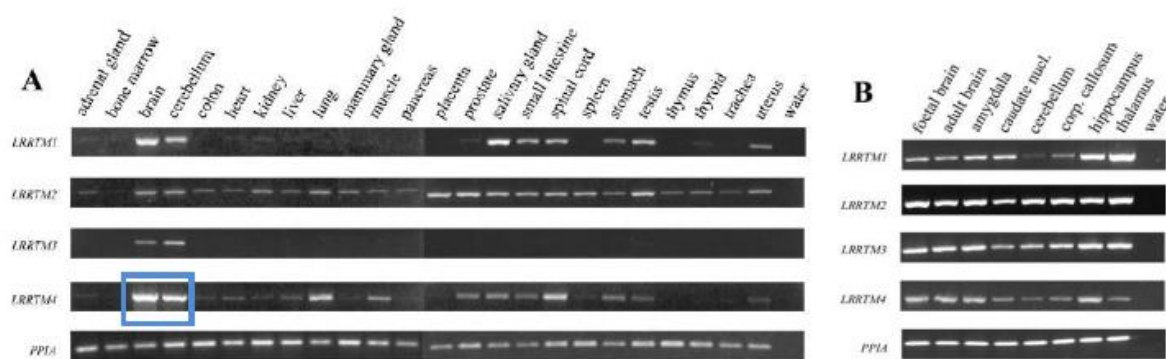


Figure 26 : Analyse semi quantitative de l'expression des ARNs des gènes *LRRTMs* par RT PCR d'après Lauren et al. (89).

Dans différents tissus humains (A) et plus particulièrement dans le cerveau (B). Le gène *PPIA* (peptidylprolyl isomerase A) est utilisé comme témoin.

Ainsi la structure et le profil d'expression ont conduit à l'hypothèse d'un rôle des *LRRTM* dans le développement et le maintien du SNC.

### III. Fonction des *LRRTM* / voie de signalisation

Récemment, la fonction des *LRRTMs* a été élucidée. Ce sont des protéines d'adhésion synaptiques qui en coopération avec les neurexines et les neuroligines jouent un rôle dans la différenciation des synapses excitatrices glutamatergiques. Les *LRRTMs*, localisés au niveau de la membrane postsynaptique, sont avec les neuroligines, des ligands des neurexines (108). *LRRTM1* et *LRRTM2* ont été les plus étudiées : elles induisent par leur interaction trans-synaptique avec les neurexines une différenciation aussi bien présynaptique que postsynaptique. Cette différenciation se traduit par le développement de synapses fonctionnelles et le recrutement de différents composants synaptiques dont les récepteurs AMPA (116)(117) (figure 27). *LRRTM1* et *LRRTM2* jouent également un rôle dans la LTP grâce au maintien des récepteurs AMPA au niveau des synapses de la région CA1 de l'hippocampe après la phase d'induction de la LTP (118). Cette fonction dans la plasticité synaptique rappelle celle de *Rab3A* dans la LTP dans la région CA3 de l'hippocampe.



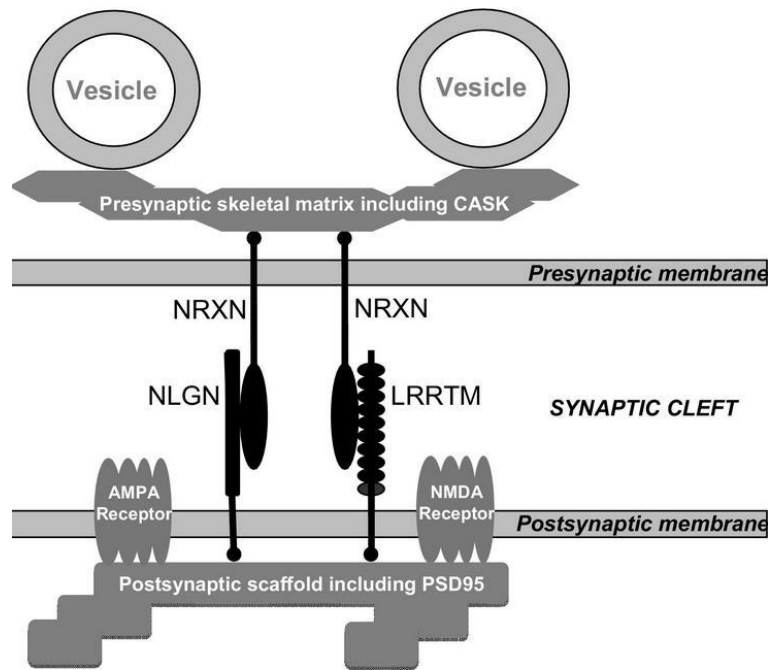


Figure 27 : Représentation des neurexines (NRXN), neuroligines (NLGN) et des LRRTM interagissant au niveau de la synapse glutamatergique d'après Francks (119).

LRRTM4 possède également une activité synaptogénique présynaptique (112) et appartient aux complexes macromoléculaires formés autour des récepteurs AMPA (120). Récemment, Siddiqui et al., ont confirmé le rôle de LRRTM4 dans le développement synaptique et ont montré par un modèle murin KO *lrrtm4*<sup>-/-</sup>, que ce gène est essentiel au développement et à la fonction des synapses excitatrices glutamatergiques (121). Cette fonction est due à l'interaction trans-synaptique de LRRTM4 avec des protéoglycane à héparane sulfate (HSPGs), contrairement à LRRTM1 et LRRTM2 qui se lient aux neurexines (121)(122).

Au sein des HSPGs, les syndecans au nombre de 4 (SDC1-4) sont transmembranaires et les glypicans au nombre de 6 (GPC1-6) sont ancrés dans la membrane via un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ils possèdent 2 ou 3 chaînes héparane sulfate (HS) qui leur permettent de se lier à des morphogènes (Wnts, SHHs, BMPs), des facteurs de croissance (FGFs) et à des molécules de guidance axonale (Slit1 et Slit2, Semaphorine 5A, Ephrine A3) et régulent ainsi de nombreuses voies de signalisation. Les HS sont très exprimés dans le SNC et ont un rôle essentiel dans le développement cérébral chez les mammifères et notamment dans la croissance des axones commissuraux et dans la neurogénèse corticale. L'inactivation du gène *Ext1*, qui code pour une protéine impliquée dans la biosynthèse des HS, dans les progéniteurs neuronaux chez la souris provoque une microcéphalie associée à

une atteinte de la neurogénèse corticale, une absence des différentes commissures interhémisphériques dont le corps calleux et le chiasma optique (123)(124). L'inactivation de *Ext1* dans le mésenchyme périoculaire altère la morphogénèse oculaire et induit une microphthalmie (125). Une microcéphalie et une atteinte de la neurogénèse corticale ont également été rapportées chez la souris *Gpc1*<sup>-/-</sup> (126). Ces modèles murins suggèrent que la microcéphalie, l'agénésie du corps calleux et la microphthalmie observées dans le WARBM pourraient être dues à une atteinte de la voie de signalisation des HSPGs.

L'identification des HSPGs comme partenaires présynaptiques de LRRTM4 pourrait ainsi nous aider à comprendre les mécanismes physiopathologiques reliant des mutations de *LRRTM4* au phénotype du WARBM. Deux hypothèses non exclusives l'une de l'autre sont actuellement envisagées. La première est une altération de la voie de signalisation des HSPGs, hypothèse étayée par la diminution des HSPGs dans le gyrus denté des souris KO *Irrtm4*<sup>-/-</sup>. L'autre hypothèse est une interruption de la voie de signalisation intracellulaire de *LRRTM4*; un double hybride (Hybrigenics) a ainsi été réalisé en utilisant comme appât le domaine intracellulaire de l'isoforme longue de LRRTM4 afin d'identifier les partenaires intracellulaires post-synaptiques de LRRTM4. Cette étude a permis d'identifier 2 partenaires potentiels de LRRTM4, NeuroD2 et USP7, qui doivent être désormais validés.

*NeuroD2*, facteur de transcription neuronal semble un partenaire particulièrement intéressant. En effet, l'étude des souris KO *neurod2*<sup>-/-</sup> a montré que les régions du cerveau exprimant *NeuroD2* étaient de plus petite taille et les fissures du cervelet moins profondes par comparaison aux souris WT (127). Ces souris présentent aussi une agénésie du corps calleux (128). Cette étude a également permis de montrer que NeuroD2 régule la maturation postsynaptique des synapses glutamatergiques thalamocorticales et hippocampiques en augmentant la proportion des récepteurs AMPA membranaires (128)(129). De plus, la surexpression de *NeuroD2* dans des cellules de neuroblastome suggère sa capacité à induire une maturation présynaptique, en augmentant l'expression de SNAP25 et de la synaptotagmine, deux protéines présynaptiques impliquées dans l'exocytose (130). Plus récemment Bormuth et al., ont élucidé le rôle de *NeuroD2* dans le développement du corps calleux par étude de souris double KO *neurod2/neurod6*. Ils ont montré que ces deux facteurs de transcription étaient indispensables à la formation des projections axonales et à l'expression de la contactine 2, molécule d'adhésion nécessaire pour la fasciculation axonale (131).

USP7 est une débiquitinase impliquée dans la régulation de la voie p53 dans le SNC. En effet, les souris KO conditionnelles avec inactivation spécifique de *USP7* dans le cerveau, sont caractérisées notamment par un cerveau hypoplasique résultant de l'apoptose induite par p53, liée à une accumulation de p53 (132). USP7 pourrait jouer un rôle au cours du développement du SNC en régulant l'apoptose des neurones.

Les neurexines et neuroligines ont été impliquées dans des atteintes du SNC ou des troubles psychiatriques. Les neuroligines sont impliquées dans l'autisme et des mutations hétérozygotes des *NLGN3* et *NLGN4* ont été identifiées chez des jumeaux dans 2 familles distinctes (133)). Des mutations hétérozygotes tronquantes des *NRXN1* et *NRXN2* ont été trouvées respectivement chez une femme atteinte de schizophrénie et un homme avec des troubles autistiques (134)). De plus, des mutations de *NRXN1* ont été rapportées dans le syndrome de Pitt-Hopkins-like, qui associe un retard mental sévère, une épilepsie, une microcéphalie, une atteinte respiratoire et une dysmorphie faciale (135). A ce jour, des études d'association ont aussi permis de lier *LRRTM3* à l'autisme (136) et *LRRTM1*, soumis à empreinte maternelle, à la schizophrénie et la latéralisation (137)(138). De plus, un modèle de souris KO *lrrtm1*<sup>-/-</sup> conforte l'hypothèse d'un rôle de *LRRTM1* dans ce trouble psychiatrique (139). Enfin *LRRTM4* pourrait être lié à l'autisme (140)(141). L'étude de la voie de signalisation de *LRRTM4* pourrait permettre également une meilleure compréhension de la physiopathologie de certains troubles psychiatriques. Ainsi, la grande famille des protéines d'adhésion synaptique semble jouer un rôle majeur dans un spectre d'anomalies allant de troubles psychiatriques à des anomalies du SNC, et font des *LRRTM* d'excellents gènes candidats pour des pathologies neurologiques ou psychiatriques.

## Conclusions et perspectives

Le WARBM est un syndrome très rare, pour lequel les gènes connus à ce jour expliquent 60% des cas environ. L'utilisation de nouvelles techniques d'exploration globale du génome a permis d'identifier une mutation homozygote avec décalage du cadre de lecture dans le gène *LRRTM4*, au sein d'une famille consanguine.

Cependant, une seule mutation a été identifiée : nous envisageons d'étudier l'effet de l'inactivation par morpholino de *Lrrtm4* chez le poisson zèbre et le sauvetage du phénotype par l'injection d'ARNm humain porteur de la mutation identifiée afin de confirmer la pathogénicité de la mutation identifiée.

Comme la protéine tronquée est exprimée, la technique d'immuno-histochimie sur coupes de cortex et d'hippocampe foetaux en cours de mise au point, permettra également de définir le patron d'expression de *LRRTM4* chez l'homme. L'étude de la localisation subcellulaire de la protéine est envisagée à l'aide d'une construction sauvage et mutante taggée par un marqueur fluorescent. En cas de localisation anormale, cette étude permettrait de déterminer si la localisation anormale de la protéine tronquée abolit l'interaction de *LRRTM4* avec les HSPGs.

La souris *Lrrtm4*<sup>-/-</sup> est viable, fertile et ne semble pas présenter d'anomalie morphologique cérébrale (121). Grâce à une collaboration avec le Dr Anne Marie Craig (Université de British Columbia), une étude approfondie du phénotype neurologique de ces souris serait intéressante, notamment à l'échelle histologique (plaque corticale) et permettra peut être de découvrir des anomalies plus subtiles en rapport avec celles observées chez les patients WARBM. Une étude sur le plan fonctionnel en terme de transmission synaptique est aussi envisagée. De manière intéressante et comparable, les souris KO *Rab3gap1*<sup>-/-</sup> présentent une libération diminuée des vésicules synaptiques glutamatergiques et une plasticité synaptique altérée dans l'hippocampe, mais ces souris sont viables, fertiles, sans anomalies cérébrale, oculaire et génitale (Sakane et al., 2006).

Enfin, les résultats du double hybride ont permis d'identifier deux partenaires potentiels de *LRRTM4* : NeuroD2 et USP7, qui deviennent eux mêmes des gènes candidats pour le WARBM.

Cette année de recherche nous a permis d'identifier un gène candidat dans le WARBM et ouvre des perspectives plus larges afin de comprendre l'implication de cette mutation dans la maladie. La caractérisation fonctionnelle de *LRRTM4* dans le WARBM, permettra une meilleure compréhension des mécanismes et voies de signalisation impliquées dans le développement du système nerveux central normal et la physiopathologie de la polymicrogyrie.

## CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Anne LEGRAND

Le syndrome Micro-Warburg (WARBM, OMIM 600118) est un syndrome polymalformatif autosomique récessif sévère, souvent létal, qui associe des anomalies oculaires (microcornée, cataracte congénitale, atrophie optique), un retard mental avec anomalies du SNC (microcéphalie, hypoplasie ou agénésie du corps calleux, pachygyrie ou micropolygyrie) et un hypogonadisme hypothalamique. Ce syndrome est cliniquement proche d'une autre entité, le syndrome de Martsolf (OMIM 212720) caractérisé par un retard mental, une cataracte, et un hypogonadisme central. Le phénotype neurologique est plus sévère dans le WARBM, incluant une hypoplasie ou agénésie du corps calleux, une pachygyrie/polymicrogyrie moins sévère ou absente dans le syndrome de Martsolf.

Le chevauchement clinique entre ces 2 syndromes est reflété par l'implication du complexe protéique RAB3GAP dans leur étiologie. Ce complexe hétérodimérique est constitué de la sous-unité catalytique p130, codée par le gène *RAB3GAP1*, et de la sous-unité non catalytique p150, codée par le gène *RAB3GAP2*. Des mutations de ces gènes ont été identifiées chez des patients atteints de WARBM ou de syndrome de Martsolf. L'étude de corrélation génotype-phénotype établit clairement que ces deux syndromes appartiennent à un continuum phénotypique en relation avec la nature et la sévérité de la mutation. De plus des mutations de *RAB18* et *TBC1D20* ont été rapportées chez des patients WARBM. L'étude de l'ensemble des variants identifiés révèle une implication de *RAB3GAP1* dans 41% des cas, *RAB3GAP2* dans 7% des cas, *RAB18* dans 5% des cas et *TBC1D20* dans 5%. Ainsi ces syndromes sont caractérisés par une hétérogénéité génétique avec plus de 40% de patients sans mutation dans les 4 gènes connus, supposant la découverte de nouveaux gènes.

Nous avons étudié une famille consanguine d'origine algérienne dans laquelle trois enfants étaient atteints de WARBM et un enfant non atteint. Une étude de liaison génome entier dans la famille a mis en évidence trois régions d'homozygotie respectivement sur les chromosomes 2 (38 Mb), 18 (7,7 Mb) et 19 (4,1 Mb), sur la base de la consanguinité ; et a permis d'exclure les 4 gènes connus. Un séquençage d'exome a été également réalisé chez le cas index. L'application de filtres successifs a permis de retenir une seule variation homozygote dans les 3 régions d'homozygotie parmi les 56019 variations identifiées. Cette variation est une mutation avec décalage du cadre de lecture dans le gène *LRRTM4*.

*LRRTM4* appartient à une famille de 4 gènes, les *LRRTMs* (Leucine Rich Repeat TransMembrane neuronal), qui codent pour des protéines transmembranaires impliquées dans la différenciation présynaptique des synapses excitatrices. Ce gène possède 4 exons, l'exon 1 est non-codant et l'exon 4 est soumis à épissage alternatif, conduisant à 2 isoformes protéiques, une courte de 518 aa et une longue de 590 aa. La mutation identifiée, située dans l'exon 4 conduit à une protéine tronquée à partir de l'aa 547 avec un codon stop prématuré (p.Thr547ProfsX39). La vérification en séquençage de Sanger ainsi que l'analyse de ségrégation familiale ont conforté *LRRTM4* comme seul gène candidat pertinent.

Afin d'explorer l'effet de cette mutation, l'expression de l'ARNm de *LRRTM4* a été étudiée dans la moelle épinière d'un des patient atteint de notre famille (foetus de 14 SA) ainsi que chez un témoin au même stade de développement. Nous avons montré que les 2 isoformes étaient transcrites chez le patient, ce qui suggère l'absence de dégradation de l'ARNm par le NMD (Nonsense mediated decay). De plus, nous avons montré que les deux protéines étaient exprimées dans la moelle épinière dès 13 SA et que l'isoforme longue tronquée était détectable par western blot dans la moelle épinière chez le foetus avec un ratio des deux isoformes apparemment inchangé. Ceci suggère que l'effet délétère de la mutation est secondaire à l'absence de la partie C-Terminale intracellulaire de l'isoforme longue. L'étude de l'effet de l'inactivation par morpholino de *Lrrtm4* chez le poisson zèbre et le sauvetage du phénotype par l'injection d'ARNm humain porteur de la mutation identifiée devrait permettre de confirmer la pathogénicité de la mutation identifiée.

Afin de valider *LRRTM4* comme un nouveau gène impliqué dans le WARBM, le séquençage du gène *LRRTM4* a été entrepris chez 68 patients atteints de WARBM issus de 2 cohortes internationales, puis chez 126 patients présentant une anomalie de la plaque corticale, dont font partie la polymicrogyrie et la pachygyrie présentes dans le WARBM, mais aucune mutation n'a été mise en évidence chez un autre patient.

Récemment il a été montré que *LRRTM4* interagissait des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs) et que cette interaction trans-synaptique jouait un rôle dans le développement des synapses excitatrices. Ainsi des mutations de *LRRTM4* pourraient induire une altération de la voie de signalisation des HSPGs. Deux hypothèses sont ainsi actuellement envisagées concernant les mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer que le WARBM soit associé à des mutations de *LRRTM4*, hypothèses, non exclusives l'une de l'autre :

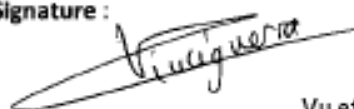
- 1/ Une altération de la voie de signalisation des HSPGs
- 2/ Une interruption de la voie de signalisation intracellulaire de *LRRTM4*; un double hybride a ainsi été réalisé en utilisant comme appât le domaine intracellulaire de l'isoforme longue de *LRRTM4* afin d'identifier les partenaires intracellulaires post-synaptiques de *LRRTM4*.

L'identification des mécanismes et de la voie de signalisation impliquées dans le WARBM à travers *LRRTM4* devraient permettre de mieux comprendre les bases physiopathologiques des anomalies du développement cortical chez l'homme.

Le Président de la thèse,

Nom : Vinciguerra Christine

Signature :

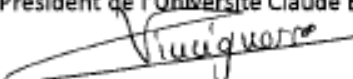


Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 10-7-14

Vu, le directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon I,



Professeur Christine VINCIGUERRA

## Annexes

### Annexe 1 : Amorces utilisées pour le séquençage direct et conditions de PCR

Gène	Amplicon	Amorce Forward	Amorce Reverse	Conditions
<i>LRRTM4</i>	Exon 2	CCAACGGCTTCCTTTTCC TCTCGGGGAAGTTTGTATTGG	AAACTCAAAGGCTGCTGCTC	Taq Roche Touch down 69-55°C
	Exon 3-1	CCTAAGCAGCAAACATGCAA	AGGTCCAGATTGCGGAGATT	
	Exon 3-2	TCAAGGGATCCGTAGACTGAA	GGCTCAATTCCTTGGATGTC	
	Exon 3-3	CTTCAACCTCCGCTCAATTT	GACGTCAGGTTTGAAGATGG	
	Exon 3-4	AGCACATCCAGGGTGAAAAG	CACCTCTAGGGCTTCAAACA	
	Exon 4	CAAAAATACAACCTGATGAGTGC	GATTGCGCGATTGTGGAC	

Gène	Amplicon	Amorce Forward	Amorce Reverse	Conditions
<i>ALK</i>	Exon 19	TGTCTCAGTGGGGGAGGTTA	AGTGACACCTTGGCACCTGT	Taq Roche Touch down 64-50°C
<i>EXOC6B</i>	Exon 8	TGGCCTTTATAAAAAGAACCAAA	TCCTTAAACAACAAGAGTTTTCTCA	
<i>TTC40</i>	Exon 27	TTAAGCTGGAGGTGGAGGAA	GAAAGGGACCACTGAAACCA	
<i>ARHGEF17</i>	Exon 11	TGTCTAAGGAGAGAGGCAGGTC	CTGGCTCCTGAAGTCACAGA	Taq Roche Touch down 69-55°C
<i>ZNF135</i>	Exon 5	TGCAATGAGTGTGGAAATC	GTCTGAGGGGAGTGCTGTGT	
<i>VRK2</i>	Exon 15	CACGCAAAAACTTGATCTTGTA	AGGCCAAAGTCCAGTTGAA	Taq Roche Touch down 64-50°C
<i>LMO7</i>	Exon 23	AATAATTTATGTGTGCAAAAGTGG	TGAGATTGTTGCGTTTAAATTAG	
<i>FER1L6</i>	Exon 13	TTGCTGTGGGAGAACATGAG	TCCTAGAAACTGGACAAAATTCC	
<i>FER1L6</i>	Exon 38	TGCTCTGTGACCACATTGAAA	TGTTTCCAGGTTTTTGCTATCAT	
<i>ODZ4</i>	Exon 21	AATGCTGAGACCCTTTGGTG	CTGACCCAAGCCCTACAGAG	
<i>ODZ4</i>	Exon 30	CATCCTTTAAAGTCCCCTCCA	CCCAGGGAATTTCAAGAACA	



Gène	Amplicon	Amorce Forward	Amorce Reverse	Conditions
VRK2	Exon 2	TTGAAGACATTTTGGGAAGTG	TGATGTCTTGAACCTAGACACTG	Taq Roche Touch down 64-50°C
	Exon 3	TCAGGCAGATTTGAGTTTCTG	CCAGGGTAATAGCTGGCAATA	
	Exon 4	TGGAAATCTGGTGCCTATGTT	CCATCTGTCTTGCTTTTATATGTTG	
	Exon 5	TGGTAACAGTTTGAGGCCATT	AAGCCACTTGCAGTCTCCTC	
	Exon 6	CAGTGTGAATGGTTCAGTACAGC	TGAGTTTGCAGTGCCATACA	
	Exon 7	AGGATGAGCAACCAGAAGATG	TTCATCATGTTACGCCCTCA	
	Exon 8	AGTTGTTATGGCCCCAGTT	GCAAAGGTCATTTTCATGCAG	
	Exon 9	TGCTTGGGCGTTTAAGTTTT	GTTGGGTGAATGCCAATCTT	
	Exon 10	TTTTGGTGACCTACCAACACAT	CCTGATGGGAATAGGAGCAA	
	Exon 11	TTTGTCTCATCAATTCTGTAGGTCA	TTTCTTGGTGCTGAGTTAGGC	
	Exon 12	TGGTTTTGTCCATTGATGA	CATACAACCTTGGCCCTCAG	
	Exon 13-1	CCAGATTTGCTTGTTGGATG	AGGCCAAAGTCCAGTTGAA	
	Exon 13-2	ACACAATTCCTAACTCATTTTA	CTTCAGAAGTGTTTTCCAACTG	

**Annexe 2: Mix pour la PCR, la purification de PCR, la réaction de séquence et la purification de séquence**

PCR

Réactifs	Volume en $\mu\text{L}$	Concentration
Tampon+MgCl <sub>2</sub>	1,25	10X
dNTP	1,25	2 mM
Amorces F+R	1	10 $\mu\text{M}$
Taq polymérase	0,1	1 U/ $\mu\text{l}$
eau	8	
ADN	1	20 ng/ $\mu\text{l}$
total	12,5	

Programme du thermocycleur 35 cycles								
x1	15 cycles			20 cycles			x1	x1
98°C	98°C	69-55°C/64-50°C	72°C	98°C	55 ou 50°C	72°C	72°C	4°C
8 min	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	7 min	$\infty$

Les 15 premiers cycles, la température d'hybridation diminue de 1°C par cycle.

Purification des produits de PCR

Réactifs	Volume en $\mu\text{L}$
Produit de PCR	6
Exo-SAP	2

Programme du Thermocycleur	
37°C	80°C
15 minutes	15 minutes

### Réaction de séquence

Réactifs	Volume en $\mu\text{L}$
Produit de PCR purifié	4
Bigdye	1
Tampon	1
Amorce F ou R (10 $\mu\text{M}$ )	0,15 ou 0,5*
eau	4

\*Lorsqu'un mix est préparé avec les amorces, le volume d'amorce est de 0,15  $\mu\text{L}$  par réaction de séquence. Sinon le volume minimal par réaction est de 0,5  $\mu\text{L}$ .

Programme du Thermocycleur				
x1	30 cycles			x1
94°C	94°C	60°C	60°C	4°C
5	15 s	5 s	4	$\infty$

### Purification de séquence

Réactifs	Volume en $\mu\text{L}$
Séquence	10
Xterminator	45
Tampon	10

Agitation pendant 20 minutes puis centrifugation pendant 3 minutes.

## Protocol: Purification of Total RNA from Animal Tissues

This protocol requires the RNeasy Mini Kit or RNeasy Protect Mini Kit.

### Determining the correct amount of starting material

It is essential to use the correct amount of starting material in order to obtain optimal RNA yield and purity. A maximum amount of 30 mg fresh or frozen tissue or 15–20 mg RNA<sub>later</sub> stabilized tissue (which is partially dehydrated) can generally be processed. For most tissues, the RNA binding capacity of the RNeasy spin column and the lysing capacity of Buffer RLT will not be exceeded by these amounts. Average RNA yields from various tissues are given in Table 2 (page 19).

Some tissues, such as spleen, parts of brain, lung, and thymus are more difficult to lyse or tend to form precipitates during RNA purification. The volume of Buffer RLT may need to be increased to facilitate complete homogenization and to avoid significantly reduced RNA yields, DNA contamination, or clogging of the RNeasy spin column. See the procedure below for details.

RNA yields from fibrous tissues, such as skeletal muscle, heart, and skin, may be low due to the abundance of contractile proteins, connective tissue, and collagen. For maximum RNA yields from these tissues, we recommend using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit instead. See page 76 for ordering information.

Greater RNA yields from fatty tissues, such as brain and adipose tissue, can be achieved using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, which uses QIAzol Lysis Reagent for optimal tissue lysis. See page 76 for ordering information.

If there is no information about the nature of your starting material, we recommend starting with no more than 10 mg tissue. Depending on RNA yield and purity, it may be possible to use up to 30 mg tissue in subsequent preparations.

**Do not overload the RNeasy spin column, as this will significantly reduce RNA yield and quality.**

Weighing tissue is the most accurate way to quantitate the amount of starting material. As a guide, a 3 mm cube (27 mm<sup>3</sup>) of most animal tissues weighs 30–35 mg.

### Important points before starting

- If using the RNeasy Kit for the first time, read "Important Notes" (page 18).
- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 63).
- **For optimal results, stabilize harvested tissues immediately in RNA<sub>later</sub> RNA Stabilization Reagent (see protocol on page 36).** Tissues can be stored in the reagent for up to 1 day at 37°C, 7 days at 15–25°C, or 4 weeks at 2–8°C, or archived at –20°C or –80°C.

- Fresh, frozen, or RNA*later* stabilized tissues can be used. Tissues can be stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for several months. Flash-freeze tissues in liquid nitrogen, and immediately transfer to  $-70^{\circ}\text{C}$ . Do not allow tissues to thaw during weighing or handling prior to disruption in Buffer RLT. Homogenized tissue lysates from step 4 can also be stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for several months. Incubate frozen lysates at  $37^{\circ}\text{C}$  in a water bath until completely thawed and salts are dissolved before continuing with step 5. Avoid prolonged incubation, which may compromise RNA integrity.
- If desired, more than 30 mg tissue can be disrupted and homogenized at the start of the procedure (increase the volume of Buffer RLT proportionately). Use a portion of the homogenate corresponding to no more than 30 mg tissue for RNA purification, and store the rest at  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature ( $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ).
- Buffer RLT and Buffer RW1 contain a guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 8 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at  $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$  in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below  $20^{\circ}\text{C}$ .

#### Things to do before starting

- $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) must be added to Buffer RLT before use. Add 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -ME per 1 ml Buffer RLT. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. Buffer RLT containing  $\beta$ -ME can be stored at room temperature for up to 1 month.  
  
Alternatively, add 20  $\mu\text{l}$  of 2 M dithiothreitol (DTT) per 1 ml Buffer RLT. The stock solution of 2 M DTT in water should be prepared fresh or frozen in single-use aliquots. Buffer RLT containing DTT can be stored at room temperature for up to 1 month.
- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 69).

## Procedure

1. Excise the tissue sample from the animal or remove it from storage. Remove RNA*later* stabilized tissues from the reagent using forceps. Determine the amount of tissue. Do not use more than 30 mg.

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

**Note:** If the tissues were stored in RNA*later* Reagent at  $-20^{\circ}\text{C}$ , be sure to remove any crystals that may have formed.

2. Follow either step 2a or 2b.

- 2a. For RNA*later* stabilized tissues:

If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed to step 3.

If using only a portion of the tissue, cut it on a clean surface. Weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed to step 3.

RNA in RNA*later* stabilized tissues is protected during cutting and weighing of tissues at ambient temperature ( $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ). It is not necessary to cut the tissues on ice or dry ice or in a refrigerated room. Remaining tissues can be stored in RNA*later* RNA Stabilization Reagent. Previously stabilized tissues can be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  without the reagent.

- 2b. For unstabilized fresh or frozen tissues:

If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed immediately to step 3.

If using only a portion of the tissue, weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed immediately to step 3.

RNA in harvested tissues is not protected until the tissues are treated with RNA*later* RNA Stabilization Reagent, flash-frozen, or disrupted and homogenized in step 3. Frozen tissues should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

**Note:** Remaining fresh tissues can be placed into RNA*later* RNA Stabilization Reagent to stabilize RNA (see protocol on page 36). However, previously frozen tissues thaw too slowly in the reagent, preventing the reagent from diffusing into the tissues quickly enough to prevent RNA degradation.

3. Disrupt the tissue and homogenize the lysate in Buffer RLT (do not use more than 30 mg tissue) according to step 3a, 3b, 3c, or 3d.

See "Disrupting and homogenizing starting material", pages 20–23, for more details on disruption and homogenization.

**Note:** Ensure that  $\beta$ -ME is added to Buffer RLT before use (see "Things to do before starting").

After storage in RNA/*later* RNA Stabilization Reagent, tissues may become slightly harder than fresh or thawed tissues. Disruption and homogenization using standard methods is usually not a problem. For easier disruption and homogenization, we recommend using 600 µl Buffer RLT.

**Note:** Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the RNeasy spin column. Homogenization with the TissueLyser and rotor–stator homogenizers generally results in higher RNA yields than with other methods.

**Table 8. Volumes of Buffer RLT for Tissue Disruption and Homogenization**

Amount of starting material (mg)	Volume of Buffer RLT (µl)
<20	350 or 600*
20–30	600

\* Use 600 µl Buffer RLT for tissues stabilized in RNA/*later* RNA Stabilization Reagent or for difficult-to-lyse tissues.

- 3a. **Disruption and homogenization using a rotor–stator homogenizer:**  
Place the weighed (fresh, frozen, or RNA/*later* stabilized) tissue in a suitably sized vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8). Immediately disrupt and homogenize the tissue using a conventional rotor–stator homogenizer until it is uniformly homogeneous (usually 20–40 s). Proceed to step 4.
- 3b. **Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a QIAshredder homogenizer:**  
Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA/*later* stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.  
Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8). Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Proceed to step 4.
- 3c. **Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a needle and syringe:**  
Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA/*later* stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.



Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8), and homogenize by passing the lysate at least 5 times through a blunt 20-gauge needle fitted to an RNase-free syringe. Proceed to step 4.

- 3d. Disruption and homogenization using the TissueLyser:  
See the *TissueLyser Handbook*. Then proceed to step 4.
4. Centrifuge the lysate for 3 min at full speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and transfer it to a new microcentrifuge tube (not supplied). Use only this supernatant (lysate) in subsequent steps.

In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present after the 3 min centrifugation, making the pellet invisible.

5. Add 1 volume of 70% ethanol\* to the cleared lysate, and mix immediately by pipetting. **Do not centrifuge.** Proceed immediately to step 6.

**Note:** The volume of lysate may be less than 350  $\mu$ l or 600  $\mu$ l due to loss during homogenization and centrifugation in steps 3 and 4.

**Note:** Precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

6. Transfer up to 700  $\mu$ l of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Discard the flow-through.<sup>†</sup>

Reuse the collection tube in step 7.

If the sample volume exceeds 700  $\mu$ l, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.<sup>†</sup>

**Optional:** If performing optional on-column DNase digestion (see "Eliminating genomic DNA contamination", page 23), follow steps D1–D4 (page 69) after performing this step.

7. Add 700  $\mu$ l Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.<sup>†</sup>

Reuse the collection tube in step 8.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Skip this step if performing optional on-column DNase digestion (page 69).

\* Using 50% ethanol (instead of 70% ethanol) may increase RNA yields from liver samples.

<sup>†</sup> Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.



8. Add 500  $\mu$ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.

Reuse the collection tube in step 9.

**Note:** Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Things to do before starting").

9. Add 500  $\mu$ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane.

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

10. **Optional:** Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 9.

11. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50  $\mu$ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to elute the RNA.

12. If the expected RNA yield is  $>30 \mu$ g, repeat step 11 using another 30–50  $\mu$ l RNase-free water, or using the eluate from step 11 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 11.

If using the eluate from step 11, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

#### **Annexe 4 : Composition du Master Mix pour la Reverse transcription**

<b>Réactifs</b>	<b>Volume en <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Concentration finale</b>
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4	5 mM
tampon de PCR II 10X	2	1X
eau RNase free	2*	
dGTP	2	1 mM
dATP	2	1 mM
dTTP	2	1 mM
dCTP	2	1 mM
inhibiteur de Rnase	1	1 U/ $\mu\text{L}$
Reverse transcriptase MuLV	1	2,5 U/ $\mu\text{L}$
Random Hexamers	1	2,5 $\mu\text{M}$
ARN	1*	$\leq 1 \mu\text{g}$
TOTAL	20	

\*Le volume d'ARN est variable en fonction de la concentration en ARN de l'échantillon utilisé, comme le volume d'eau qui permet d'ajuster le volume réactionnel à 20  $\mu\text{L}$ .

<b>Programme du thermocycleur</b>		
42°C	99°C	5°C
15 minutes	5 minutes	5minutes ou $\infty$

**Annexe 5 : Amorces utilisées pour la RT PCR et conditions de PCR**

Gène	Isoforme	Amorce Forward	Amorce Reverse	Taille	Conditions
<i>SMN</i>		CTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGA	AGGAAGTGGGAATGGGTA ACTCT		Taq Roche Touch down 69-55°C
<i>LRRTM4</i>	Courte	AGCACATCCAGGGTGAAAAG	CACCTCTAGGGCTTCAAACA	598 pb	
	Longue	AGCACATCCAGGGTGAAAAG	GATTGCGCGATTGTGGA	836 pb	
		GCCATGATCCTCTTGGTGA	GGAGTTGGCTTCAGCGTTA	481 pb	

## Bibliographie

1. Warburg M, Sjö O, Fledelius HC, Pedersen SA. Autosomal recessive microcephaly, microcornea, congenital cataract, mental retardation, optic atrophy, and hypogenitalism. Micro syndrome. *Am J Dis Child*. déc 1993;147(12):1309- 1312.
2. Rodríguez Criado G, Rufo M, Gómez de Terreros I. A second family with Micro syndrome. *Clin Dysmorphol*. oct 1999;8(4):241- 245.
3. Mégarbané A, Choueiri R, Bleik J, Mezzina M, Caillaud C. Microcephaly, microphthalmia, congenital cataract, optic atrophy, short stature, hypotonia, severe psychomotor retardation, and cerebral malformations: a second family with micro syndrome or a new syndrome? *J Med Genet*. août 1999;36(8):637- 640.
4. Derbent M, Agras PI, Gedik S, Oto S, Alehan F, Saatçi U. Congenital cataract, microphthalmia, hypoplasia of corpus callosum and hypogenitalism: report and review of Micro syndrome. *Am J Med Genet A*. 30 juill 2004;128A(3):232- 234.
5. Ainsworth JR, Morton JE, Good P, Woods CG, George ND, Shield JP, et al. Micro syndrome in Muslim Pakistan children. *Ophthalmology*. mars 2001;108(3):491- 497.
6. Bardakjian T, Weiss A, Schneider AS. Anophthalmia/Microphthalmia Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, et al., éditeurs. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1378/>
7. Bahi-Buisson N, Poirier K, Saillour Y, Quelin C, Boddaert N, Plouin P, et al. Troubles diffus de la migration neuronale : spectre agyrie-pachygyrie-hétérotopies laminaires sous-corticales et polymicrogyries multifocales et diffuses. *Epilepsies*. 1 oct 2008;20(4):265- 273.
8. Edwards TJ, Sherr EH, Barkovich AJ, Richards LJ. Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes. *Brain*. juin 2014;137(Pt 6):1579- 1613.
9. Graham JM Jr, Hennekam R, Dobyns WB, Roeder E, Busch D. MICRO syndrome: an entity distinct from COFS syndrome. *Am J Med Genet A*. 30 juill 2004;128A(3):235- 245.
10. Martsolf JT, Hunter AG, Haworth JC. Severe mental retardation, cataracts, short stature, and primary hypogonadism in two brothers. *Am J Med Genet*. 1978;1(3):291- 299.
11. Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, et al. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics*. févr 2008;121(2):404- 410.
12. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med*. 16 oct 2008;359(16):1685- 1699.
13. Pena SD, Shokeir MH. Autosomal recessive cerebro-oculo-facio-skeletal (COFS) syndrome. *Clin Genet*. 1974;5(4):285- 293.

14. Czeizel A, Lowry RB. Syndrome of cataract, mild microcephaly, mental retardation and Perthes-like changes in sibs. *Acta Paediatr Hung.* 1990;30(3-4):343- 349.
15. Sugarman GI. Syndrome of microcephaly, cataracts, kyphosis, and joint contractures versus Cockayne's syndrome. *J Pediatr.* févr 1973;82(2):351- 352.
16. Shaheen R, Rahbeeni Z, Alhashem A, Fageih E, Zhao Q, Xiong Y, et al. Neu-Laxova syndrome, an inborn error of serine metabolism, is caused by mutations in PHGDH. *Am J Hum Genet.* 5 juin 2014;94(6):898- 904.
17. Fukui K, Sasaki T, Imazumi K, Matsuura Y, Nakanishi H, Takai Y. Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J Biol Chem.* 21 févr 1997;272(8):4655- 4658.
18. Handley MT, Morris-Rosendahl DJ, Brown S, Macdonald F, Hardy C, Bem D, et al. Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. *Hum Mutat.* mai 2013;34(5):686- 696.
19. Aligianis IA, Johnson CA, Gissen P, Chen D, Hampshire D, Hoffmann K, et al. Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat Genet.* mars 2005;37(3):221- 223.
20. Abdel-Salam GMH, Hassan NA, Kayed HF, Aligianis IA. Phenotypic variability in Micro syndrome: report of new cases. *Genet Couns.* 2007;18(4):423- 435.
21. Yüksel A, Yesil G, Aras C, Seven M. Warburg Micro syndrome in a Turkish boy. *Clin Dysmorphol.* avr 2007;16(2):89- 93.
22. Morris-Rosendahl DJ, Segel R, Born AP, Conrad C, Loeys B, Brooks SS, et al. New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet.* oct 2010;18(10):1100- 1106.
23. Sakane A, Manabe S, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Kiyokage E, Toida K, et al. Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 juin 2006;103(26):10029- 10034.
24. Aligianis IA, Morgan NV, Mione M, Johnson CA, Rosser E, Hennekam RC, et al. Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. *Am J Hum Genet.* avr 2006;78(4):702- 707.
25. Borck G, Wunram H, Steiert A, Volk AE, Körber F, Roters S, et al. A homozygous RAB3GAP2 mutation causes Warburg Micro syndrome. *Hum Genet.* janv 2011;129(1):45- 50.
26. Vazquez-Martinez R, Cruz-Garcia D, Duran-Prado M, Peinado JR, Castaño JP, Malagon MM. Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory granules. *Traffic.* juill 2007;8(7):867- 882.
27. Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, Parton RG. Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem.* 23 déc 2005;280(51):42325- 42335.

28. Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci.* 15 juin 2005;118(Pt 12):2601- 2611.
29. Pulido MR, Diaz-Ruiz A, Jiménez-Gómez Y, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F, Tinahones F, et al. Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22931.
30. Dejgaard SY, Murshid A, Erman A, Kizilay O, Verbich D, Lodge R, et al. Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *J Cell Sci.* 15 août 2008;121(Pt 16):2768- 2781.
31. Gronemeyer T, Wiese S, Grinhagens S, Schollenberger L, Satyagraha A, Huber LA, et al. Localization of Rab proteins to peroxisomes: a proteomics and immunofluorescence study. *FEBS Lett.* 14 févr 2013;587(4):328- 338.
32. Vazquez-Martinez R, Martinez-Fuentes AJ, Pulido MR, Jimenez-Reina L, Quintero A, Leal-Cerro A, et al. Rab18 is reduced in pituitary tumors causing acromegaly and its overexpression reverts growth hormone hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2008;93(6):2269- 2276.
33. Bem D, Yoshimura S-I, Nunes-Bastos R, Bond FC, Bond FF, Kurian MA, et al. Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. *Am J Hum Genet.* 8 avr 2011;88(4):499- 507.
34. Handley MT, Aligianis IA. RAB3GAP1, RAB3GAP2 and RAB18: disease genes in Micro and Martsolf syndromes. *Biochem Soc Trans.* 1 déc 2012;40(6):1394- 1397.
35. Liegel RP, Handley MT, Ronchetti A, Brown S, Langemeyer L, Linford A, et al. Loss-of-function mutations in TBC1D20 cause cataracts and male infertility in blind sterile mice and Warburg micro syndrome in humans. *Am J Hum Genet.* 5 déc 2013;93(6):1001- 1014.
36. Allan BB, Moyer BD, Balch WE. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science.* 21 juill 2000;289(5478):444- 448.
37. Sandoval CO, Simmen T. Rab proteins of the endoplasmic reticulum: functions and interactors. *Biochem Soc Trans.* 1 déc 2012;40(6):1426- 1432.
38. Pulido MR, Diaz-Ruiz A, Jiménez-Gómez Y, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F, Tinahones F, et al. Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22931.
39. Wang C, Liu Z, Huang X. Rab32 is important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e32086.
40. Ma L, Yang J, Runesha HB, Tanaka T, Ferrucci L, Bandinelli S, et al. Genome-wide association analysis of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels using the Framingham heart study data. *BMC Med Genet.* 2010;11:55.
41. Blackstone C. Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:25- 47.
42. Klemm RW, Norton JP, Cole RA, Li CS, Park SH, Crane MM, et al. A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size. *Cell Rep.* 30 mai 2013;3(5):1465- 1475.

43. Handley MT, Mégarbané A, Meynert AM, Brown S, Freyer E, Taylor MS, et al. Loss of ALDH18A1 function is associated with a cellular lipid droplet phenotype suggesting a link between autosomal recessive cutis laxa type 3A and Warburg Micro syndrome. *Mol Genet Genomic Med.* juill 2014;2(4):319- 325.
44. Thomas C. Südhof, MD Research Abstract | HHMI.org [Internet]. Disponible sur: <http://www.hhmi.org/research/synapse-formation-and-function>
45. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 25 mars 1993;362(6418):318- 324.
46. Misura KM, Scheller RH, Weis WI. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature.* 23 mars 2000;404(6776):355- 362.
47. Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Südhof TC, Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20 févr 2007;104(8):2697- 2702.
48. Deák F, Xu Y, Chang W-P, Dulubova I, Khvotchev M, Liu X, et al. Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *J Cell Biol.* 9 mars 2009;184(5):751- 764.
49. Zhou P, Pang ZP, Yang X, Zhang Y, Rosenmund C, Bacaj T, et al. Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *EMBO J.* 9 janv 2013;32(1):159- 171.
50. Jorquera RA, Huntwork-Rodriguez S, Akbergenova Y, Cho RW, Littleton JT. Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the timing and properties of synaptotagmin activity. *J Neurosci.* 12 déc 2012;32(50):18234- 18245.
51. Lang T, Jahn R. Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;(184):107- 127.
52. Fioravante D, Regehr WG. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* avr 2011;21(2):269- 274.
53. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* août 2009;10(8):513- 525.
54. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2001;2(2):107- 117.
55. Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA.* 8 août 2006;103(32):11821- 11827.
56. Corbeel L, Freson K. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr.* juill 2008;167(7):723- 729.
57. Schlüter OM, Khvotchev M, Jahn R, Südhof TC. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem.* 25 oct 2002;277(43):40919- 40929.

58. Pan X, Eathiraj S, Munson M, Lambright DG. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*. 20 juill 2006;442(7100):303- 306.
59. Schonn J-S. Mécanismes de la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs ; rôle des GTPases Rab3 et Rab27. 2003.
60. Tuvim MJ, Adachi R, Hoffenberg S, Dickey BF. Traffic control: Rab GTPases and the regulation of interorganellar transport. *News Physiol Sci*. avr 2001;16:56- 61.
61. Zahraoui A, Touchot N, Chardin P, Tavitian A. Complete coding sequences of the ras related rab 3 and 4 cDNAs. *Nucleic Acids Res*. 11 févr 1988;16(3):1204.
62. Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE, et al. The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature*. 9 juin 1994;369(6480):493- 497.
63. Geppert M, Goda Y, Stevens CF, Südhof TC. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*. 19 juin 1997;387(6635):810- 814.
64. Castillo PE, Janz R, Südhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA. Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 7 août 1997;388(6642):590- 593.
65. Geppert M, Südhof TC. RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci*. 1998;21:75- 95.
66. Leenders AG, Lopes da Silva FH, Ghijsen WE, Verhage M. Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol Biol Cell*. oct 2001;12(10):3095- 3102.
67. Wang X, Thiagarajan R, Wang Q, Tewolde T, Rich MM, Engisch KL. Regulation of quantal shape by Rab3A: evidence for a fusion pore-dependent mechanism. *J Physiol (Lond)*. 15 août 2008;586(16):3949- 3962.
68. Schlüter OM, Basu J, Südhof TC, Rosenmund C. Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci*. 25 janv 2006;26(4):1239- 1246.
69. Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, et al. A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J*. 17 août 2005;24(16):2839- 2850.
70. Huang C-C, Yang D-M, Lin C-C, Kao L-S. Involvement of Rab3A in vesicle priming during exocytosis: interaction with Munc13-1 and Munc18-1. *Traffic*. oct 2011;12(10):1356- 1370.
71. Xie C, Li J, Guo T, Yan Y, Tang C, Wang Y, et al. Rab3A is a new interacting partner of synaptotagmin I and may modulate synaptic membrane fusion through a competitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 21 févr 2014;444(4):491- 495.
72. Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, et al. Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol Cell Biol*. avr 1993;13(4):2061- 2068.
73. Li C, Takei K, Geppert M, Daniell L, Stenius K, Chapman ER, et al. Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C. *Neuron*. oct 1994;13(4):885- 898.



74. Stahl B, Chou JH, Li C, Südhof TC, Jahn R. Rab3 reversibly recruits rabphilin to synaptic vesicles by a mechanism analogous to raf recruitment by ras. *EMBO J.* 15 avr 1996;15(8):1799- 1809.
75. Chung SH, Takai Y, Holz RW. Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* 14 juill 1995;270(28):16714- 16718.
76. Arribas M, Regazzi R, Garcia E, Wollheim CB, De Camilli P. The stimulatory effect of rabphilin 3a on regulated exocytosis from insulin-secreting cells does not require an association-dissociation cycle with membranes mediated by Rab 3. *Eur J Cell Biol.* nov 1997;74(3):209- 216.
77. Schlüter OM, Schnell E, Verhage M, Tzonopoulos T, Nicoll RA, Janz R, et al. Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J Neurosci.* 15 juill 1999;19(14):5834- 5846.
78. Deák F, Shin O-H, Tang J, Hanson P, Ubach J, Jahn R, et al. Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *EMBO J.* 21 juin 2006;25(12):2856- 2866.
79. Zhang Y, Luan Z, Liu A, Hu G. The scaffolding protein CASK mediates the interaction between rabphilin3a and beta-neurexins. *FEBS Lett.* 25 mai 2001;497(2-3):99- 102.
80. Baldini G, Martelli AM, Tabellini G, Horn C, Machaca K, Narducci P, et al. Rabphilin localizes with the cell actin cytoskeleton and stimulates association of granules with F-actin cross-linked by {alpha}-actinin. *J Biol Chem.* 14 oct 2005;280(41):34974- 34984.
81. Ohya T, Sasaki T, Kato M, Takai Y. Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5. *J Biol Chem.* 2 janv 1998;273(1):613- 617.
82. Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature.* 7 août 1997;388(6642):593- 598.
83. Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, et al. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature.* 17 janv 2002;415(6869):321- 326.
84. Powell CM, Schoch S, Monteggia L, Barrot M, Matos MF, Feldmann N, et al. The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory. *Neuron.* 8 avr 2004;42(1):143- 153.
85. Schoch S, Mittelstaedt T, Kaeser PS, Padgett D, Feldmann N, Chevaleyre V, et al. Redundant functions of RIM1alpha and RIM2alpha in Ca(2+)-triggered neurotransmitter release. *EMBO J.* 13 déc 2006;25(24):5852- 5863.
86. Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron.* 30 oct 2013;80(3):675- 690.
87. Mittelstaedt T, Alvaréz-Baron E, Schoch S. RIM proteins and their role in synapse function. *Biol Chem.* juin 2010;391(6):599- 606.
88. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* sept 1992;116(1):201- 211.

89. Laurén J, Airaksinen MS, Saarma M, Timmusk T. A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system. *Genomics*. avr 2003;81(4):411- 421.
90. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, et al. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J*. sept 2004;18(12):1401- 1403.
91. Kitano H, Nishimura H, Tachibana H, Yoshikawa H, Matsuyama T. ORP150 ameliorates ischemia/reperfusion injury from middle cerebral artery occlusion in mouse brain. *Brain Res*. 23 juill 2004;1015(1-2):122- 128.
92. Aleshin AN, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Bando Y, Ono M, Memon IA, et al. 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. mars 2005;38(3):517- 525.
93. Miyagi T, Hori O, Egawa M, Kato H, Kitagawa Y, Konaka H, et al. Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression in human prostate cancer cells. *Mol Urol*. 2001;5(2):79- 80.
94. Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Kawano K, Yoshikawa K, Ozawa K, et al. Expression of the 150-kd oxygen-regulated protein in human breast cancer. *Lab Invest*. juin 1998;78(6):699- 706.
95. Asahi H, Koshida K, Hori O, Ogawa S, Namiki M. Immunohistochemical detection of the 150-kDa oxygen-regulated protein in bladder cancer. *BJU Int*. sept 2002;90(4):462- 466.
96. Radu A, Blobel G, Wozniak RW. Nup107 is a novel nuclear pore complex protein that contains a leucine zipper. *J Biol Chem*. 1 juill 1994;269(26):17600- 17605.
97. Boehmer T, Enninga J, Dales S, Blobel G, Zhong H. Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4 févr 2003;100(3):981- 985.
98. Baï SW, Rouquette J, Umeda M, Faigle W, Loew D, Sazer S, et al. The fission yeast Nup107-120 complex functionally interacts with the small GTPase Ran/Spi1 and is required for mRNA export, nuclear pore distribution, and proper cell division. *Mol Cell Biol*. juill 2004;24(14):6379- 6392.
99. Zheng X, Yang S, Han Y, Zhao X, Zhao L, Tian T, et al. Loss of zygotic NUP107 protein causes missing of pharyngeal skeleton and other tissue defects with impaired nuclear pore function in zebrafish embryos. *J Biol Chem*. 2 nov 2012;287(45):38254- 38264.
100. Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. juin 2012;64(6):1809- 1817.
101. Brymora A, Valova VA, Larsen MR, Roufogalis BD, Robinson PJ. The brain exocyst complex interacts with RalA in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *J Biol Chem*. 10 août 2001;276(32):29792- 29797.

102. Borsani G, Piovani G, Zoppi N, Bertini V, Bini R, Notarangelo L, et al. Cytogenetic and molecular characterization of a de-novo t(2p;7p) translocation involving TNS3 and EXOC6B genes in a boy with a complex syndromic phenotype. *Eur J Med Genet.* août 2008;51(4):292- 302.
103. Frühmesser A, Blake J, Haberlandt E, Baying B, Raeder B, Runz H, et al. Disruption of EXOC6B in a patient with developmental delay, epilepsy, and a de novo balanced t(2;8) translocation. *Eur J Hum Genet.* 20 févr 2013;
104. Rümenapp U, Freichel-Blomquist A, Wittinghofer B, Jakobs KH, Wieland T. A mammalian Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor (p164-RhoGEF) without a pleckstrin homology domain. *Biochem J.* 15 sept 2002;366(Pt 3):721- 728.
105. Bloethner S, Mould A, Stark M, Hayward NK. Identification of ARHGEF17, DENND2D, FGFR3, and RB1 mutations in melanoma by inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Chromosomes Cancer.* déc 2008;47(12):1076- 1085.
106. Steinberg S, de Jong S, Andreassen OA, Werge T, Børglum AD, Mors O, et al. Common variants at VRK2 and TCF4 conferring risk of schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2011;20(20):4076- 4081.
107. Li M, Wang Y, Zheng X, Ikeda M, Iwata N, Luo X, et al. Meta-analysis and brain imaging data support the involvement of VRK2 (rs2312147) in schizophrenia susceptibility. *Schizophr Res.* déc 2012;142(1-3):200- 205.
108. Fernández IF, Blanco S, Lozano J, Lazo PA. VRK2 inhibits mitogen-activated protein kinase signaling and inversely correlates with ErbB2 in human breast cancer. *Mol Cell Biol.* oct 2010;30(19):4687- 4697.
109. Liu T, Xie L, Ye J, Liu Y, He X. Screening of candidate genes for primary open angle glaucoma. *Mol Vis.* 2012;18:2119- 2126.
110. Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, Geiger D, Segel R, Lee M, et al. Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *Am J Hum Genet.* août 2009;85(2):281- 289.
111. Chang Y-F, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:51- 74.
112. Linhoff MW, Laurén J, Cassidy RM, Dobie FA, Takahashi H, Nygaard HB, et al. An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron.* 12 mars 2009;61(5):734- 749.
113. Siddiqui TJ, Craig AM. Synaptic organizing complexes. *Curr Opin Neurobiol.* févr 2011;21(1):132- 143.
114. Haines BP, Rigby PWJ. Developmentally regulated expression of the LRRTM gene family during mid-gestation mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns.* janv 2007;7(1-2):23- 29.
115. Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyakkers A, Craig AM. LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *J Neurosci.* 2 juin 2010;30(22):7495- 7506.

116. De Wit J, Sylwestrak E, O'Sullivan ML, Otto S, Tiglio K, Savas JN, et al. LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron*. 24 déc 2009;64(6):799- 806.
117. Ko J, Fuccillo MV, Malenka RC, Südhof TC. LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron*. 24 déc 2009;64(6):791- 798.
118. Soler-Llavina GJ, Arstikaitis P, Morishita W, Ahmad M, Südhof TC, Malenka RC. Leucine-rich repeat transmembrane proteins are essential for maintenance of long-term potentiation. *Neuron*. 7 août 2013;79(3):439- 446.
119. Francks C. Leucine-rich repeat genes and the fine-tuning of synapses. *Biol Psychiatry*. 1 mai 2011;69(9):820- 821.
120. Schwenk J, Harmel N, Brechet A, Zolles G, Berkefeld H, Müller CS, et al. High-resolution proteomics unravel architecture and molecular diversity of native AMPA receptor complexes. *Neuron*. 24 mai 2012;74(4):621- 633.
121. Siddiqui TJ, Tari PK, Connor SA, Zhang P, Dobie FA, She K, et al. An LRRTM4-HSPG complex mediates excitatory synapse development on dentate gyrus granule cells. *Neuron*. 21 août 2013;79(4):680- 695.
122. De Wit J, O'Sullivan ML, Savas JN, Condomitti G, Caccese MC, Vennekens KM, et al. Unbiased discovery of glypican as a receptor for LRRTM4 in regulating excitatory synapse development. *Neuron*. 21 août 2013;79(4):696- 711.
123. Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science*. 7 nov 2003;302(5647):1044- 1046.
124. Yamaguchi Y, Inatani M, Matsumoto Y, Ogawa J, Irie F. Roles of heparan sulfate in mammalian brain development current views based on the findings from Ext1 conditional knockout studies. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;93:133- 152.
125. Iwao K, Inatani M, Ogata-Iwao M, Yamaguchi Y, Okinami S, Tanihara H. Heparan sulfate deficiency in periorbital mesenchyme causes microphthalmia and ciliary body dysgenesis. *Exp Eye Res*. janv 2010;90(1):81- 88.
126. Jen Y-HL, Musacchio M, Lander AD. Glypican-1 controls brain size through regulation of fibroblast growth factor signaling in early neurogenesis. *Neural Dev*. 2009;4:33.
127. Olson JM, Asakura A, Snider L, Hawkes R, Strand A, Stoeck J, et al. NeuroD2 is necessary for development and survival of central nervous system neurons. *Dev Biol*. 1 juin 2001;234(1):174- 187.
128. Ince-Dunn G, Hall BJ, Hu S-C, Ripley B, Hugarir RL, Olson JM, et al. Regulation of thalamocortical patterning and synaptic maturation by NeuroD2. *Neuron*. 2 mars 2006;49(5):683- 695.
129. Wilke SA, Hall BJ, Antonios JK, Denardo LA, Otto S, Yuan B, et al. NeuroD2 regulates the development of hippocampal mossy fiber synapses. *Neural Dev*. 2012;7:9.
130. Messmer K, Shen W-B, Remington M, Fishman PS. Induction of neural differentiation by the transcription factor neuroD2. *Int J Dev Neurosci*. avr 2012;30(2):105- 112.

131. Bormuth I, Yan K, Yonemasu T, Gummert M, Zhang M, Wichert S, et al. Neuronal basic helix-loop-helix proteins Neurod2/6 regulate cortical commissure formation before midline interactions. *J Neurosci*. 9 janv 2013;33(2):641- 651.
132. Kon N, Zhong J, Kobayashi Y, Li M, Szabolcs M, Ludwig T, et al. Roles of HAUSP-mediated p53 regulation in central nervous system development. *Cell Death Differ*. août 2011;18(8):1366- 1375.
133. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*. mai 2003;34(1):27- 29.
134. Gauthier J, Siddiqui TJ, Huashan P, Yokomaku D, Hamdan FF, Champagne N, et al. Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Hum Genet*. oct 2011;130(4):563- 573.
135. Zweier C, de Jong EK, Zweier M, Orrico A, Ousager LB, Collins AL, et al. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. *Am J Hum Genet*. nov 2009;85(5):655- 666.
136. Sousa I, Clark TG, Holt R, Pagnamenta AT, Mulder EJ, Minderaa RB, et al. Polymorphisms in leucine-rich repeat genes are associated with autism spectrum disorder susceptibility in populations of European ancestry. *Mol Autism*. 2010;1(1):7.
137. Francks C, Maegawa S, Laurén J, Abrahams BS, Velayos-Baeza A, Medland SE, et al. LRRTM1 on chromosome 2p12 is a maternally suppressed gene that is associated paternally with handedness and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. déc 2007;12(12):1129- 1139, 1057.
138. Ludwig KU, Mattheisen M, Mühleisen TW, Roeske D, Schmääl C, Breuer R, et al. Supporting evidence for LRRTM1 imprinting effects in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. août 2009;14(8):743- 745.
139. Takashima N, Odaka YS, Sakoori K, Akagi T, Hashikawa T, Morimura N, et al. Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking *Lrrtm1*, a gene associated with schizophrenia. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22716.
140. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 15 juill 2010;466(7304):368- 372.
141. Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, Zheng H, Malhotra D, Jin X, et al. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell*. 21 déc 2012;151(7):1431- 1442.

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

**LEGRAND Anne**

**Identification d'un nouveau gène dans le syndrome Micro-Warburg**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2014, 125 p

**RESUME**

Le syndrome Micro Warburg (WARBM) est un syndrome polymalformatif, sévère, autosomique récessif, qui associe des anomalies oculaires, un retard mental avec des anomalies du SNC avec polymicrogyrie, et un hypogénitalisme hypothalamique. Des mutations de *RAB3GAP1* et *RAB3GAP2*, impliqués dans le transport vésiculaire, ainsi que de *RAB18* et *TBC1D20* ont été rapportées. Ce syndrome est caractérisé par une hétérogénéité génétique avec 40% des patients sans mutation dans les 4 gènes connus.

Notre travail a débuté par l'étude d'une famille consanguine d'origine algérienne dans laquelle trois enfants étaient atteints de WARBM et un enfant non atteint. Par une analyse de liaison génome entier dans la famille, trois régions d'homozygotie ont été identifiées, et les 4 gènes connus ont été exclus. Un séquençage d'exome a été réalisé chez le cas index. L'application de filtres successifs a permis de retenir une seule variation homozygote dans les 3 régions d'homozygotie : mutation avec décalage du cadre de lecture dans le gène *LRRTM4*. La vérification en séquençage de Sanger ainsi que l'analyse de ségrégation familiale a conforté *LRRTM4* comme seul gène candidat pertinent.

*LRRTM4*, qui code pour une protéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion synaptique, possède 2 isoformes. Afin d'étudier l'effet de la mutation qui est spécifique de l'isoforme longue, l'expression des ARNm puis des protéines a été étudiée par RT PCR et western blot, dans la moelle épinière des patients. Nous avons montré que les deux ARNm et les deux protéines sont exprimés chez les patients.

Afin de valider *LRRTM4* comme un nouveau gène impliqué dans le WARBM, son séquençage a été entrepris chez 68 patients atteints de WARBM, puis chez 126 individus présentant une anomalie de la plaque corticale, dont font partie la polymicrogyrie et la pachygyrie présentes dans le WARBM. Aucune mutation de *LRRTM4* n'a été mise en évidence chez un autre patient.

Des études fonctionnelles pour évaluer le retentissement de cette mutation et pour mieux connaître les voies de signalisation dans lesquelles est impliqué *LRRTM4* sont en cours et permettraient de valider ce nouveau gène dans le WARBM.

**MOTS CLES**

Syndrome Micro-Warburg  
Polymicrogyrie  
Transmission synaptique  
Protéines RaB  
*LRRTM4*

**JURY**

Mme C. VINCIGUERRA, Professeur en Pharmacie  
M. D. SANLAVILLE, Professeur en Médecine  
M. A. VASILJEVIC, Docteur en médecine  
Mme T. ATTIE-BITACH, Professeur en Médecine

**DATE DE SOUTENANCE**

Mercredi 3 septembre 2014

**ADRESSE DE L'AUTEUR**

113 rue Louis Guérin – 69006 LYON