

Université de Montréal

**Études génétiques moléculaires des gènes de la polarité  
planaire cellulaire dans les anomalies du tube neural chez  
l'Homme**

par

Redouane Allache

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Doctorat  
en Pathologie et Biologie Cellulaire  
option système nerveux

Avril, 2014

© Redouane Allache, 2014

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Études génétiques moléculaires des gènes de la polarité planaire cellulaire dans les anomalies  
du tube neural chez l'Homme

Présenté par :  
Redouane Allache

Membres du Jury :

Dr. Alex Parker  
Président-rapporteur

Dr. Zoha Kibar  
Directeur de recherche

Dr. Muriel Aubry  
Membre du jury

Dr. Jabado Nada  
Examineur externe

Dr. Réjean Couture  
Représentant de la doyenne de la Faculté de Médecine

## Résumé

Les anomalies du tube neural (ATN) sont des malformations congénitales parmi les plus fréquentes chez l'humain en touchant 1-2 nouveau-nés par 1000 naissances. Elles résultent d'un défaut de fermeture du tube neural pendant l'embryogenèse. Les formes les plus courantes d'ATN chez l'homme sont l'anencéphalie et le spina-bifida. Leur étiologie est complexe impliquant à la fois des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques.

Un dérèglement dans la signalisation Wnt, incluant la signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine et non-canonique de la polarité planaire cellulaire (PCP), peut causer respectivement le cancer ou les anomalies du tube neural (ATN).

Les deux voies semblent s'antagoniser mutuellement. Dans cette étude, nous investiguons les rôles de *Lrp6* et de *ANKRD6*, en tant qu'interrupteurs moléculaires entre les deux voies de signalisation Wnt, et *CELSRI*, en tant que membre de la PCP, chez la souris mutante *Skax*<sup>26m1Jus</sup>, générée par l'agent mutagène N-Ethyl-N-Nitrosuera, et dans une cohorte de patients humains ATN.

**Pour *Lrp6***, nous avons démontré que *Skax*<sup>26m1Jus</sup> représente un allèle hypermorphique de *Lrp6* avec une augmentation de l'activité de la signalisation Wnt/canonique et une diminution de l'activité JNK induite par la voie PCP. Nous avons également montré que *Lrp6*<sup>Skax26m1Jus</sup> interagit génétiquement avec un mutant PCP (*Vangl2*<sup>Lp</sup>) où les doubles hétérozygotes ont montré une fréquence élevée d'ATN et des défauts dans la polarité des cellules ciliées de la cochlée. Particulièrement, notre étude démontre l'association des nouvelles et rares mutations faux-sens dans *LRP6* avec les ATN humaines. Nous montrons que trois mutations de *LRP6* causent une activité canonique réduite et non-canonique élevée.

**Pour *ANKRD6***, nous avons identifié quatre nouvelles et rares mutations faux-sens chez 0,8% des patients ATN et deux chez 1,3% des contrôles. Notamment, seulement deux, des six mutations validées (p.Pro548Leu et p.Arg632His) ont démontré un effet significatif sur l'activité de ANKRD6 selon un mode hypomorphique.

**Pour *CELSRI***, nous avons identifié une mutation non-sens dans l'exon 1 qui supprime la majeure partie de la protéine et une délétion de 12 pb. Cette perte de nucléotides ne change pas le cadre de lecture et élimine un motif putatif de phosphorylation par la PKC " SSR ". Nous avons également détecté un total de 13 nouveaux et rares variants faux-sens qui avaient été prédits comme étant pathogènes in silico.

Nos données confirment le rôle inhibiteur de *Lrp6* dans la signalisation PCP pendant la neurulation et indiquent aussi que les mutations faux-sens identifiées chez *LRP6* et *ANKRD6* pourraient affecter un équilibre réciproque et un antagonisme très sensible à un dosage précis entre les deux voies Wnt. Ces variants peuvent aussi agir comme facteurs prédisposants aux ATN. En outre, nos résultats impliquent aussi *CELSRI* comme un facteur de risque pour les anomalies du tube neural ou l'agénésie caudale.

Nos résultats fournissent des preuves supplémentaires que la voie de signalisation PCP a un rôle pathogène dans ces malformations congénitales et un outil important pour mieux comprendre leurs mécanismes moléculaires.

**Mots-clés :** *ANKRD6* ; *LRP6* ; *CELSRI* ; Agénésie caudale ; Anomalies du tube neural ; Polarité planaire cellulaire, Extension convergente ; signalisation Wnt.

## Abstract

Neural tube defects (NTDs) are among the most common congenital malformations in humans affecting 1–2 infants per 1000 births. NTDs are caused by failure of the neural tube to close during embryogenesis. The most common forms of NTDs in humans are anencephaly and spina bifida. Their etiology is complex implicating environmental and genetic factors. Wnt signaling has been classified as canonical Wnt/  $\beta$ -catenin dependent or non-canonical planar cell polarity (PCP) pathway. Misregulation of either pathway is linked mainly to cancer or neural tube defects (NTDs) respectively. Both pathways seem to antagonize each other. In this study, we investigate the role of *Lrp6* and *ANKRD6* as molecular switches between both Wnt pathways as well as *CELSRI* as PCP member, in a novel ENU mouse mutant of *Lrp6* (*Skax<sup>26m1Jus</sup>*) and in human NTDs.

**For *Lrp6*,** we demonstrate that *Skax<sup>26m1Jus</sup>* represents a hypermorphic allele of *Lrp6* with increased Wnt canonical and abolished PCP-induced JNK activities. We also show that *Lrp6<sup>Skax26m1Jus</sup>* genetically interacts with a PCP mutant (*Vangl2<sup>Lp</sup>*) where double heterozygotes showed an increased frequency of NTDs and defects in cochlear hair cells' polarity. Importantly, our study also demonstrates the association of rare and novel missense mutations in *LRP6* that is an inhibitor rather than an activator of the PCP pathway with human NTDs. We show that three *LRP6* mutations in NTDs led to a reduced Wnt canonical activity and enhanced PCP signaling.

**For *ANKRD6*:** We identified four rare missense mutations in 0.8% of the NTD patients and 2 rare missense mutations in 1.3% of the controls. Notably, when all 6 mutations were validated, only two mutations identified in NTD patients, p.Pro548Leu, p.Arg632His, significantly altered DIVERSIN activity in Wnt signaling assays in a hypomorphic fashion.

**For *CELSRI*:** We identified one nonsense mutation in exon 1 of *CELSRI* that truncates the majority of the protein in one NTD patient and one in-frame 12 bp deletion that removes a putative PKC phosphorylation “SSR” motif in one caudal agenesis patient. We also detected a total of 13 novel missense variants in 12 patients (11 NTDs and 1 caudal agenesis) that were predicted to be pathogenic *in silico*.

Our data confirm an inhibitory role of *Lrp6* in PCP signaling in neurulation and indicate that rare missense mutations in *LRP6* and *ANKRD6* could affect a balanced reciprocal and a highly dosage sensitive antagonism between both Wnt pathways in neurulation and act as predisposing factors to NTDs in a subset of patients. Also, our findings implicate *CELSRI* as a risk factor for NTDs or caudal agenesis.

Our findings provide additional evidence for a pathogenic role of PCP signaling in these malformations and an important tool for better understanding their molecular mechanisms.

**Keywords :** *ANKRD6* ; *DIVERSIN* ; *LRP6* ; *CELSRI* ; Caudal agenesis ; Neural Tube Defects ; Planar cell polarity ; Convergent extension; Wnt signaling.

# Table des matières

1. Introduction .....	1
1.1. Définition .....	1
1.2. Développement embryonnaire du système nerveux central .....	1
1.2.1. La neurulation .....	2
1.2.1.1. Neurulation primaire .....	3
1.2.1.2. Neurulation secondaire .....	8
1.3. Les Anomalies du tube neural (ATN) .....	9
1.3.1. Les différentes formes cliniques des ATN .....	9
1.3.1.1. Les ATN ouvertes .....	10
1.3.1.1.1. Les ATN ouvertes crâniiales .....	10
1.3.1.1.2. Les ATN ouvertes spinales ou les myélodysraphies .....	11
1.3.1.2. Les ATN fermées .....	11
1.3.1.2.1. ATN fermées avec une masse sous-cutanée .....	11
1.3.1.2.2. ATN fermées sans masse-cutanée .....	12
1.3.2. Diagnostic des ATN .....	13
1.3.3. Étiologie .....	14
1.3.3.1. Facteurs environnementaux .....	14
1.3.3.2. Facteurs génétiques .....	16
1.3.3.2.1. Gènes de la voie métabolique des folates chez les ATN humains.....	16
1.3.3.2.2. Gènes identifiés chez des souris modèles des ATN .....	18
1.3.3.2.3. Étude de gènes homologue et/ou orthologues, identifiés préalablement chez la souris, chez les patients d'ATN .....	18
1.4. Voies de signalisation Wnt .....	22
1.4.1.1. Les ligands Wnt .....	23
1.4.2. La voie Canonique wnt/Fz .....	24
1.4.2.1. Les récepteurs Frizzled et corécepteurs Lrp5 et Lrp6 .....	26

1.4.2.2.	Les modulateurs la voie canonique Wnt/Fz .....	26
1.4.3.	La voie non-canonique Wnt/Calcium .....	27
1.4.4.	La voie non-canonique du Fz/Dvl .....	28
1.5.	La polarité planaire cellulaire (PCP) chez les vertébrés .....	33
1.5.1.	La PCP et l'extension convergence durant la gastrulation et la neurulation ...	33
1.5.2.	La PCP et l'orientation des cils dans l'oreille interne .....	35
1.5.3.	La PCP et la guidance axonal .....	38
1.5.4.	La PCP et la mitose .....	39
1.5.5.	La PCP et la ciliogenèse .....	40
1.5.6.	La voie PCP et la polarité apico-basale.....	41
1.5.7.	La PCP et le cancer .....	44
1.6.	Le gène LRP6 .....	45
1.6.1.	Structures et interactions de Lrp6 .....	45
1.6.1.1.	Structure de Lrp6 .....	45
1.6.1.2.	Interactions extracellulaires de Lrp6 .....	46
1.6.1.3.	Interactions intracellulaires de Lrp6 .....	47
1.6.2.	Animaux modèles de Lrp6 .....	47
1.7.	Le gène DIVERSIN (ANKRD6) .....	49
1.7.1.	Structures et interactions .....	49
1.7.2.	Animaux modèles .....	52
1.8.	Le gène CELSR1 .....	53
1.8.1.	Structures et interactions .....	53
1.8.2.	Animaux modèles .....	55
2.	Projet de recherche .....	57
2.1.	Problématique .....	57
2.2.	Hypothèse et objectives .....	58
2.3.	Pertinence et retombées.....	58
3.	Novel mutations in <i>Lrp6</i> orthologues in mouse and human neural tube defects affect a highly dosage-sensitive Wnt non canonical planar cell polarity pathway .....	59
4.	Genetic studies of <i>ANKRD6</i> as a molecular switch between Wnt signaling pathways in human neural tube defects .....	94



5. Role of the planar cell polarity gene <i>CELSRI</i> in neural tube defects and caudal agenesis .....	112
6. Discussion .....	134
6.1. Identification d'un nouvel allèle hypermorphique de <i>Lrp6</i> ( <i>Skax<sup>26m1Jus</sup></i> ).....	134
6.2. L'importance d'un dosage précis entre les deux voies de signalisation Wnt dans la neurulation .....	136
6.2.1. Des études des animaux modèles incluant <i>Skax<sup>26m1Jus</sup></i> montrent l'importance d'un dosage précis entre les deux voies de signalisation Wnt .....	136
6.2.2. Des études des « molecular switches » incluant <i>LRP6</i> et <i>ANKRD6</i> dans une cohorte ATN humaine montrent l'importance d'un dosage précis entre les deux voies de signalisation Wnt dans la neurulation .....	139
6.3. La voie PCP joue un rôle important dans la prédisposition aux ATN .....	142
7. Plans futurs .....	144
7.1. <i>LRP6</i> .....	144
7.2. <i>ANKRD6</i> .....	145
7.3. <i>CELSRI</i> .....	146
8. Perspectives générales .....	147
9. Conclusion .....	148
10. Bibliographie .....	149

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Résumé ces gènes candidats dérivés des études chez les animaux modèles et qui étaient associés avec les ATN humaines .....	19
<b>Tableau 2:</b> Résumé Des gènes identifiés et qui présentent un phénotype PCP dans l'oreille interne .....	36
<b>Tableau 3:</b> Sommaire des différents phénotypes développés chez les souris mutantes pour les gènes <i>Celsr1-3</i> . FBM : facial branchiomotor.....	55
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Table 1:</b> Genotype-phenotypes studies in <i>Lrp6</i> <sup>Skax26-Jus</sup> .....	91
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Table 2:</b> Analysis of the neural tube defect phenotype in genetic interaction studies between <i>Lrp6</i> <sup>Skax26-Jus</sup> and <i>Vangl2</i> <sup>Lp</sup> .....	92
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Table S1:</b> Novel rare mutations (<1%) in <i>LRP6</i> in human neural tube defects absent in controls .....	93
<b>Manuscrit <i>ANKRD6</i>, Table 1:</b> Novel rare mutations (<5%) identified in <i>ANKRD6</i> in neural tube defects patients and controls .....	110
<b>Manuscrit <i>ANKRD6</i>, Table S1:</b> Interaction studies of wild type and mutant DIVERSIN with DVL3, PK1, VANGL2 and AXIN2 using the yeast two hybrid system .....	111
<b>Manuscrit <i>CELSR1</i>, Table I:</b> Novel rare mutations (<1%) identified in <i>CELSR1</i> in human neural tube defects .....	128
<b>Manuscrit <i>CELSR1</i>, Table S.I:</b> Characteristics of the 473 NTDs patients .....	129
<b>Manuscrit <i>CELSR1</i>, Table S2:</b> Summary of all sequence variants of <i>FZD3</i> and <i>FZD6</i> genes identified in 1112 subjects .....	130
<b>Manuscrit <i>CELSR1</i>, Table S3:</b> Common and known (rs ID) variants of <i>FZD3</i> and <i>FZD6</i> genes .....	131

**Manuscrit *CELSRI*, Table S.II:** Characteristics of neural tube defect patients carrying novel and rare mutations in *CELSRI* .....132

**Manuscrit *CELSRI*, Table S.I cont.:** Characteristics of neural tube defect patients carrying novel and rare mutations in *CELSRI* ..... 133

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Représentation schématique des étapes de fermeture de tube neural .....	2
<b>Figure 2:</b> Mécanismes de la constriction apicale .....	4
<b>Figure 3:</b> Diagramme représentatif du mécanisme morphogénétique d'extension convergente .....	6
<b>Figure 4:</b> Schéma des différents points d'initiation de fermeture du tube neural chez A) la souris et B) l'humain .....	8
<b>Figure 5:</b> Schéma représentation des étapes de la neurulation secondaire .....	9
<b>Figure 6:</b> Diagramme représentatif du mécanisme de la voie de signalisation canonique (Wnt/ $\beta$ -caténine) .....	25
<b>Figure 7:</b> Diagramme du mécanisme de la voie de signalisation Wnt/Calcium .....	28
<b>Figure 8:</b> Schéma représentatif des protéines centrales de la voie de signalisation PCP ainsi que les Divers interactions qui s'y établissent .....	30
<b>Figure 9:</b> Diagramme du mécanisme de la voie de signalisation de la polarité planaire cellulaire (PCP) .....	32
<b>Figure 10:</b> Micrographies électroniques à balayage des cellules ciliées internes (IHC) et externes (OHC) .....	36
<b>Figure 11:</b> Représentation des évidences du rôle de la signalisation PCP dans la guidance axonal .....	39
<b>Figure 12:</b> Schéma représentatif des domaines fonctionnels de la protéine transmembranaire LRP6 .....	46
<b>Figure 13:</b> Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de la protéine cytoplasmique DIVERSIN (ANKRD6) (Ankyrin repeat domain-containing protein 6) .....	50

<b>Figure 14:</b> Représentation schématique du modèle d'action de <i>ANKRD6</i> sur le mécanisme de dégradation de la $\beta$ -caténine .....	51
<b>Figure 15:</b> Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de la protéine transmembranaire CELSR1 .....	54
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Figure 1:</b> Identification of the gene mutated in <i>Skax26</i> <sup><i>m1Jus</i></sup> .....	86
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Figure 2:</b> Functional validation of the mutant <i>Lrp6</i> <sup><i>p.Ile681Arg</i></sup> in wild-type, heterozygous and homozygous <i>Lrp6</i> <sup><i>Skax26-Jus</i></sup> littermates and in HEK293T cells .....	87
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Figure 3:</b> Genetic interaction studies between <i>Lrp6</i> <sup><i>Skax26-Jus</i></sup> and <i>Vangl2</i> <sup><i>Lp</i></sup> .....	88
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Figure 4:</b> Rare novel mutations in <i>LRP6</i> in human neural tube defects (NTDs) .....	89
<b>Manuscrit <i>Lrp6</i>, Figure 5:</b> Functional validation of NTD-associated mutations in <i>LRP6</i> using TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin and JNK-AP-1 reporter assays .....	90
<b>Manuscrit <i>ANKRD6</i>, Figure 1:</b> Functional validation of rare variants detected in DIVERSIN in NTD patients and controls using JNK-AP-1 responsive and TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin and reporter assays .....	108
<b>Manuscrit <i>ANKRD6</i>, Figure S1:</b> Rare novel variants in DIVERSIN in human neural tube defects (NTDs) .....	109
<b>Manuscrit <i>CELSR1</i>, Figure 1:</b> Novel <i>CELSR1</i> mutations in neural tube defect (NTD) and caudal agenesis patients .....	126

## Liste des sigles et abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>aPKC</b>	Protéine kinase atypique C
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATN</b>	Anomalies du tube neural
<b>Bbs</b>	Syndrome de Bardet-Biedl
<b>BMP</b>	Protéine morphogénétique osseuse
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CAMKII</b>	Kinase calcium/calmodulin dépendante II
<b>CE</b>	Extension convergente
<b>Crc</b>	Circletail
<b>Cthrc1</b>	Collagen triple helix repeat containing1
<b>Dg</b>	Diego
<b>Ds</b>	Dachsous
<b>Dvl/Dsh</b>	Dishevelled
<b>Fj</b>	Four-jointed
<b>Ft</b>	Fat
<b>Fy</b>	Fuzzy
<b>Fz</b>	Frizzled
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogène-synthase-kinase 3 $\beta$
<b>Int</b>	Inturned

<b>JNK</b>	Kinase Jun
<b>LAP</b>	Leucine-rich repeat and PDZ domain
<b>LCS</b>	Liquide cérebro-spinal
<b>LEF</b>	Lymphoid Enhancer-binding factor
<b>Lp</b>	Loop-tail
<b>LRP</b>	LDL-R-Related protein
<b>MTHFR</b>	5,10-methylene-tetrahydrofolate réductase
<b>PAR</b>	Récepteurs activés par les protéases
<b>PCP</b>	Polarité planaire cellulaire
<b>pk</b>	prickle - spiny legs
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>ppt</b>	Pipetail, Wnt5
<b>PTK7</b>	Protéine tyrosine kinase
<b>Rho</b>	Ras homolog
<b>ROCK</b>	Kinase associée à Rho
<b>Scrib</b>	Scribbled
<b>Shh</b>	Sonic Hedgehog
<b>slb</b>	Silberblick, Wnt11
<b>SNP</b>	Polymorphisme d'un nucléotide simple
<b>stan/fmi</b>	Starry night/Flamingo
<b>Tbx</b>	T-box transcription factor
<b>TCF</b>	T-cell factor
<b>Vang/Stbm</b>	Van gogh/Strabismus

**VANGL**            Vang-like

**Wnt**              Wingless

**$\beta$ cat**             $\beta$ -caténine



*Aux patients atteints d'Anomalies du Tube  
Neural et à leur famille.*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr. Zoha Kibar pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir transmis une partie de sa passion pour la recherche fondamentale ainsi que pour tout le support scientifique.

Je remercie tous les membres du laboratoire Kibar et spécialement Marie-Claude Guyot, Stéphanie Lachance, Mingqin Wang et Corinne St-Denis pour leur aide essentielle au parcours et à la réussite de ce projet.

Je remercie notre collaboratrice Monica Justice pour nous avoir fourni la souris *Skax*<sup>26m1Jus</sup> ainsi que notre collaboratrice Valeria Capra pour nous avoir fourni de l'ADN sur une cohorte de patients atteints d'ATN.

Je remercie mes bien-aimés frères et sœurs ainsi que mes ami(e)s de faire partie de ma vie, pour leurs encouragements et support moral. Je gratifie principalement mes très chers parents, Rabha et Haddou, qui m'ont toujours encouragé dans mes décisions et mon parcours d'études universitaires.

Je remercie aussi ma femme pour son grand soutien, surtout durant la rédaction. Je tiens à souligner la naissance spéciale de mon premier garçon, Anir (Ange), le 29 septembre 2014, lors de la préparation de ma défense de thèse.

Finalement, je remercie les patients et leurs familles pour leur générosité.

# **1. Introduction**

## **1.1. Définition**

Les anomalies du tube neural (ATN) représentent le groupe le plus commun et le plus sévère des anomalies du système nerveux central. Après les malformations cardiaques, les ATN arrivent en deuxième position en fréquence (4,261). Elles sont associées à une mortalité périnatale touchant 1-2 enfant(s) par 1000 naissances. Elles sont causées par un défaut de fermeture du tube neural partielle ou complète au cours des premières étapes de la vie embryonnaire et peuvent avoir lieu tout au long de l'axe rostrocaudal (4, 261, 282).

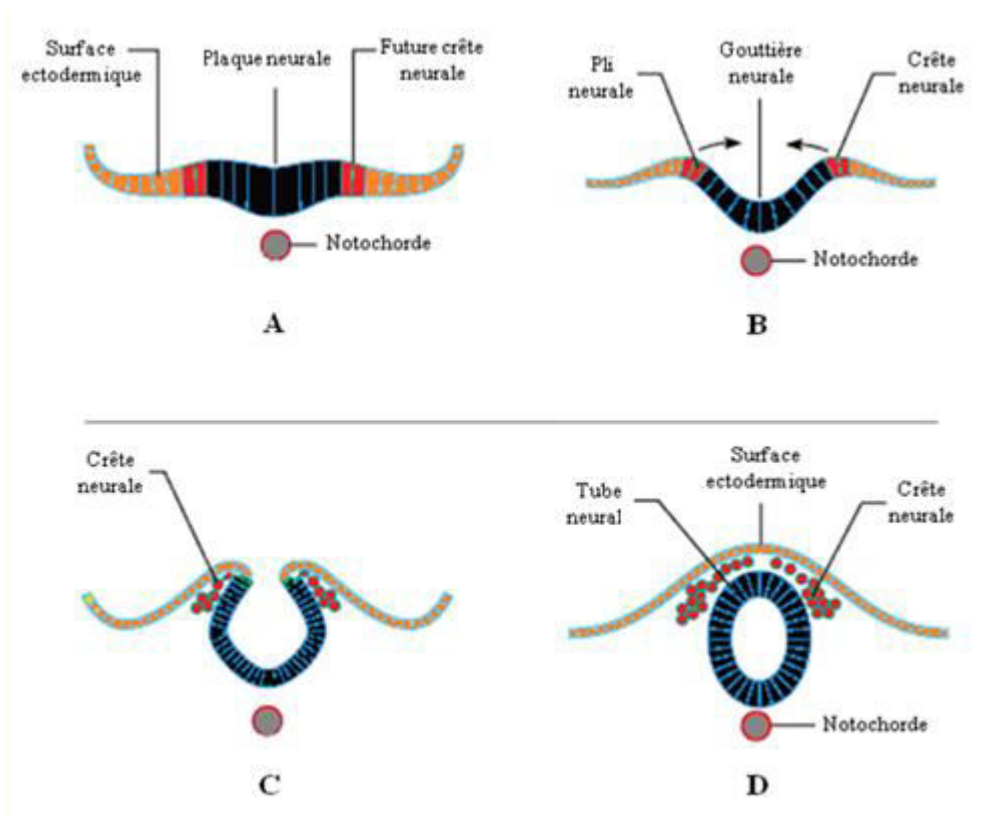
## **1.2. Développement embryonnaire du système nerveux central**

La formation du système nerveux central commence très tôt durant le développement de l'embryon. À la fin de la gastrulation qui s'achève avec la formation des 3 épithéliums embryonniques (ectoderme primitif ou l'épiblaste, le mésoderme et l'endoderme), la notocorde se met en place (1). L'embryon, en forme circulaire, va prendre une structure allongée, étape primordiale pour la suite du développement du système nerveux. Le signal envoyé par la notocorde vers l'ectoderme va déclencher la formation de la plaque neurale qui est la première structure à l'origine du système nerveux et le début du processus développemental aussi appelé neurulation (1).

La suite de la neurulation continue avec le repliement vers l'intérieur des bords de la plaque neurale, formant ainsi la gouttière neurale. Celle-ci va alors se refermer complètement pour finalement former le tube neural à partir duquel se construira la totalité du cerveau et de la moelle épinière (2).

### 1.2.1. La neurulation

La neurulation chez l'humain représente un processus morphogénétique fondamental qui aboutit au développement du tube neural (cerveau et moelle épinière). Ce processus se déroule en deux phases qui ont lieu à des niveaux distincts au long de l'axe rostrocaudal de l'embryon : la neurulation primaire (semaines 3-4), responsable de la formation du cerveau et de la plupart de la moelle épinière, suivie par la neurulation secondaire (semaines 5-6) qui est limitée au niveau de la partie terminale, incluant le bourgeon de la queue, qui sera à l'origine de la partie caudale du tube neural et de l'élongation de la moelle épinière (3).



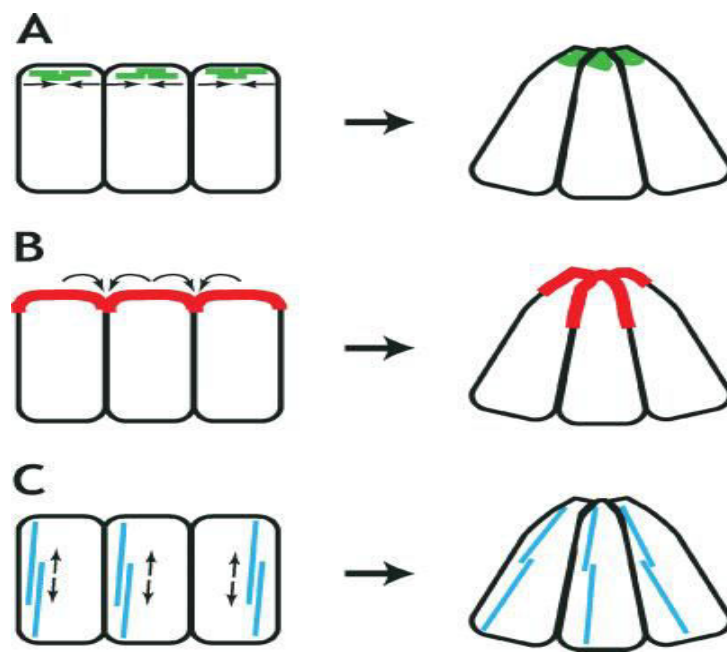
**Figure 1.** Représentations schématisées des étapes de fermeture de tube neural. La plaque neurale se forme (A), suivie par l'élévation de ses bords avec la formation des plis neurales (B). Ensuite le tube neural prend forme par le pliage de la plaque neurale autour de la gouttière neurale (C) et se ferme (D).

### 1.2.1.1. Neurulation primaire

Au cours de la troisième semaine de gestation, le développement du système nerveux s'amorce avec l'épaississement de l'ectoderme et par conséquent l'apparition de la plaque neurale (figure 1A). Celle-ci s'invagine ensuite en sillon neural puis les bords de la plaque neurale s'élèvent, formant des plis neuraux qui délimitent une dépression, la gouttière neurale (Figure 1B). Au fil du développement, ces structures se rapprochent en s'allongeant et se fusionnent, constituant ainsi le tube neural (Figure 1C-D). Pendant la neurulation primaire, les cellules de l'ectoderme se divisent en deux couches de tissus parallèles. Une qui donnera naissance aux structures du SNC à l'intérieur du tube neural et l'autre formera la peau à l'extérieur (4, 5). Une troisième masse de tissu, la crête neurale, émerge de ces cellules ectodermiques de la partie dorsale, tout au long de ce tube. Celle-ci est à l'origine des nerfs spinaux, des ganglions spinaux, des nerfs crâniens, des ganglions des nerfs crâniens, des médullas surrénales, des ganglions du système nerveux autonome et des méninges ainsi que de certains cartilages et os du crâne (6). À partir de la paroi interne du tube neural, trois couches de cellules se différencient. Celles de la couche superficielle, appelée couche marginale, sont à l'origine de la substance blanche du système nerveux, celles de la couche intermédiaire ou zone du manteau forment la substance grise et celles de la couche profonde, nommée couche épendymaire, forment le revêtement du canal central de la moelle épinière et des ventricules cérébraux. L'interaction entre la notocorde et l'ectoderme qui la recouvre induit la formation du neuroectoderme (4). À ce stade, les protéines morphogénétiques osseuses (BMP : Bone Morphogenetic Proteins), qui stimulent la formation de l'épiderme et inhibent en même temps la formation du neuroectoderme, seront inactivées par certains antagonistes tels que noggin, chordin et follistatin provenant du nœud primitif (4, 5). Cela va permettre la différenciation en neuroectoderme, puis en plaque neurale. Les facteurs de croissance des fibroblastes FGF (fibroblast growth factors) et ceux des analogues à l'insuline, ainsi que la signalisation de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine, interviennent dans ce processus (5).

Une fois formée, la plaque neurale donne naissance aux plis neuraux dont l'initiation est due à la force de la constriction apicale (7). Il existe différentes théories au sujet des mécanismes de la constriction apicale (figure 2), la plus populaire est celle où la superficie

apicale se rétrécit sous l'effet d'un appareil contractile sous-membranaire localisé au niveau du domaine apical des cellules qui agit de la même façon que l'appareil contractile des myocytes. En effet, les régions apicales des cellules de l'épithélium neuronal sont enrichies en actine (7). Également, les embryons de souris traités au cytochalasine D (inhibiteur des microfilaments d'actine) démontrent une inhibition de la fermeture des plis neuraux craniaux(8), effet similaire observé en réponse à la perte de fonction des différentes protéines associées aux filaments d'actine, incluant *p190RhoGAP*, *vinculin*, *shroom* et *Mena/profilin* (9).



**Figure 2.** Mécanismes de la constriction apicale. A: Le repli d'un appareil contractile apical (vert) transforme les cellules cylindriques en cellules coniques. B: L'adhérence croissante entre les surfaces apicales des cellules (rouge) augmentera leur superficie de contact et par conséquent, un rétrécissement de leur extrémité apicale. C: L'augmentation de la hauteur des cellules, probablement par un appareil à base de microtubules (bleu), pourrait également donner la forme conique des cellules. Tiré de : Wallingford JB, 2005 (7)

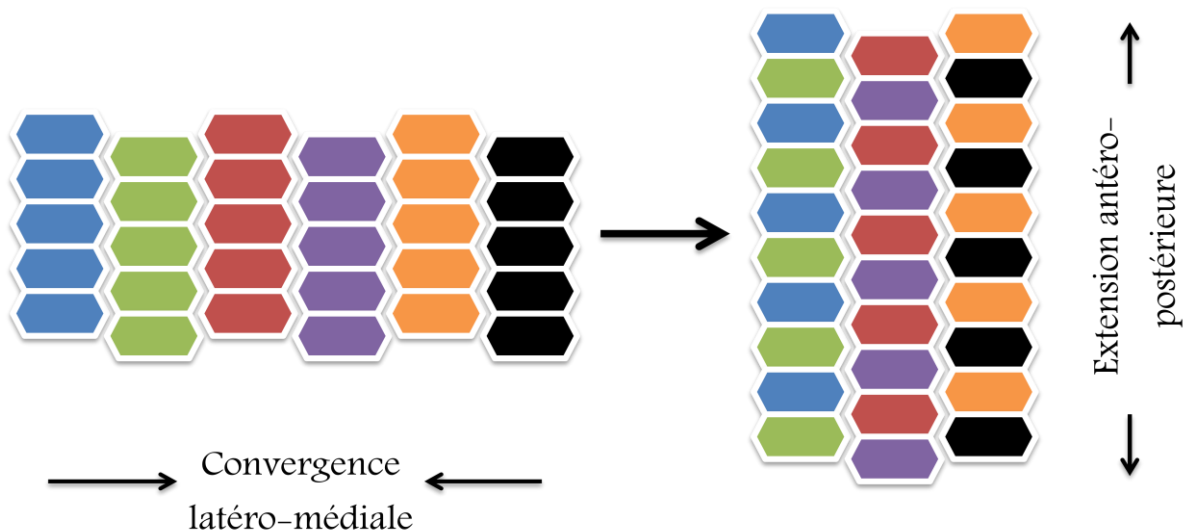
D'autres explications concernant les mécanismes de la constriction apicale supposent l'implication soit d'une augmentation de l'adhérence intercellulaire au sein de la région

apicale, soit d'une augmentation de la hauteur des cellules avec un volume et une superficie basale constante (7).

Les cellules apicales vont par la suite se contracter, s'allonger et prendre la forme cylindrique. Ces changements de morphologie sont sous le contrôle d'un phénomène morphogénétique appelé extension convergente (CE) (7). Pendant ce processus complexe, les cellules polarisées de la plaque neurale s'allongent sur leur axe médiolatéral et produisent des protrusions cellulaires qui leur permettent de migrer et s'intercaler par la suite avec les cellules avoisinantes (Figure 3). Cela a pour effet de permettre la convergence du tissu vers la ligne médiane et l'allongement sur l'axe antéro-postérieur et donc de créer un axe allongé et une largeur plus étroite de la plaque neurale. La CE est sous le contrôle de la voie de signalisation non canonique du Wnt/Frizzled (Wnt/Fz), aussi appelée la voie de la polarité planaire cellulaire (PCP, planar cell polarity) qui sera décrite plus tard dans la section (1.6 *PCP*).

L'ensemble de ces changements morphologiques dans la plaque neurale induit la formation des plis neuraux initiés avec la création, au niveau de deux sites, de points d'articulation: une paire de points dorsolatérales (charnières dorsolatérales) située latéralement sur les plis neuraux, principalement au niveau du futur cerveau et le point médian (charnière médiane) localisé au niveau de l'axe rostrocaudal au-dessus de la notocorde (Figure 1).

Les signaux inducteurs (protéine Sonic hedgehog (Shh)) provenant de la notocorde sont nécessaires pour la formation du pli médian au niveau de la région spinale proximale (10). La signalisation par BMP est aussi fortement impliquée dans la régulation des changements morphologiques et la polarité cellulaire au niveau de l'épithélium du futur tube neural (11).



**Figure 3.** Diagramme représentatif du mécanisme morphogénétique d’extension convergente. Les cellules s’allongent sur l’axe médiolatéral, génèrent une protrusion et ensuite convergent pour s’intercaler. Ce qui permet une extension sur l’axe antéro-postérieur de la plaque neurale.

C’est au niveau spinal distal et crânien que les plis dorsolatérales prennent forme. L’équilibre existant entre la signalisation par Sonic hedgehog (Shh) et celle par *Bmp2* assure le contrôle de l’extension axiale de ces plis. Cela a été bien documenté chez les souris (10). L’expression, par l’ectoderme dorsal, du *Bmp2* amorce partout au niveau de l’axe antéro-postérieur embryonnaire la transcription de *Noggin*. *Bmp2* étant un inhibiteur de la formation des points d’articulation dorsolatérales, exprimé par l’ectoderme dorsal, stimule la transcription des *Noggin* à tous les niveaux de l’axe. Ces derniers, en possédant un effet rétro-inhibiteur sur les *Bmp2*, favorisent la formation de ces plis (10, 12).

Contrairement au *Bmp2*, les *Shh* exprimés largement par la notocorde dans la région spinale proximale inhibent l’expression de *Noggin* et, de ce fait, répriment la formation des plis dorsolatéraux (13). Une fois que les différents points d’articulation sont en place, la plaque neurale pivote autour du point médian et, par convergence, autour des points dorsolatéraux. La fermeture du tube neural se produit à certains sites spécifiques (Figure 4).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l’adhésion et/ou de la fusion des plis neuraux restent largement inconnus. Les cellules des deux plis neuraux entrent

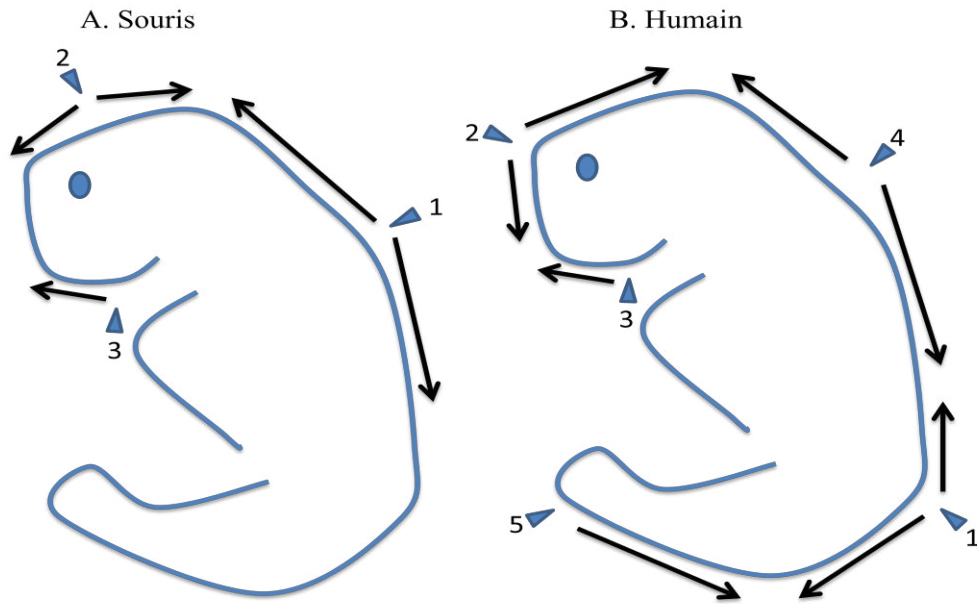


en contact sur la ligne médiane dorsale en s'approchant et se fusionnent en s'intercalant (Figure 1) (14). Il existe une succession d'événements bien documentée sur la fusion, y compris celle du neuroépithélium, de l'ectoderme de surface, de la séparation du neuroépithélium de l'ectoderme de surface et de la séparation de l'ectoderme fusionné du tube neural, de la différenciation et de la migration des cellules des crêtes neurales entre ces structures ainsi qu'un remodelage approfondi de la matrice extracellulaire (15). Le contact cellule-cellule est primordial pour initier la fermeture du tube neural. Durant le rapprochement des plis neuraux, des protrusions cellulaires prennent forme à partir des cellules apicales, ce qui permet la formation d'un contact cellulaire permanent (14) contrôlé par des récepteurs activés par les protéases (Protease Activated Receptors - PAR) Par1 et Par2 et les récepteurs des tyrosines-kinase Eph.

La succession des événements morphogénétiques de la fermeture du tube neural pendant la neurulation primaire a été bien étudiée chez la souris (Figure 4). Elle est entamée à la limite entre le rhombencéphale et la région cervicale au stade de six somites (point de fermeture 1) et progresse vers les régions du futur cerveau et les régions spinales.

Le cerveau se referme à deux points : un localisé à la jonction du prosencéphale avec le mésencéphale (point de fermeture 2) et l'autre à l'extrémité rostrale du prosencéphale (point de fermeture 3). Par la suite, la fermeture entre les points d'initiation 2 et 3 progresse autant du côté antérieur que postérieur afin de compléter la neurulation crânienne tandis qu'au niveau caudal la fermeture à partir du point 1 va se terminer par la fermeture du neuropore postérieur marquant ainsi que l'achèvement de la neurulation primaire (16) (Figure 4).

Un quatrième point de fermeture du tube neural a été identifié à l'extrémité postérieure (17) (1989 Y. Sakai). Il existe une variation de la location des différents points de fermeture d'une souche à l'autre (18). Un modèle de 5 points de fermeture a été proposé chez l'humain (19, 20) et confirmé plus tard par le groupe Seller(20). Au niveau du mésencéphale (point 1), prosencéphale (point 2), neuropore antérieur (point 3), mésencéphale (point 4) et le neuropore postérieur (point 5) (figure 4).



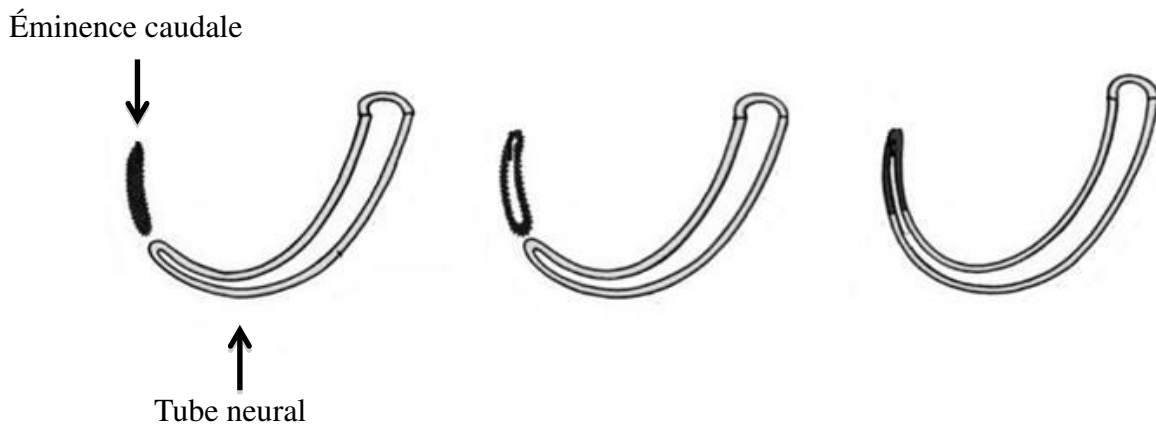
**Figure 4.** Schéma des différents points d'initiation de fermeture du tube neural chez A) la souris et B) l'humain.

### 1.2.1.2. Neurulation secondaire

Directement après la fermeture du tube neurale, entre la 5<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire chez l'humain, la neurulation secondaire commence. Cette étape, par opposition à la neurulation primaire, porte sur le développement de la partie terminale de la moelle épinière. La ligne primitive, avant sa disparition, produit une structure mésoblastique appelée éminence caudale. Cette structure canalisée est à l'origine de la partie caudale du tube neural ainsi que l'élongation de la moelle épinière. Pendant que le tube neural primaire achève sa fermeture, le tube neural secondaire se forme par invagination caudale de la plaque neurale. Cela va engendrer l'éminence caudale qui s'unit au canal neural après sa canalisation (21) (Figure 5).

C'est l'étape pendant laquelle le neuroectoderme et certaines cellules de l'endoderme donneront naissance à l'extrémité caudale, les cellules du mésenchyme. Ces derniers vont former le cordon médullaire (substance blanche à l'intérieur de la moelle épinière) (4, 21). Il renfermera plus tard les faisceaux de neurones moteurs et sensitifs descendants et ascendants.

Le cordon initialement plein se creuse d'une lumière, s'unit au canal neural et sera finalement recouvert par le neuroépithélium (Figure 5). Cette canalisation marque la formation de la queue chez les mammifères (22). Bien que les neurulations primaire et secondaire aient une morphogénèse distincte, les deux se retrouvent sous le contrôle des mécanismes cellulaires et moléculaires similaires (21)



**Figure 5.** Schéma représentatif des étapes de la neurulation secondaire. L'éminence caudale subit un processus de canalisation et se lie au canal neural engendrant le tube neural sacrocaudal.

### **1.3. Les Anomalies du tube neural (ATN)**

#### **1.3.1. Les différentes formes cliniques des ATN**

Tout événement anormal qui survient durant les différents processus de fermeture du tube neural est capable d'arrêter la différenciation cellulaire de celui-ci. Il existe une classification des ATN dépendamment si le tissu neural est exposé à l'extérieur (forme ouverte) ou s'il est recouvert par la peau (forme fermée). Il existe à ce jour plusieurs modèles de classification, mais le plus utilisé est celui proposé en 2003 par Rasmussen. Ce dernier tient compte du type de lésion anatomique (23).

### **1.3.1.1. Les ATN ouvertes**

Les formes cliniques ouvertes des ATN sont celles les plus fréquentes. Dépendamment de la région affectée au niveau du tube neural, on peut les subdiviser en deux principales formes : crâniale ou spinale.

#### **1.3.1.1.1. Les ATN ouvertes crânielles**

**L'anencéphalie** résulte d'un défaut de fermeture du tube neural crânial au niveau du point de fermeture 2 (Figure4). Cette déficience entraîne l'acranie, qui est aussi appelée exencéphalie, car l'embryon affecté, s'il est avorté avant la naissance, serait retrouvé avec un encéphale à l'extérieur de la boîte crânienne (22). Étant donné que le tissu cérébral reste exposé au liquide amniotique plus longtemps, il sera dégradé à la naissance et par conséquent générera une anencéphalie (24). Les enfants nés avec cette malformation viennent au monde avec un cervelet, un tronc cérébral et une moelle épinière intacte, mais le crâne est incomplet et l'encéphale est absent (25). Cette condition est létale et les enfants atteints n'arrivent pas à survivre plus que quelques heures après l'accouchement (26).

**Le céphalocèle** est un dommage sous forme d'une herniation au niveau du cerveau et des méninges provoquée par un défaut de la voûte crânienne. Le terme renferme plusieurs aspects d'anomalies à savoir l'encéphalocèle et la méningocèle crâniale. Ces lésions sont localisées au niveau occipital, pariétal ou antérieur de la tête et peuvent soit être visibles ou cachées avec la peau (27).

**Le craniorachischisis** est la forme la plus grave et relativement la plus rare des ATN. Elle se produit à la suite d'un échec de fermeture du tube neural sur toute sa longueur (26). Plus précisément, le défaut a lieu au niveau du point de fermeture 1 (Figure 4) qui entraînera la formation des plis neuraxiaux normaux qui resteront éloignés les uns des autres, condamnant ainsi leur fusion conforme (28).

### **1.3.1.1.2. Les ATN ouvertes spinales ou les myélodysraphies**

**Lamyéломéningocèle** est la forme clinique la plus fréquente des ATN spinales ouvertes. Elle est définie comme herniation des méninges, de la moelle épinière et/ou des nerfs hors de leur enveloppe osseuse naturelle. C'est le résultat d'une perturbation de la neurulation primaire associée à un défaut osseux de la colonne vertébrale (26, 29). Le côté dorsal du placode neural reste complètement exposé à l'extérieur. La gravité de cette anomalie dépend des dommages nerveux et de sa localisation.

**Lamyélocèle** a une fréquence plus rare que lamyéломéningocèle et se distingue de celle-ci par la non-expansion des espaces sous-arachnoïdiens. Ce désordre affecte la bonne position de la placode neurale qui n'arrive pas à dépasser le tissu cutané, restant alors découverte.

### **1.3.1.2. Les ATN fermées**

Distinctement aux ATN ouverts, les formes fermées possèdent un tissu neural recouvert par la peau. Leur classement en deux catégories est basé sur la présence ou non d'une masse sous-cutanée. Les formes avec cette masse comprennent les lipomyeloschisis, les lipomyéломéningocèles, les méningocèles et les myélocystocèles, alors que celles qui n'ont pas de masse sous-cutanée comprennent l'agénésie sacrée, le sinus dermique, les dysraphismes complexes (diastématomyélie) et la dysgénésie spinale segmentaire.

#### **1.3.1.2.1. ATN fermées avec une masse sous-cutanée**

**Lelipomyeloschisis** : Les lipomes sont des malformations qui se produisent pendant le déroulement de la neurulation primaire (30). Ils sont le résultat d'une disjonction focale du neuroectoderme et l'ectoderme. Cela va engendrer l'accès du mésenchyme dans le tube neural et par la suite, la formation d'un dépôt de tissu adipeux. Dans le cas des lipomyeloschisis, le défaut se produit au niveau vertébral dorsal, plus souvent lombo-sacré couvert par un lipome sous-cutané accompagné avec une fissuration dorsale de la moelle épinière (31).

**Lalipomyéломéningocèle** est une sorte de lipomyeloschisis pendant laquelle la placode, l'arachnoïde, la dure-mère et la moelle subissent une herniation postérieure provoquée par leur expansion hors limite anatomique du canal central. Souvent, le lien existant entre la placode et le canal rachidien est rompu (32).

**Laméningocèle**, comme la myéломéningocèle, affecte la partie postérieure du tube neural par une protubérance des méninges et en présence du tissu nerveux à travers les os de la colonne vertébrale (22, 25). Cette anomalie est considérée mineure et majoritairement asymptomatique (22).

**La myélocystocèle**, très rarement rencontrée, décrit une formation de kystes causés par une dilatation de la partie caudale du canal central (33).

### **1.3.1.2.2. ATN fermées sans masse sous-cutanée**

**Lesinus dermique** est un petit sillon bordé par l'épithélium partant de la surface de la peau et allant jusqu'à la colonne vertébrale. Il représente une sorte de communication entre les téguments et la dure-mère ou la moelle épinière et résulte d'un attachement anormal du tube neural au derme. Il se manifeste souvent dans la région cervicale, occipitale et thoracique (34), cependant, on peut le retrouver sur la ligne médiane à tous les niveaux de l'axe neural. (30).

**Diastématomyélie** ou (*split cord malformation* : SCM) est une malformation rachidienne rare qui se caractérise par la duplication, dans le plan sagittal, de la moelle épinière en deux hémimoelles. Ces dernières sont séparées par un éperon osseux ou médian fibreux. Il existe deux types de diastématomyélie dépendamment de l'emplacement des deux hémimoelles. Le type I où chacune d'elles se trouve dans un sac dural propre et le type II où elles sont placées dans un sac unique. Les SCM peuvent survenir de façon isolée ou s'associer à d'autres malformations squelettiques, médullaires ou encore à des téguments (35, 36)

**L'agénésie sacrée.** Elle représente un groupe de malformations congénitales rares des segments inférieurs de la colonne vertébrale associé à des anomalies du rachis lombaire sus-jacent, des paralysies des membres inférieurs, des troubles fonctionnels et des malformations urogénitales et anorectales (37). Elle désigne un arrêt partiel ou total du développement

du sacrum lors de la vie embryonnaire et une agénésie des vertèbres sacrées et coccygiennes avec un raccourcissement du fémur. Son étiologie est hétérogène et elle est particulièrement fréquente en cas de diabète maternel (37).

**Ladysgénésie spinale segmentaire.** La colonne vertébrale lombaire outhoracolombaire subit soit une agénésie ou une dysgénésie, accompagnée de défaut de développement touchant de la moelle et les racines des nerfs spinaux sous-jacents. Les patients souffrent de malformations congénitales des membres inférieurs ainsi que de certains cas de paraplégie ou paraparésie (38).

### 1.3.2. Diagnostic des ATN

Le diagnostic prénatal des ATN est rendu possible grâce au développement des tests de dépistage offerts aux femmes enceintes incluant l'échographie fœtale, l'amniocentèse et la détection des marqueurs sériques maternels.

**L'échographie fœtale** est une technique de dépistage qui fait appel aux ultrasons pour permettre de visualiser les tissus et les organes. L'examen peut être réalisé dès le premier trimestre, mais l'évaluation optimale de la morphologie fœtale n'est possible qu'au second trimestre et de préférence vers la 18<sup>ème</sup> semaine de gestation.

**L'amniocentèse**, ou le prélèvement de liquide amniotique, peut être réalisé vers la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation, mais elle est favorisée entre la 14<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> semaine. Avec cette technique, l'alpha-1 foetoprotéine sérique (AFP) ou l'acétylcholinestérase peuvent être détectables dans le liquide amniotique chez les femmes dont l'embryon présente une ATN ouverte (22). Ces deux marqueurs sont sécrétés dans le liquide amniotique qui est en contact direct avec les différentes structures du tube neural en défaut de fermeture. (39, 40).

**Les marqueurs sériques maternels** sont des protéines en circulation chez la femme enceinte et dont le dosage permet un dépistage efficace de certains types de pathologies fœtales en début de grossesse. L'efficacité de ce test est optimale s'il est jumelé simultanément à l'échographie fœtale. L'alpha-1 foeto protéine (AFP) représente 20% de ces protéines. Une hausse du niveau de l'AFP dans le liquide amniotique s'exprime par filtration dans le sérum

maternel et marque la présence d'une lésion d'ouverture du tube neural chez l'embryon (39). Aussi, l'homocystéine en augmentation peut être considérée comme un facteur associé aux ATN (41).

### **1.3.3. Étiologie**

Les malformations du tube neural possèdent une étiologie complexe et multifactorielle impliquant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux qui restent largement inconnus (42).

#### **1.3.3.1. Facteurs environnementaux**

L'acide folique (ou vitamine B<sub>9</sub>) représente le facteur environnemental le plus fortement associé aux ATN. Avec son effet protecteur, il permet de prévenir jusqu'à 70 % d'incidence d'ATN (43, 44). L'acide folique en forme active (dihydrofolique ou tétrahydrofolique) se comporte comme accepteur de radicaux méthyl de certains acides aminés (glycine, histidine et la serine) et donneur pour la synthèse de la thymine, les purines (adénine, guanine) ainsi que la méthionine par l'intermédiaire de la vitamine B<sub>12</sub>. Ce processus, à travers son rôle dans la méthylation d'ADN, est primordial pour la régulation de l'expression d'ADN, de lipides et de protéines (43). Plusieurs études ont été menées concernant l'effet potentiel ainsi que la fonction de l'acide folique, mais les mécanismes exacts qui expliquent comment une carence en B<sub>9</sub> peut causer des ATN restent inexplicables (4). Des études extensives étaient conduites sur les différents gènes reliés à l'acide folique incluant ceux qui affectent son absorption, son transport ou son métabolisme et qui peuvent avoir un lien de causalité avec la pathogenèse des ATN.

La membrane placentaire contient des récepteurs spécifiques pour les folates et il a été démontré que jusqu'à 70 % des femmes dont l'enfant est affecté par les ATN produisent des anticorps capables de se lier aux récepteurs des folates et donc d'empêcher la liaison de ces derniers. Dans ce cas, la supplémentation en acide folique pourrait avoir un effet bénéfique en augmentant son apport intracellulaire par d'autres voies alternatives ou tout simplement par compétition avec ces anticorps dans le but de restaurer l'état normal (45). Cependant, une



autre étude menée chez des patients irlandais n'avait identifié aucune association entre les ATN et la présence d'un anticorps qui bloquerait la liaison des folates à leurs récepteurs (46). Une autre étude s'est penchée sur le rôle des antagonistes des folates et leur effet tératogène dans les ATN. Le fumonisin (agent antifongique) et la carbamazépine (médicament anticonvulsivant) réduisent l'apport intracellulaire en acide folique tandis que la carence en vitamine B12 ainsi que l'antibiotique triméthoprim préviennent son métabolisme (13, 47). En parallèle, un autre groupe a étudié le rôle de l'homocystéine dans le développement des ATN et a réussi à démontrer que la dérégulation du cycle de l'homocystéine représente un facteur de risque pour développer une ATN (48).

Un groupe de recherche a testé l'effet de la prise de la vitamine l'inositol sur l'incidence des ATN chez les souris *curly tail* qui représentent un modèle résistant à l'acide folique. Ils ont trouvé que la myo-inositol est capable de réduire de façon significative cette incidence chez ces souris et ils ont conclu qu'une possible supplémentation en inositol combinée à l'acide folique pouvait empêcher la grande majorité des ATN humaines (13, 49). Il faut mentionner, principalement au niveau de la région caudale du tube neural, que le rôle de l'inositol est de stimuler le cycle des lipides via la protéine kinase C (PKC) et de modifier l'expression du récepteur de l'acide rétinoïque (AR). L'implication de l'AR dans les ATN a été vérifiée par une étude chez les mêmes souris mutantes et a démontrée l'effet préventif de cet acide (50, 51).

D'autres éléments environnementaux comme l'acide valporique, l'obésité maternelle, la cigarette et l'alcool ont été impliqués dans l'étiologie des ATN (42, 53-55). Chez les embryons de poulet, il a été prouvé que l'effet tératogène de l'acide valporique (AVP) ou (vitamine A) dans les ATN peut être contré par l'acide folique (52). Aussi, un trouble dans la régulation de la glycémie durant la grossesse ainsi qu'une hyperglycémie mal contrôlée de la mère souffrant de diabète, peuvent être à l'origine d'un risque plus élevé d'ATN (13). Cette augmentation du risque est causée par une grande mortalité cellulaire au niveau du neuroépithélium (283, 284).

### **1.3.3.2. Facteurs génétiques**

Les arguments en faveur de l'existence d'un lien avec la base génétique augmentant le risque d'ATN ont été largement documentés. La présence d'une composante génétique dans l'origine de ces anomalies congénitales est fortement appuyée par leur association à des anomalies chromosomiques les plus répandues comme l'aneuploïdie et les trisomies 13 et 18 et leur présence dans de nombreux syndromes génétiques incluant Meckel-Gruber, Currario, Bardet-Biedl, Von Voss cherstvoy et la sténose anale (28). Le risque de développer une ATN pour une deuxième grossesse des mêmes parents est significativement plus élevé de 2 à 5 %, soit de 10 à 50 fois plus élevé comparativement à la population en général (4, 18). Dans ces cas familiaux, les probabilités d'un composant génétique fort sont grandes (56). Une étude effectuée sur un groupe de famille a rapporté une distribution des ATN avec une antécédence familiale de près de 8.5 %. Dans cette répartition, peu de cas d'affection directe parent/enfants étaient rapportés, contrairement aux générations des grands-parents/enfants ou les arrière-grands-parents/parents qui présentent des ATN (18). L'héritabilité multigénique des ATN est estimée à 60 % et implique plusieurs facteurs génétiques. L'identité, le nombre et la contribution de ces gènes restent toujours inconnus (57). Les études impliquant la génétique des ATN humaines se sont penchées sur les gènes de la voie métabolique des folates et les gènes candidats identifiés chez des souris modèles des ATN.

#### **1.3.3.2.1. Gènes de la voie métabolique des folates chez les ATN humains**

Le taux élevé d'homocystéine dans le sang suite au polymorphisme c.677C>T répertorié dans le gène *5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductases (MTHFR)* est associé à des malformations du tube neural (58, 59). *MTHFR* est considéré comme cofacteur de risque pour les ATN (60) étant donné son rôle de régulateur des niveaux de folates qui servent à méthyler l'homocystéine (270). En effet, dans le cycle de l'acide folique, la présence de flavine adénine dinucléotide (FAD) et de *MTHFR* catalysent la conversion du 5, 10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate (5-MeTHF). À part son rôle en tant que substrat de la *MTHFR*, le 5,10-méthylèneTHF joue également un rôle dans la synthèse du thymidylate et des purines par

conversion de 5,10-méthylèneTHF en 5,10-méthénylTHF et 10 formylTHF. La perte de l'unité monocarbone convertit ces folates substitués en THF, qui est finalement recyclé en 5,10-méthylèneTHF par la conversion de la sérine en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). Ceci explique l'effet régulateur qu'exercent la MTHFR et la méthionine synthase (MTR) pour diriger les folates réduits vers la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine ou vers une synthèse d'ADN et d'ARN (270).

Bien que que la souris mutante *knockout* pour *Mthfr* développe un taux élevé d'homocystéine, elle n'a pas développé d'ATN même en condition de manque d'acide folique (62). Une autre mutation perte de fonction, c.1298A>C dans le gène *MTHFR* a été associée à un risque plus élevé pour les ATN (61). Deux autres SNPs trouvés dans des gènes reliés à l'acide folique ont été susceptibles d'être associés aux ATN, incluant la mutation c.2756A>G un dans le gène *METHIONINE SYNTHASE* dont le rôle est de catalyser la réaction de transfert vers l'homocystéine du groupement méthyle du 5-MeTHF, générant ainsi le THF, la méthionine (63) et la mutation c.66A>G dans le gène *METHIONINE SYNTHETASE REDUCTASE* (64) impliqué, dépendamment de NADPH, dans l'activation de la méthionine synthase. Des études respectives sur des souris transgéniques *knockout* (total ou partiel) sur ces deux gènes n'ont pas permis de démontrer une association aux ATN (66, 67).

Une étude récente effectuée sur une cohorte de 180 patients et 190 contrôles, visant 50 gènes en liaison avec le métabolisme des folates, a démontré une forte association entre les gènes *Culbilin* (*CUBN*) et *tRNA Aspartic Acid Methyltransferase 1* (*TRDMT1*) et un faible risque de spina bifida. Cet effet protecteur a été relié à un niveau élevé de vitamine B12 et de folates des globules rouges. Aucune mutation faux-sens ou perte de fonction n'a été identifiée (65). D'autres études sont nécessaires pour mieux définir la nature et l'ampleur de l'interaction entre les variantes des gènes du cycle des folates et les facteurs nutritifs dans la modulation de l'incidence et la pénétrance des phénotypes liés aux ATN.

### **1.3.3.2.2. Gènes identifiés chez des souris modèles des ATN**

Compte tenu de leur similarité sur le point de vue neurulation avec l'humain, une banque de données de plus de 240 souris mutantes qui présentent des phénotypes d'ATN a été

générée à la suite de plusieurs études d'importance remarquable afin d'aboutir vers une meilleure compréhension de ces malformations congénitales (68). De plus, les phénotypes de ces animaux modèles couvrent pratiquement toutes les principales formes d'ATN chez l'humain incluant la craniorachischisis, l'anencéphalie et la spina bifida aperta (ou myelomeningocèle) (13). Cette richesse de résultats procurés des modèles murins a mené à l'identification des différents facteurs qui influencent le développement du tube neural. Du côté des protéines identifiées, avec un rôle dans les ATN, figurent celles de la transduction du signal (Kinases Jun et la Kinase C riche), des protéines du cytosquelette (Palladin, Shroom, Mena et Vinculin), des protéines de la différenciation neuronale (Paired box 3 et Neurofibromine 1), des protéines avec un rôle dans l'apoptose (les Kinases I $\kappa$ B 1 et 2 et B cell lymphoma/leukemia-10), des protéines du cycle cellulaire (régulateur de l'Actine 4 et Phosphatase) et des protéines d'interactions surface cellulaire/matrice extracellulaire (Laminin) (13, 69-72). Du côté des voies de signalisation impliquées dans les ATN chez la souris, on trouve celle de Sonic hedgehog (Shh), Notch, les protéines morphogénétiques osseuses (Bmp) et la voie de la polarité planaire cellulaire (PCP, voie non canonique du *Frizzled/Dishevelled*) (74, 75). Cette dernière sera présentée plus en détail dans les sections 1.5.4 et 1.6.

### **1.3.3.2.3. Étude de gènes homologues et/ou orthologues, identifiés préalablement chez la souris, chez les patients d'ATN**

La grande similarité qui existe entre le génome de la souris et de l'humain ainsi que les différents processus de neurulation chez ces deux organismes ont permis d'identifier, chez l'humain, le rôle important des gènes homologues et/ou orthologues de ceux déjà identifiés préalablement chez certaines souris mutantes en lien avec les ATN (311). La liste dans le Tableau 1 résume ces gènes candidats dérivés des études chez les animaux modèles et qui étaient associés avec les ATN humaines.

Gènes	Résumé des résultats	Références
-------	----------------------	------------

<p><b>PAX</b> : un facteur de transcription impliqué dans la spécification des structures dérivées de la crête neurale.</p>	<p><b>PAX-1</b> : identification d'une mutation faux-sens et une association significative avec un marqueur flanquant.</p>	<p>(291, 292)</p>
	<p><b>PAX-3</b> : identification d'une délétion de 5-pb conduisant a un changement de cadre de lecture et un haplotype associé à un risque élevé d'ATN.</p>	<p>(293, 294)</p>
	<p><b>PAX-7</b> : une association significative avec un marqueur intronique.</p>	<p>(292)</p>
	<p><b>PAX-8</b> : une association significative avec un marqueur intronique.</p>	<p>(292)</p>
<p><b>NCAMI</b> : une molécule d'adhésion des cellules neuronales impliquées dans la fusion du tube neural.</p>	<p>Une association significative avec un SNP intronique.</p>	<p>(290)</p>
<p><b>MSX2</b> : un facteur de transcription induit par l'acide rétinoïque durant la neurulation.</p>	<p>Identification d'une délétion d'un exon.</p>	<p>(289)</p>
<p><b>PDGFRA</b> : un récepteur alpha pour le facteur de croissance dérivé des plaquettes, un mitogène puissant impliqué dans la morphologie et la</p>	<p>Des combinaisons spécifiques d'haplotypes promoteurs avec des preuves qui appuient une éventuelle association</p>	<p>(295-297)</p>

migration cellulaire.		
<b><i>ALDH1A2</i> : aldéhyde déshydrogénase requis pour la synthèse de l'acide rétinoïque durant la structuration du tube neural</b>	Une association significative avec trois SNPs.	(287)
<b><i>CYP26A1</i> : un enzyme de cytochrome, P450, impliquée dans le métabolisme de l'acide rétinoïque au cours de la structuration du tube neural</b>	Identification d'une mutation qui cause un décalage de cadre de lecture.	(287, 288)
<b><i>PRKACA</i> : une sous-unité catalytique de la protéine kinase A, régulatrice de la signalisation SHH.</b>	Identification d'une mutation faux-sens	(298)
<b><i>SLUG</i> : facteur de transcription impliqué dans la dorsalisation du tube neural.</b>	Identification d'une mutation faux-sens dans un cas affecté dont le père et non-affecté.	(299)
<b><i>ZIC2</i> : facteur de transcription régulateur de l'activité de SHH.</b>	Identification une délétion d'un acide aminé (alanine)	(304)
<b><i>Tbox (Brachyury)</i>: facteur de transcription essentiel pour la formation du mésoderme et le développement axial.</b>	Identification d'une mutation dans l'intron 7 et des évidences pour une association.	(300, 301)

<b><i>VANGL1</i> : gène de la voie PCP qui est impliqué dans la médiation de CE.</b>	<b>Identification de trois rares et nouvelles mutations faux-sens incluant une qui affecte l'interaction avec un autre membre de la voie PCP (DVL), 5 autres faux-sens mutations identifiées dans une autre étude.</b>	<b>(302, 303, 306)</b>
<b><i>VANGL2</i> : gène de la voie PCP impliqué dans la CE</b>	<b>Identification de 6 nouvelles et rares mutations faux-sens dans une cohorte de patients ATN.</b>	<b>(305)</b>
<b><i>CELSRI</i> : gène de la voie PCP impliqué dans la CE</b>	<b>Identification d'une mutation tronquante et une délétion et 13 mutations faux sens dans une cohorte de patients ATN.</b>	<b>(306)</b>
<b><i>SCRIB</i> : gène de la voie PCP impliqué dans la CE</b>	<b>Identification de 2 mutations faux-sens, une des deux influence la localisation cellulaire de SCRIB</b>	<b>(242)</b>
<b><i>PRICKLE1</i> : gène de la voie PCP impliqué dans la CE</b>	<b>Identification de 7 nouvelles et rares mutations faux-sens dans une cohorte de patients ATN.</b>	<b>(308)</b>
<b><i>FZ6</i> : récepteur a 7 domaines transmembranaires pour la signalisation Wnt, active la PKC.</b>	<b>5 nouvelles mutations rares causant un changement de cadre de lecture, trois mutations faux-sens ont été identifiées dans <i>FZ6</i> chez des patients atteints d'ATN</b>	<b>(309)</b>

<p><b><i>FUZZY</i></b> : gène de la voie PCP impliqué dans ciliogenèse et le mouvement directionnel des cellules.</p>	<p>5 mutations pathogéniques ont été identifiées dans une cohorte de patients ATN. Ces mutations perturbent la ciliogenèse et l'orientation des cils chez <i>mus musculus</i></p>	<p>(310)</p>
---	---	--------------

**Tableau 1** : Résume ces gènes candidats dérivés des études chez les animaux modèles et qui étaient associés avec les ATN humaines.

Malgré ces études extensives des gènes candidats dérivés de la souris modèle jusqu'à présent aucun gène majeur prédisposant aux ATN n'a été identifié.

## 1.4. Voies de signalisation Wnt

Les gènes *wingless* ont été associés dès le début à leurs rôles dans la morphogénèse chez la mouche *Drosophila melanogaster*. Le nom de cette famille est contracté de la combinaison des termes « *wingless* » (*Wg*) qui est le gène responsable de l'apparition des ailes chez la drosophile et son homologue chez les vertébrés « *integrated* » (76). Une fois liés à leur récepteur membranaire commun, *Frizzled* (*Fz*), les différents ligands Wnt déclenchent diverses cascades de réponses intracellulaires. Au moins trois principales voies de signalisation liées au Wnt/*Fz* ont été identifiées au cours des dernières années : la voie canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine, la voie non canonique menant à la libération du calcium intracellulaire et la voie non canonique de la polarité planaire cellulaire (PCP).

### 1.4.1. Les ligands Wnt

Wnt est une famille de facteurs de croissance hautement conservés, qui réunit d'importantes glycoprotéines sécrétées et riches en cystéines d'environ 350 acides aminés. Elle chapeaute le développement de tissus multicellulaires et coordonne ainsi le modelage des organes chez les vertébrés (77). Les Wnt, en plus de contrôler la destinée des cellules souches



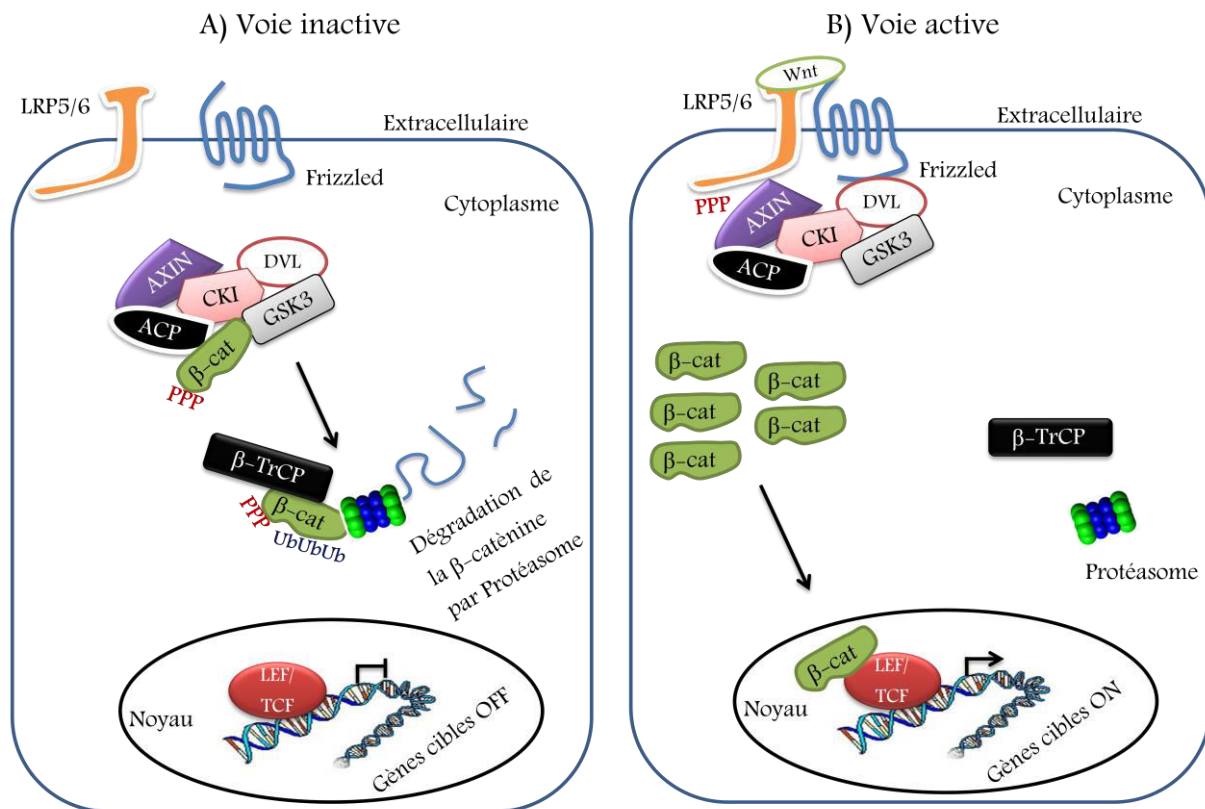
au sein de plusieurs tissus, peuvent aussi jouer un rôle régénérateur dans les cellules adultes (78, 79). Une dérégulation des processus de la signalisation Wnt cause des maladies humaines telles que les anomalies osseuses, la malformation des membres et le cancer (80). Chez les mammifères, la famille Wnt regroupe 19 gènes codants pour différents ligands WNT (81) d'environ 40 kDa de poids moléculaire (82).

Les différents Wnt possèdent des profils d'expression divers et uniques et assurent des fonctions variables au cours du développement (83, 84). Par l'action des protéines *wntless* (*wls*) et *evenness interrupted* (*evi*), et après avoir été palmitoylées par Porcupine dans le réticulum endoplasmique, ces lipides sont sécrétés dans la matrice extracellulaire (85, 86). Chez les mammifères, il a été démontré que les protéines Wnt peuvent également agir en tant que morphogène durant le processus de la gastrulation (87). La majorité des gènes *Wnt* étaient inactivés par des stratégies de ciblage chez la souris causant des phénotypes développementaux plus ou moins sévères et qui touchent principalement l'axe antéro-postérieur, les systèmes urogénitaux et le développement du cerveau (88, 89). Il n'est pas étonnant d'observer des redondances fonctionnelles vu le nombre élevé des gènes *Wnt*. Par exemple, la mutation nulle double de *Wnt1* et *Wnt3a*, co-exprimée dans le tube neural dorsal en développement, entraîne des défauts importants au niveau de la crête neurale. Ces phénotypes incluent une réduction de la formation des cellules de la crête neurale qui proviennent du tube neural dorsal, un déficit marqué des dérivés de la crête neurale à la fois dans le rhombencéphale et la moelle épinière, et une réduction prononcée des précurseurs de neurones dorso-latérales dans le tube neural lui-même. Ces phénotypes étaient absents chez les mutants simples (90).

### **1.4.2. La voie canonique Wnt/Fz**

La signalisation par la voie canonique Wnt/Fz contrôle divers processus morphogénétiques cruciaux pour les étapes de prolifération et de différenciation cellulaire, spécification des axes embryonnaires et est aussi impliqués dans différentes pathologies humaines, notamment dans les cancers. Dans cette voie, l'élément déterminant est le facteur de transcription  $\beta$ -caténine. En absence du signal Wnt, la  $\beta$ -caténine/Armadillo cytoplasmique

se retrouve rapidement dégradée par un complexe de destruction formé d'axine/Conductin, l'Adenomatous Poliposis Coli (APC) et du glycogène-synthase-kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Ce dernier va d'abord se lier à la  $\beta$ -caténine, la phosphoryler en vue de son ubiquitination par le complexe SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex) et sa dégradation dans le protéasome (97). Le niveau cytoplasmique et nucléaire bas de  $\beta$ -caténine réprime, par une action de corépression sur les facteurs de transcription Lef/Tcf, les gènes cibles de la voie canonique Wnt/Fz (93) (Figure 6). La liaison directe des Wnt à un domaine CRD riche en cystéine de la protéine Frizzled(Fz) (91, 92) et son corécepteur low-density-lipoprotein-related protein (Lrp5/6) déclenche la transduction du signal en induisant l'activation par phosphorylation de la protéine Dishevelled (Dsh) et celle de Lrp6 qui, une fois phosphorylée, recrute l'axine. L'interaction Lrp6-axine ainsi que la phosphorylation de Dsh et son recrutement à la membrane contribuent à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine cytosolique. Cela, en inhibant la formation du complexe (APC-Axin-glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3  $\beta$ )) par la dégradation consécutive de l'axine et l'inhibition de la GSK3 $\beta$  (93). La  $\beta$ -caténine accumulée est donc transloquée dans le noyau et interagit avec des facteurs de transcription de la famille Lef/TcfF (Lymphoid Enhancer-binding Factor/T-cell factor) pour activer l'expression de divers gènes cibles (94-96) (Figure 6).



**Figure 6.** Diagramme représentatif du mécanisme de la voie de signalisation canonique (Wnt/ $\beta$ -caténine). A) En absence de Wnt, la voie est inactive, un complexe protéique se forme et phosphoryle la  $\beta$ -caténine dans le but de la dégrader ensuite par protéasome, par conséquent les gènes cibles ne seront pas transcrits. B) Une fois que le ligand Wnt est lié, le complexe protéique de dégradation de la  $\beta$ -caténine est inhibé et la voie est activée.

Connaissant que l'implication de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine touche de nombreux mécanismes importants, un dérèglement de celle-ci peut générer des maladies de gravités variables. En fait, une mutation dans le gène APC cause, par une sur-activation de la voie canonique, des cas sporadiques du cancer du colon (98). Également, des cas de patients avec un transgène oncogénique de la  $\beta$ -caténine manifestent une tumeur des follicules des cheveux (99). Récemment, une étude a démontré qu'une dérégulation dans la voie canonique peut être associée à la leucémie sans l'identification d'une mutation de cette voie en liaison avec cette maladie (100). La régénération osseuse dépend largement des ostéoblastes. Ces

derniers présentent des défauts chez des patients avec des mutations de gains de fonction de *LRP5*. Cet effet sur le système osseux a été confirmé chez un modèle de souris *knockout* pour *Lrp5* qui développe une diminution de la prolifération et de la maturation des os (101). Les souris mutantes *knockout* pour *Tcf4* montrent une absence des cryptes qui sont des glandes exocrines qui font partie de l'intestin et qui sont nécessaires pour la sécrétion d'enzymes (102). Le même phénotype a été observé chez des souris où le *Dkk1* est inhibé (103).

### **1.4.2.1. Les récepteurs Frizzled et corécepteurs Lrp5 et Lrp6**

Le récepteur commun pour les différentes voies de signalisation Wnt est *Frizzled* (Fz). Chez l'homme, 10 protéines FRIZZLED (FZ) ont été identifiées (FZ1 à FZ10) (104). Les FZ sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires de la famille des GPCR (G-Protein-Coupled Receptors). Leurs interactions avec les ligands se font à travers leurs parties N-terminales extracellulaires riches en cystéine, CRD (Cysteine Rich Domain). Des mutations chez Fz se présentent sous divers phénotypes, y compris certains défauts du système nerveux central incluant des défauts axonaux au niveau du prosencéphale, un dysfonctionnement progressif du cervelet et du système auditif, des défauts dans l'hippocampe et l'apprentissage visuel-spatiale. (112). Les corécepteurs Lrp5 et Lrp6, qui font partie de la superfamille des « Low-density-lipoprotein receptor-related proteins », sont d'une importance centrale dans la transduction du signal Wnt. Avec un seul domaine transmembranaire et des propriétés biochimiques très similaires, ces protéines sont dans la plupart du temps coexprimées au cours la vie (113). Lrp5 et Lrp6 seront discutés en détail dans la Section 1.7.

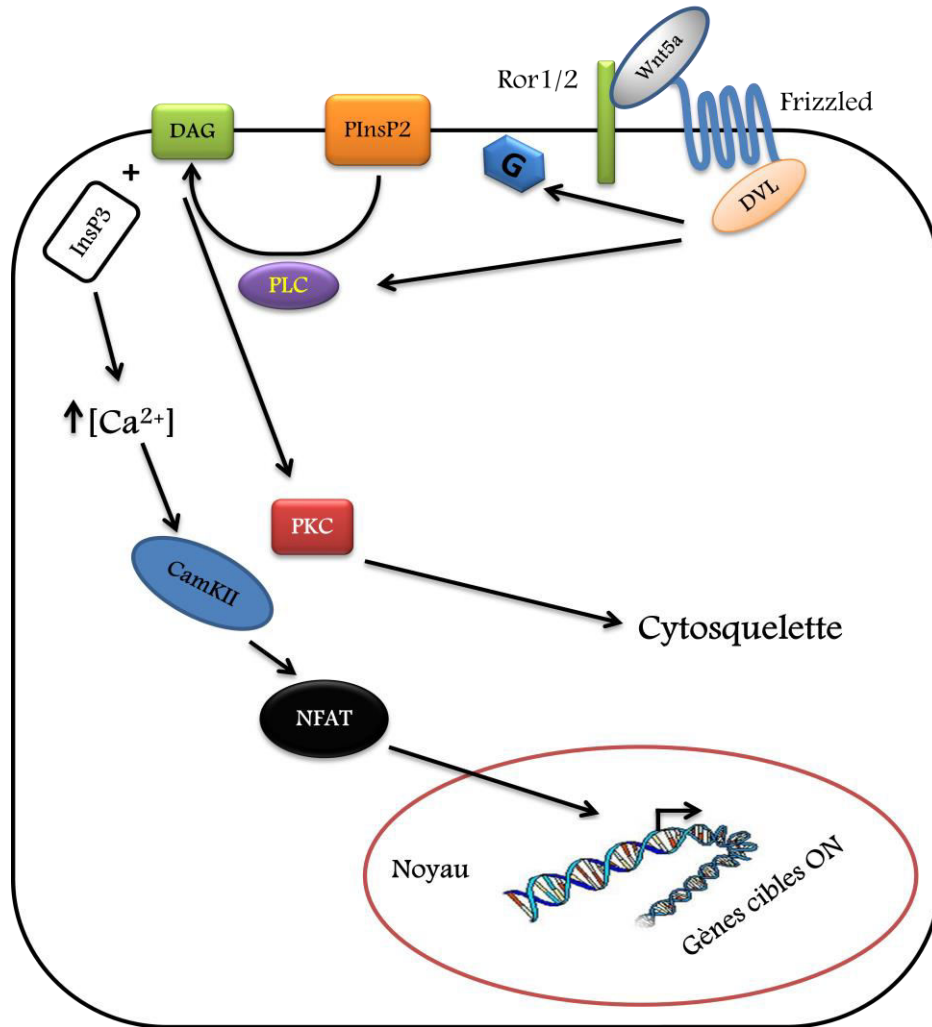
### **1.4.2.2. Les modulateurs la voie canonique Wnt/Fz**

Plusieurs membres régulateurs de la signalisation canonique Wnt/Fz ont été identifiés. Des modulateurs, comme Ryk, sont des récepteurs pour le Wnt et tyrosine kinase (Rtk), à un seul domaine transmembranaire. Également, Ror2 qui est une autre Rtk qui actionne la liaison des Wnt avec le domaine CRD de Fz (91, 104). Les trobospondines (R-spondin) sont capables de se lier directement avec les régions extracellulaires de Fz8 et Lrp6 pour activer la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (106). Les Sost sont des protéines antagonistes de la voie

canonique qui se lie au Lrp5/6 (107). La protéine transmembranaire Kremen (Km) permet de lier Dkk1 (108) qui est un inhibiteur direct de la voie de signalisation canonique (109). Norrin est un autre activateur de la voie par son interaction avec Fz4 et Lrp5 (110) et finalement les protéines Sfrp (secreted Frizzled-related Proteins) figurent aussi parmi ceux qui inhibent la voie canonique en liant le domaine CRD de Fz (111).

### 1.4.3. La voie non-canonique Wnt/Calcium

Les ligands Wnt peuvent influencer la variation du calcium intracellulaire à travers la voie Wnt/Calcium qui est considérée comme une voie alternative de la signalisation Wnt/Fz (figure 7). Cette voie a été essentiellement décrite *via* le récepteur Rfz2 (rat) et Xwnt5A (xénope). Ces deux protéines, une fois exprimées dans des embryons de poisson zébré, accroissent la libération du calcium par l'intermédiaire des phosphatidylinositols (114). Aussi, ce relargage de calcium semble nécessiter l'expression parallèle du gène *Dvl* ainsi que l'activité des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  des protéines G. La voie des phosphatidylinositols est sous le contrôle de la phospholipase C (PLC) qui est décisive pour le fonctionnement de la voie Wnt/Ca<sup>++</sup>. En effet, ce dernier dégrade le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PinsP2) en diacylglycérol (DAG). Lors de sa liaison sur le récepteur du réticulum endoplasmique, l'InsP3 amorce la libération du calcium au niveau du cytoplasme. Dépendamment du taux de calcium libéré dans la cellule, le DAG va activer la PKC (115, 116) qui va, par la suite, agir sur le cytosquelette. En effet, une étude a démontré que le complexe cdc42/Par6/PKC permet la réorganisation du cytosquelette des microtubules en collaboration avec la voie canonique (271). L'augmentation calcique active également la CAMKII (Ca<sup>++</sup>/Calmodulin dependent protein kinase II) et la calmoduline (117-119). En aval, la voie Wnt/Ca<sup>++</sup> va essentiellement activer, par phosphorylation à la calcineurine, le facteur de transcription NF-AT (*Nuclear factor of activated t-cells*) (120) qui est impliqué dans la réponse immunitaire. Il permet, entre autre, l'expression d'interleukine 2 induisant ainsi la réponse immunitaire cellulaire ou la Lipocaline 2 pour moduler la migration cellulaire, le faire entrer dans le noyau et accroître son affinité pour l'ADN (121) (figure 7).



**Figure 7.** Diagramme du mécanisme de la voie de signalisation Wnt/Calcium.

La voie Wnt/ $Ca^{2+}$  implique plusieurs protéines sensibles au taux de calcium intracellulaire. Le calcium est libéré à partir du réticulum endoplasmique grâce à l'inositol triphosphate. Finalement, le facteur de transcription NFAT est activé, entraînant l'expression de gènes cibles. En parallèle, la protéine kinase C peut aussi être activée, agissant au niveau du cytosquelette.

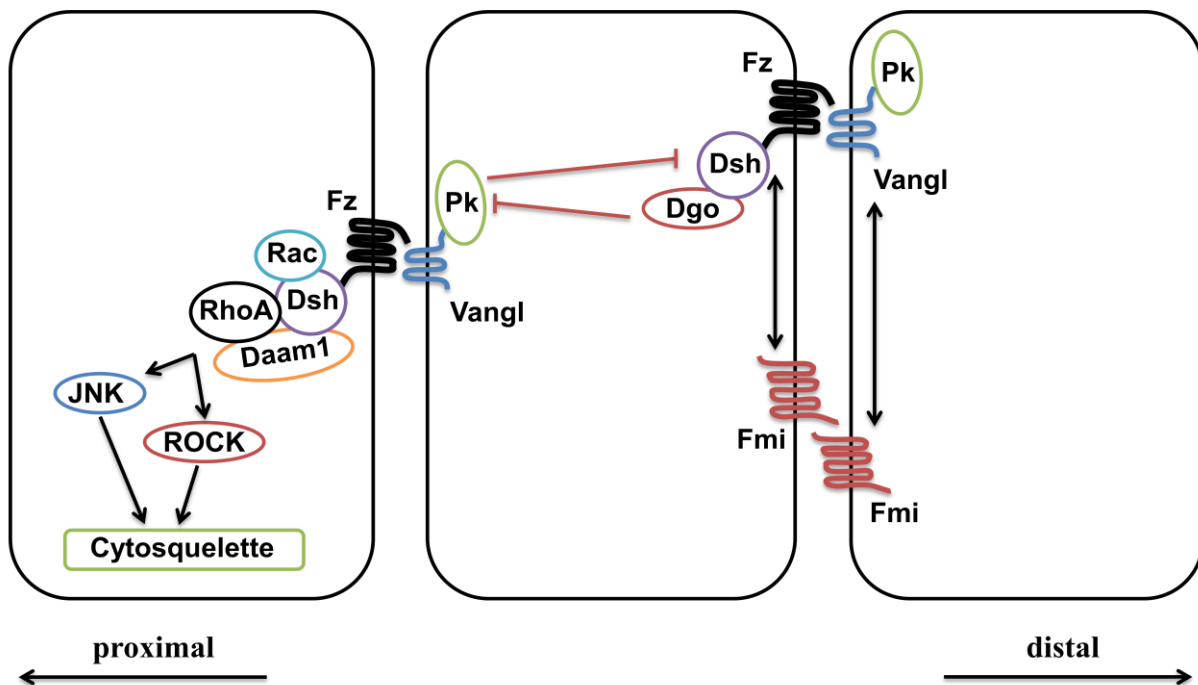
#### 1.4.4. La voie non-canonique du Fz/Dvl

La voie non-canonique de Fz/Dvl régule le processus de la polarité planaire cellulaire (PCP). Cette dernière représente la polarité cellulaire dans le plan d'un épithélium, par

comparaison à une polarisation selon un axe apicobasal dans chaque cellule. Cette voie a été étudiée en détail pour la première fois chez la drosophile où elle contrôle l'orientation uniforme de certaines structures comme celles des ommatidies, des soies abdominales et des poils des ailes adultes.

Un groupe de gènes centraux de la voie PCP a été identifié incluant : *vangogh/strabismus* (*vang/stbm*), *frizzled* (*fz*), *dishevelled* (*dsh* chez la drosophile, *Dvl* chez les vertébrés), *starry night/flamingo* (*stan/fmi*), *prickle* (*pk*) et *diego* (*dg*) (**Figure 9**). L'établissement ainsi que la propagation des signaux polarisant dans les tissus nécessitent des interactions bien définies entre ces protéines dans le but de former des complexes multi-protéiques. Ces derniers sont distribués, au niveau sous-cellulaire, d'une façon complexe et bien précise afin d'assurer une polarité planaire cellulaire adéquate. La signalisation PCP est amorcée par la liaison du ligand Wnt sur le récepteur Fz à 7 domaines transmembranaires. Celui-ci possède une distribution membranaire asymétrique plus concentrée au niveau apical des interfaces proximo-distales cellulaires. Cette asymétrie dépend étroitement de l'activité de Dsh, Vang/Stbm, Stan/Fmi et Pk (233). Fz recrute **Dsh** à la membrane cellulaire de manière à créer une distribution asymétrique particulière. Il est concentré à la membrane distale et est en faible concentration sur la membrane antéro-postérieure et dans le cytoplasme (312, 313). La protéine membranaire **Stbm** est localisée du côté proximal, dans la partie des jonctions adhérentes des cellules de l'aile nymphale chez la drosophile. Il a été démontré que Stbm est capable d'interagir directement avec Dsh, Dgo et Pk (315). Cette interaction permet de recruter **Pk** à la membrane proximale (315). Celui-ci interagit également avec Dsh et Dgo (316). De son côté, **Dgo**, qui est une protéine à domaines d'ankyrine, interagit directement avec Pk et Stbm. Elle est impliquée, avec ces deux protéines, dans le maintien d'une distribution apicale de Fmi, qui contrôle et assure le maintien, au niveau membranaire, du complexe initial des protéines de la PCP. Cela facilitera leurs interactions ultérieures dans la signalisation (317). En effet, **Fmi**, qui est un récepteur à sept domaines transmembranaires, fait partie de la superfamille des cadhérines et est localisé en grande partie du côté proximal et distal des cellules. Cette distribution est altérée à la suite de l'absence ou du dysfonctionnement de Fz ou Dsh (314). Fmi est responsable du positionnement apical de Fz (233). Dgo et Fmi sont distribuées de façon semblable et Fmi est nécessaire pour cette

distribution (318). L'ensemble des interactions sont schématisés dans la **Figure 8**. Le résultat de ces différentes interactions est la création d'une asymétrie moléculaire qui détermine un alignement cellulaire avoisinant (319). Fmi, Fz, Dsh et Dgo se regroupent du côté distal de la cellule parallèlement avec un autre groupe formé de Fmi, Vangl et Pk au niveau proximal. Les deux regroupements communiquent entre eux à travers Vangl, qui est proximale par rapport aux cellules avoisinantes (320). D'autres travaux ont suggéré que c'est le positionnement de Fmi aux deux pôles cellulaires qui lui permet de former des liaisons homophiliques et de réguler l'asymétrie cellulaire des complexes multiprotéiques (321). Des résultats appuient l'idée que ces deux modèles d'interaction fonctionnent en parallèle pour la transduction du signal de polarité entre les cellules.



**Figure 8.** Schéma représentatif des protéines centrales de la voie de signalisation PCP ainsi que les diverses interactions qui s'y établissent.

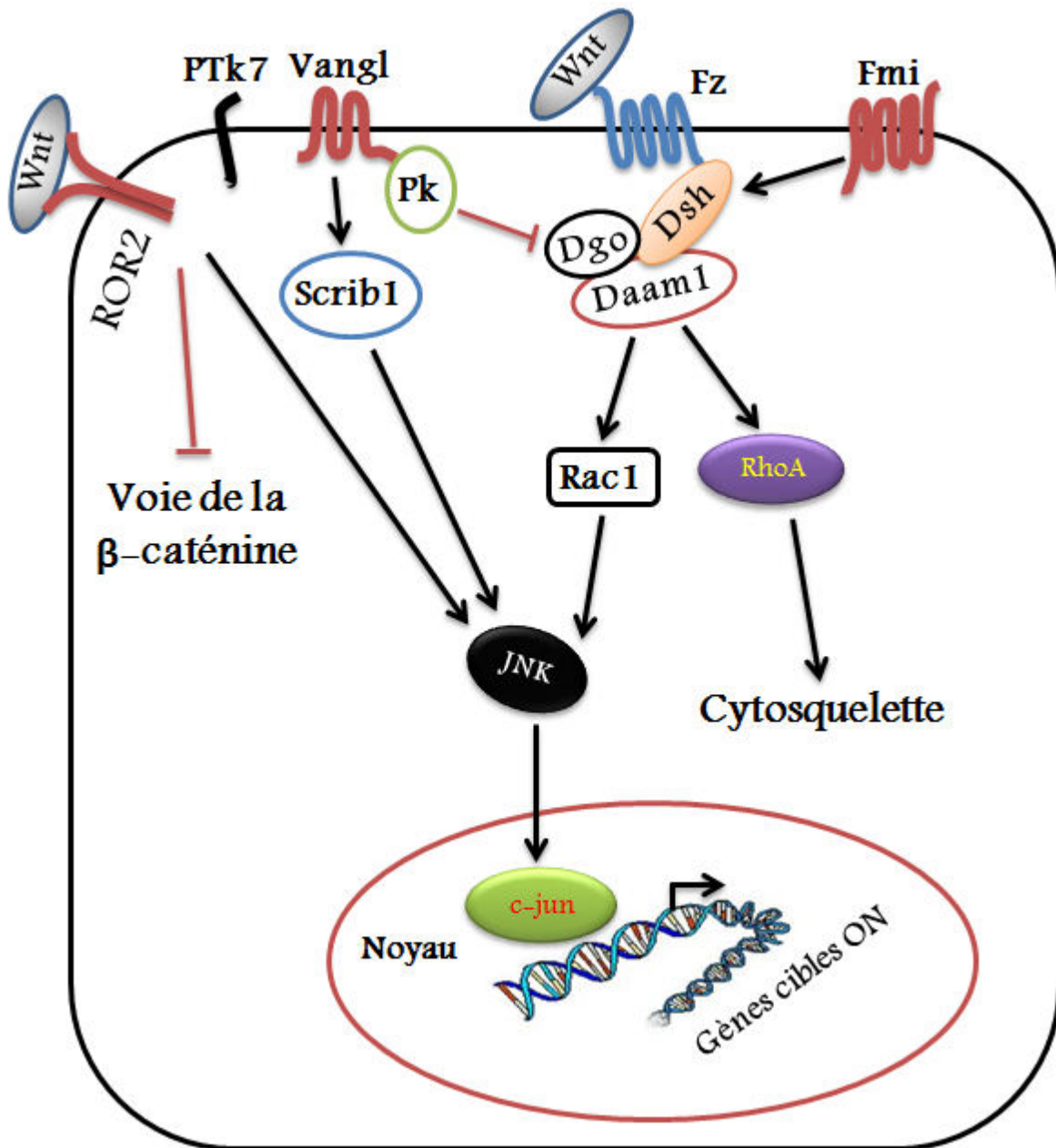
Même si la voie non-canonique est encore mal étudiée, les molécules impliquées dans ses mécanismes sont restés bien conservés au cours de l'évolution. Cette conservation touche donc les protéines et leurs mécanismes, qui régulent cette polarité planaire cellulaire, essentiellement dans le cas du récepteur Frizzled (Fz). Cela a été démontré par de nombreuses études chez les vertébrés et chez la drosophile. L'identification de l'ensemble des régulateurs



de la voie PCP n'est certainement pas complétée, par contre, leurs buts communs sont l'administration et la finalisation du cytosquelette d'actine et de tubuline. Les molécules qui régissent la PCP sont polarisées et régulièrement localisées du côté apical des cellules épithéliales, au niveau des jonctions adhérentes. Ce qui leur permet d'être en colocalisation avec les différentes protéines de la polarité apico-basale. Cela implique une possible coopération entre ces formations afin d'établir une bonne polarité planaire.

L'activation de la voie non-canonique ne nécessite pas la présence du co-récepteur Lrp5/6 et ne dépend pas de la  $\beta$ -caténine. Elle est instaurée par l'interaction directe de Wnt/Fz qui permet le recrutement de DVL sur lequel se lie la protéine adaptatrice Daam1 (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis*) (123), qui se retrouve par la suite, structurellement modifiée et activée (124, 125). Ce complexe, une fois formé, lie la protéine GTPase RHO-A, qui joue un rôle central dans la régulation du cytosquelette et de l'expression des gènes. Cette dernière peut se présenter sous deux différentes formes, soit active en se liant au GTP ou inactive en se liant au GDP (126, 127). Le complexe Dvl/Daam1 active donc RhoA via le recrutement d'un facteur d'échange de guanine, le Wgef (*Weak similarity guanine nucleotide exchange factor*). La forme active de RhoA (Rho-GTP) va stimuler la kinase Rock1 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase) qui va déclencher la phosphorylation de la kinase LIM. Celle-ci va aussi phosphoryler et inactiver la cofiline dont la caractéristique est la dépolymérisation de l'actine (128). Cette succession d'événements permet à la voie Wnt/Dvl /RhoA de contrôler la motilité cellulaire en agissant sur le cytosquelette (figure 9).

La cascade de la JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase), une deuxième dans la voie de signalisation PCP, aussi appelée Sapk1 (Stress-activated protein kinase), peut également être activée par Dvl. JNK est une sérine-thréonine kinase qui appartient à la famille des Mapk (Mitogen activated protein kinases). L'activation directe (129), ou par l'intermédiaire de la GTPase Rac (130) de la JNK, permet à celle-ci de phosphoryler et de stimuler directement les facteurs de transcription c-Jun et Atf2 (131). Ces événements agissent sur la régulation de la stabilité des microtubules, touchant ainsi le cytosquelette (132). Aussi et de façon dépendante de Dvl et de Rac, l'interaction Wnt5A/Ror2 peut également activer la JNK(133) (figure 9).



**Figure 9.** Diagramme du mécanisme de la voie de signalisation de la polarité planaire cellulaire (PCP). La voie PCP possède deux branches principales : la cascade JNK et la cascade des protéines Rho. La première induit l'expression de gènes via le facteur de transcription c-jun. La seconde agit sur la régulation du cytosquelette.

## **1.5. La polarité planaire cellulaire (PCP) chez les vertébrés**

La signalisation de la voie non-canonique (PCP) régule plusieurs processus cellulaires nécessaires pour le bon développement embryonnaire chez les vertébrés, notamment l'extension convergence durant la gastrulation et la neurulation, l'orientation des cils dans l'oreille interne, la guidance axonale, la mitose, la ciliogenèse et la polarité apicobasale.

Bien que les principales molécules qui sont impliquées dans la signalisation PCP soient très bien conservés à travers l'évolution, que ce soit de la drosophile jusqu'aux mammifères (329), il existe certains gènes chez les vertébrés faisant partie de la voie PCP et qui n'ont pas d'orthologues chez la drosophile (330). Ces gènes incluent *Scribble1*, protéine tyrosine kinase 7 (*PTK7*) et *Sec24b* ainsi que les gènes *Wnt* (155). *Scribble1* est impliqué dans la polarité apico-basale de différents tissus comme l'épithélium intestinal (331). *Ptk7* code pour une tyrosine kinase inactive, PTK7, qui active la voie non-canonique et en même temps, inhibe la voie Wnt/canonique. Elle est impliquée dans plusieurs processus comme l'adhésion, la polarité et la migration cellulaire ainsi que dans la prolifération, la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans l'apoptose (328). *Sec24b* code pour une protéine composante de « coat protein II » (COPII) qui interagit génétiquement avec les gènes de la voie PCP et qui intervient dans le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers la membrane (174). Les ligands Wnt seront abordés en détail dans la section 1.5.1

### **1.5.1. La PCP et l'extension convergence durant la gastrulation et la neurulation**

Chez les vertébrés, la voie PCP autorise et régit le mouvement de convergence extension (122). Ce mouvement est requis pour l'étape de la gastrulation, durant laquelle un troisième feuillet, le mésoderme, prend forme, migre et s'insère entre l'ectoderme et l'endoderme et est nécessaire pour la formation du tube neural tel que déjà décrit dans la Section précédente 1.3.1

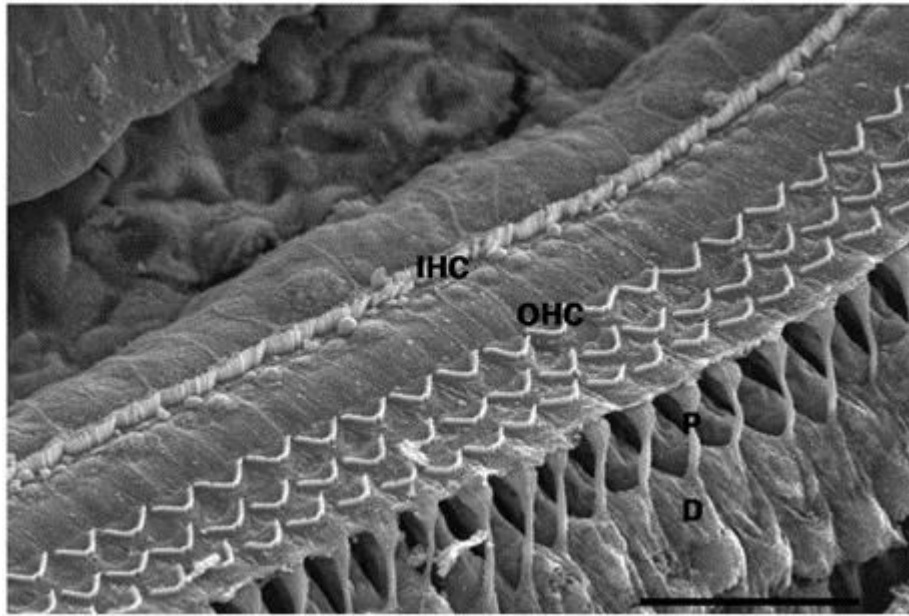
Les bords latéraux forment les bourrelets neuraux qui se soulèvent en produisant une courbure de la plaque neurale. Ils se fusionnent et se propagent vers les régions antérieures et postérieures de la neurula. Le tube neural va donc se fermer progressivement et se différencier. Il a été démontré que le dynamisme du fusionnement des plis neuraux devient d'avantage difficile avec une plaque neurale plus large que d'habitude causant ainsi un échec de fermeture du tube neural (13). La souris *looptail* (*Lp*) a été le premier modèle à impliquer le phénomène d'extension convergence et la voie PCP dans la pathogénèse des ATN (141, 142). En effet, les souris *Lp* hétérozygotes présentent une queue en forme de boucle (loop tail), tandis que les homozygotes souffrent de la craniorachischisis ou encore le tube neural reste ouvert tout au long de la moelle épinière. Le rôle de la CE a été évalué chez des embryons de souris *Lp*. Cela par le marquage de leur ligne médiane pour le gène *Vangl2* et en injectant la sonde moléculaire DiI dans le nœud et l'électroporation d'un vecteur d'expression GFP dans la plaque neurale. Les souris homozygotes présentaient une CE défectueuse au niveau du mésoderme axial et neuro-épithélium. Ce défaut est caractérisé par une large ligne médiane et des plis neuraux très espacés qui empêchaient le début de la neurulation (143).

Grâce aux travaux menés sur la souris *Loop-tail* (*Lp*), il a été possible, pour la première fois, d'impliquer le gène *Vangl2* et la voie PCP dans la pathogénèse moléculaire des ATN (141, 142). Plus tard, plusieurs études génétiques sur les autres souris mutantes, ayant un phénotype identique au craniorachischisis de la souris *Lp*, ont impliqué d'autres gènes de la voie PCP dans la causation de cette anomalie et ont confirmé son rôle essentiel dans la neurulation. Les souris mutantes, au niveau des gènes de la voie PCP, incluent le Circletail (mutante de *Scribble1*), les *Crash* et *Spin cycle* (mutantes de *Celsr1*), le knock-out de *Ptk7* (*Protein tyrosine kinase*) et les doubles knock-out de *Fz3/6*, *Dvl1/2*, *Dvl2/3* ainsi que les doubles hétérozygotes *Vangl2:Scrib* et *Vangl2:Dvl3* (47, 144). En plus de la craniorachischisis, quelques mutantes présentaient une exencéphalie (double knock-out de *Vangl2* avec la glycoprotéine *Cthrc1* (*Collagen triple helix repeat containing1*) qui est un cofacteur des ligands Wnt qui active sélectivement la voie PCP) (145) et la spina bifida (doubles hétérozygotes de *Vangl2* et *Ptk7*) (146). Ces études illustrent fortement le rôle important de la PCP dans le mécanisme complexe de la neurulation et dans la pathogénèse de plusieurs formes d'ATN.

## 1.5.2. La PCP et l'orientation des cils dans l'oreille interne

L'oreille interne, notamment l'organe de Corti, est jugée comme l'un des modèles, par excellence, pour l'établissement et l'étude de la polarité planaire cellulaire chez les mammifères (147). En effet, cet organe a été décrit pour la première fois par Alfonso en 1851 (285). Il représente un organe sensoriel de l'audition qui renferme des cellules sensorielles, des cellules neuroépithéliales ciliées et des cellules de soutien (279-281).

Les cellules ciliées sont classées en deux catégories : les cellules ciliées externes (CCE), qui sont disposées en trois rangées et les cellules ciliées internes (CCI), qui se répartissent sur une seule rangée (Figure 10). Les cellules ciliées sont appelées ainsi suite à la présence de stéréocils sur leur surface apicale. Jusqu'à présent, leur détérioration est irréversible et compromet alors l'audition de certaines fréquences sonores. Les stéréocils des cellules ciliées, constitués essentiellement de filaments d'actine, possèdent une répartition au niveau du pôle apical des cellules hautement conservées. Leur développement est en étroite liaison avec la polarité du kinocil, celui-ci est le seul "vrai" cil fait de microtubules organisés en "V" sur la cellule ciliée interne (Figure 10). L'ensemble de ces cellules présente une polarité apico-basale ainsi qu'une polarité planaire cellulaire. Les cellules ciliées en forme de touffes de cils, dont le rôle est mécano-sensorielle dans l'organe de Corti, possèdent les propriétés de cellules épithéliales ainsi que les caractéristiques de cellules neuronales. Le positionnement de ces cellules est de telle façon à présenter une polarité pointant vers la périphérie de la cochlée (148). Cette polarisation est régulée par la voie de signalisation PCP. Des études des souris *looptail* et *circletail* ont permis de mettre en évidence les différents cas de désorientations de cette polarité. En effet, ces modèles animaux présentent un défaut dans l'orientation des touffes ciliaires des cellules ciliées de l'organe de Corti selon l'axe proximo-distal.



**Figure 10** : Micrographies électroniques à balayage des cellules ciliées internes (IHC) et externes (OHC). Tirée de : <http://dx.doi.org/10.3342/kjor1-hns.2011.54.7.445>

Étant donné que le génome chez les mammifères affiche une redondance et une complexité beaucoup plus grande que chez la drosophile, il est parfois indispensable de muter plusieurs gènes de la même famille dans le but d’observer un phénotype dans l’oreille interne. Par exemple comme dans le cas des gènes *Dishevelled 1/2* ou *Dishevelled 2/3* (149-151) et des gènes *Frizzled 3/6* (152). **Le tableau 2** résume les gènes identifiés et qui présentent un phénotype PCP dans l’oreille interne. Contrairement à la drosophile, les principales protéines de la voie PCP mises en évidence chez les mammifères affichent une distribution asymétrique dans l’oreille interne. En effet, Vangl2, Fz3 et Fz6 sont bien localisées du même côté à l’opposé de ce qui est bien décrit chez la drosophile (152, 153).

<b>Drosophile</b>	<b>Mammifère</b>	<b>Références</b>
<b>Strabismus/Vangl2</b>	<b>Vangl1, Vangl2 (Looptail (Lp))</b>	<b>(153, 155-157)</b>
<b>Dishevelled</b>	<b>Dishevelled 1-3</b>	<b>(149-151, 159)</b>

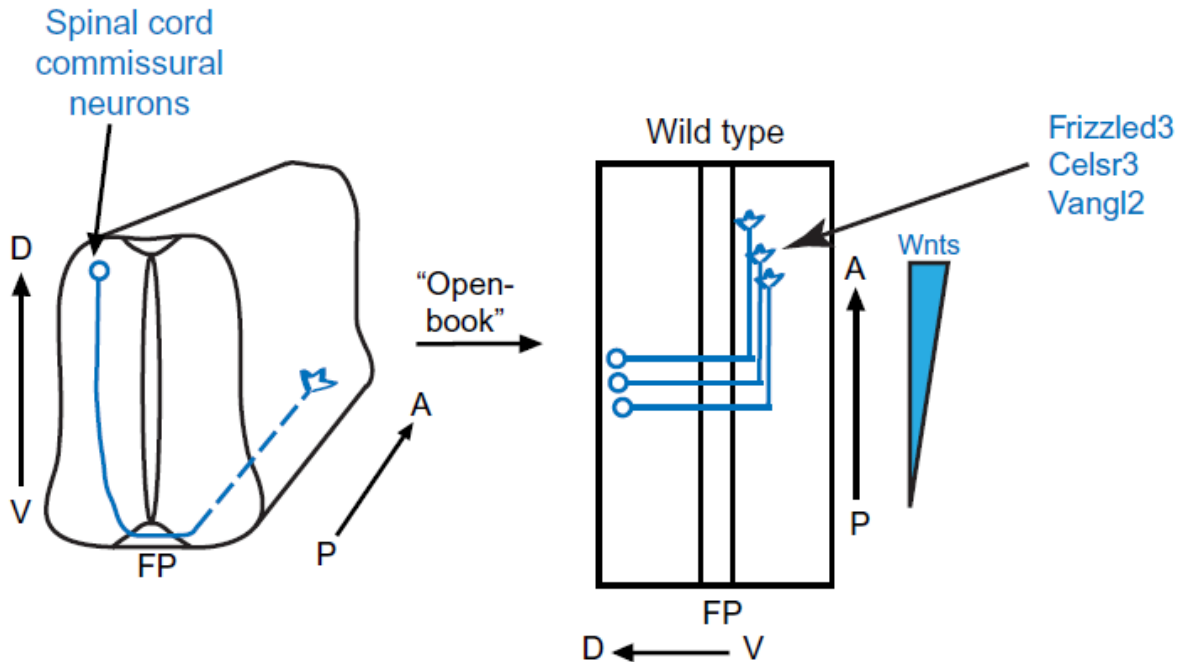
<b>Prickle</b>	<b>Prickle 1-2</b>	<b>(160, 161)</b>
<b>Frizzled</b>	<b>Frizzled 3-6</b>	<b>(152, 154)</b>
<b>Diego</b>	<b>Diversin</b>	<b>(159)</b>
<b>Flamingo/Starry night</b>	<b>Celsr1-3 (Spin cycle (Scy), (Crasher (Crsh))</b>	<b>(156, 162-165)</b>
<b>Offtrack</b>	<b>Ptk7</b>	<b>(146)</b>
<b>Scribble</b>	<b>Scribble1 (Circle-tail (Crc))</b>	<b>(155, 167)</b>
<b>Wnt</b>	<b>Wnt5a, Wnt7a</b>	<b>(168-170)</b>
	<b>Ror2</b>	<b>(145)</b>
<b>Fat</b>	<b>Fat 1-4</b>	<b>(172)</b>
	<b>Sec24b (Krabbel)</b>	<b>(173, 174)</b>
	<b>Smurf1/2</b>	<b>(171)</b>
	<b>Chuzhoi (Chuzhoi (Chz))</b>	<b>(166)</b>
<b>Polaris</b>	<b>Ift88</b>	<b>(158)</b>
	<b>Kif3a</b>	<b>(158)</b>

**Tableau 2 :** Résumés des gènes identifiés et qui présentent un phénotype PCP dans l'oreille interne.

### 1.5.3. La PCP et la guidance axonale

Durant le développement des circuits neuronaux, les axones en croissance se dirigent vers des cellules cibles, en réponse à des signaux de guidage attractives et répulsives. Un des modèles de guidage axonal le plus étudié est celui des axones commissuraux situés dans le tube neural. Chez les vertébrés, ces axones, après avoir traversé la ligne médiane, se retrouvent attirés par Wnts. Ces Wnt sont exprimés selon un gradient antéro-postérieur (haut-bas) le long du tube neural et se lient au récepteur Frizzled3 (341) (Figure 11). Deux études publiées en 2003 ont convergés avec des découvertes surprenantes qui démontrent que les morphogènes de la famille des Wnt sont des molécules de la guidance axonale conservées (341, 342). Chez la drosophile, les axones commissuraux traversent la ligne médiane seulement du côté antérieure à cause de la fonction répulsif de Wnt5a qui est hautement exprimé au niveau postérieur (342). Cette étude a amorcé d'autres recherches qui se sont concentrées sur le rôle de la signalisation Wnt dans le mécanisme de la guidance axonale. En 2005, une autre composante de la voie PCP, Celsr3, a affiché une activité similaire à celle de Fz3 (343). Récemment, davantage d'études ont commencé à révéler une possible implication des gènes PCP dans la guidance axonale médiée par Wnt. En effet, le complexe PKC/Par3/Par6 a été associé à la régulation du parcours antérieur des axones commissuraux (344). Deux groupes ont montré un rôle directe des gènes de la voie PCP, Frizzled3, Celsr3 et Vangl2 dans l'orientation antéro-postérieur des axones sérotoninergiques et dopaminergiques du tronc cérébral et des axones commissuraux du tube neural (345, 346) (Figure 11). L'implication des gènes PCP semble être conservé exceptionnellement, du fait que chez la drosophile, les gènes frizzled (fz), strabismus (stbm), flamingo (fmi), disheveled (dsh) et prickle (pk) ont été démontrés comme étant coopérativement requis pour le ciblage axonal, la ramification des corps neuronales et pour favoriser les axones sensoriels (347, 348). Ces découvertes ont donné un aperçu du développement du cerveau et ont permis d'identifier les éléments qui peuvent expliquer certains défauts du circuit du système nerveux.





**Figure 11 :** Représentation des évidences du rôle de la signalisation PCP dans la guidance axonale. Réponse des axones commissuraux aux signaux des gènes PCP lorsd’un guidage après la traversée de la ligne médiane. Adapté de (Zou Y 2012) (349)

### 1.5.4. La PCP et la mitose

La mitose représente une étape bien particulière du cycle de vie des cellules (cycle cellulaire), avec des mécanismes qui sont très semblables chez la plupart des organismes. Pendant la gastrulation chez le poisson zébré, dont l’axe de développement est orienté de façon medio-latéral, la division cellulaire au niveau de l’épiblaste dorsal est normalement orientée vers l’axe animal-végétal. Le mécanisme régulateur de cette étape, qui est conservé chez différentes espèces (175), est sous la dépendance du complexe Fz/Dsh de la voie PCP. Une étude a démontré que l’établissement d’une bonne orientation du fuseau mitotique définira, par conséquent, une division cellulaire adéquate nécessitant une stabilité appropriée de la voie de signalisation PCP (175).

### 1.5.5. La PCP et la ciliogenèse

La ciliogenèse définit les étapes et le mécanisme de construction des cils au cours du cycle cellulaire. Elle se produit dans un ordre d'étapes bien précis (327). Pour commencer, la migration de corps basal de centrioles se fait vers la surface de la cellule pour s'attacher au cortex. Pendant cette migration, ces corps basaux s'attachent à des vésicules membranaires pour former un complexe qui va se fusionner avec la membrane plasmique de la cellule pour former les cils. L'alignement des nouveaux cils est déterminé par la position originale et l'orientation des corps basaux. Une fois que l'alignement est déterminé, les microtubules axonémales s'étendent à partir du corps basal en dessous de la membrane ciliaire en développement, en formant les cils (326).

Les premières preuves qui suggèrent qu'il y aurait une connexion moléculaire entre la PCP et la ciliogenèse proviennent d'études qui cibleraient la protéine ciliaire *Inversin*. Le contexte d'étude de cette protéine porte sur la fonction des cils et les mutations des gènes qui causent la cystique rénale chez l'humain (176). En effet, dans cette étude, il a été démontré que *Inversin* (*INVS*) est le gène muté qui cause la cystique rénale chez l'humain avec l'identification de 7 mutations tronquantes. Ce gène code pour la protéine *Inversin* qui présente une interaction moléculaire avec *nephrocystin* et  $\beta$ -tubulin qui est une composante principale dans la ciliogenèse. Ils ont aussi démontré une colocalisation d'*inversin*, de *nephrocystin* et de  $\beta$ -tubulin au niveau des cils primaires. Chez le poisson zébré, l'annulation de *Invs* cause des phénotypes de la cystique rénale.

Le lien entre la signalisation PCP et certaines protéines impliquées dans la ciliogenèse a été supporté par plusieurs études qui montrent que les protéines *Vangl2* et *Dvl* de la voie PCP sont localisées à, ou très près, de la base des cils dans les cellules chez les vertébrés (177, 178). Le fait que les protéines de la voie PCP interagissent physiquement et fonctionnellement avec *Inversin* a suggéré la possibilité que les signaux PCP puissent régir la ciliogenèse. Une étude récente sur les protéines effectrices de PCP, *Inturned* et *Fuzzy*, soutient cette idée. Des expériences d'imagerie ont révélé que les protéines *Inturned* et *Fuzzy* sont essentielles pour la ciliogenèse normale dans le tube neural ainsi que dans d'autres épithéliums ciliés (178).

Ces résultats impliquent la signalisation PCP dans la ciliogenèse, toutefois, malgré toutes ces études, le mécanisme de cette implication n'est pas encore bien clair. Les cils sont des protrusions cellulaires à base de microtubules et la signalisation PCP est généralement impliquée dans le contrôle du cytosquelette d'actine. En effet, Dvl, la protéine qui est liée et régulée par Inversin, (179) interagit également physiquement et fonctionnellement avec la protéine Formin (Daam1) (180). Formin initie directement la formation des filaments d'actine (181). En l'occurrence, les filaments d'actine sont nécessaires pour le bon positionnement des corps basaux ciliaires et dans les cellules où le cytosquelette d'actine a été perturbé (cils intracellulaire formés) (182-184). Une situation similaire a été observée, en absence des effecteurs PCP (Inturned or Fuzzy), chez les cellules ciliées où l'actine manque de s'accumuler au niveau apical et où les masses de microtubules allongées se retrouvent rassemblées à l'intérieur (178). Ces résultats suggèrent que les signaux de la voie PCP sont nécessaires pour la régulation du réseau d'actine qui positionne les corps basaux ciliaires. Cette interprétation aide à mieux comprendre la signalisation PCP dans d'autres contextes. Par exemple, l'assemblage polarisé des microtubules, qui constituent la partie axiale et motrice des cils (322), est indispensable pour l'établissement de la polarité planaire (185, 186). Les microtubules polarisés se sont révélés capables de médier le transport dirigé des composants de PCP tels que Frizzled (187). Des récents rapports indiquent que Dvl peut influencer la stabilité des microtubules (188, 189). Ces données appuient le rôle de la voie de signalisation PCP dans le phénomène de ciliogenèse.

### **1.5.6. La voie PCP et la polarité apico-basale**

La polarité apico-basale dans un épithélium correspond à une polarité qui va déterminer deux régions divergentes de la cellule, la région apicale et la région baso-latérale, séparées par les jonctions serrées qui préviennent la diffusion des facteurs d'une région vers l'autre. Ces régions sont composées de protéines distinctes leur donnant des propriétés différentes. Trois principaux complexes de polarité impliqués dans la polarité apico-basale des cellules épithéliales ont été définis et décrits pour la première fois chez la drosophile : le complexe Crumbs (Crb)/PALS1 (Stardust (Sdt))/PATJ, Par3/Par6/aPKC) et Scribble1/Lethal Giant Larvae (LGL)/Discs large (Dlg) (323). Le complexe PAR inclut Par3 (Bazooka), Par6

(une protéine à domaine PDZ) ainsi que de la protéine kinase C atypique (aPKC), une kinase serine/thréonine. Ces protéines sont conservées chez le vertébré. Le recrutement de ce complexe au niveau de la membrane latérale représente la première étape dans l'établissement de la polarité apico-basale dans les épithéliums de la drosophile. Cette polarité est perdue si l'un de ces trois gènes est muté. Le complexe CRUMBS est constitué de Crb, une protéine transmembranaire possédant un large domaine extracellulaire, de Stardust (Std), une MAGUK, de PATJ1, une protéine à domaine PDZ et de Lin7, qui contient un site d'interaction avec les domaines PDZ. Stardust est le point d'interaction pour toutes les protéines pour former ce complexe. Au niveau apical de la zonula adherens des cellules épithéliales, ce complexe est localisé de manière asymétrique. Chez la drosophile, des mutations dans les gènes de ce complexe déstabilisent et préviennent la formation de la zonula adherens à partir des jonctions serrées. Cela cause une perte des propriétés d'adhésion et la polarité cellulaire. Par contre, la surexpression de Crb conduit à une augmentation de la surface apicale au détriment de la baso-latérale. Le complexe CRUMBS est conservé chez les mammifères où il est restreint à une région limitrophe de la zonula adherens. En ce qui concerne le troisième complexe, il est composé de Scribble (Scrib), de lethal giant larvae (Lgl) et de Discs large (Dlg). Ce complexe est localisé au côté des jonctions cloisonnées et il existe une interaction génétique entre ces différents composants (324, 325).

La plupart de ces protéines font partie de la classe des MAGUKs (member of the membrane-associated guanylate kinase) et inclut dans leurs structures des domaines PDZ. Ces derniers sont localisés au niveau apical des cellules dans les jonctions serrées chez les mammifères et les jonctions septés chez la drosophile.

La localisation sous apicale des protéines centrales de la signalisation PCP au niveau des cellules suggère l'existence d'un mécanisme spécial pour le contrôle et le maintien de cette distribution. Un lien important entre les gènes de la polarité apico-basale et ceux de la voie PCP a été mis en évidence sous forme d'interactions physiques ou génétiques entre les différentes protéines des deux voies (155, 190-194) et par le fait même qu'un gène *Scribble1* soit engagé à la fois dans la signalisation PCP et dans la polarité apico-basale (155).

Il a été démontré que *strabismus/vang* interagit avec *discs large (dlg)* chez la drosophile (190). Une absence de *dlg* ou *strabismus*, chez l'embryon de drosophile, est à l'origine de nombreuses difficultés de formation de la membrane plasmique, tandis que sa surexpression, conjointement à une surexpression de *strabismus*, entraînera une formation excessive de membrane plasmique (190). Par ailleurs, en se basant sur la désorientation, le défaut d'asymétrie ainsi que de chiralité des ommatidies de l'œil de drosophile, une interaction génétique et moléculaire entre *Strabismus* et *Scribble* dans la régulation de la PCP, a été mise en évidence. Les auteurs n'ont toutefois pas trouvé d'interaction génétique entre *Strabismus* et *Dlg*, *Lgl*, *Par6*, *Par3/Bazooka* ou *PALS1/Stardust* (194).

Chez les mammifères, la première étude à impliquer un membre de la voie PCP est celle de la mutante *circletail (crc)* (156). Ce mutant correspond à une insertion d'une cytosine en position 3182 qui cause un décalage du cadre de lecture dans l'ARNm du gène *Scribble* menant à un arrêt précoce juste après PDZ 2 (156). Ce mutant développe une craniorachischisis et meurt à la naissance. Ce phénotype est absent chez l'hétérozygote. Les souris homozygotes présentent aussi un défaut de la fermeture abdominale, un échec dans la formation des paupières qui restent fermées ainsi que des défauts sont observés dans la rétine.

Une interaction génétique entre *Vangl2* et *Scribble1* joue un rôle central dans l'administration des étapes de l'alignement des touffes ciliaires des cellules sensorielles dans l'organe de Corti (155). Cette interaction permet la régulation des mouvements d'extension convergente de la voie PCP (194, 195). Toutefois, aucune interaction génétique entre *Strabismus* et *Dlg*, *Lgl*, *Par6*, *Par3/Bazooka* ou *PALS1/Stardust* n'a été démontrée(194). De plus, une étude a permis de dévoiler un rôle important de la polarité apicobasale dans la régulation de Fz. Ainsi, l'activité et la stabilité de ce dernier sont assurées par une phosphorylation de la part de aPKC, alors que son antagonisme est régi par *Par3/Bazooka* (191). Djiane et al, ont montré que la protéine dPatj (Tight Junction-Associated PDZ), qui intervient dans la formation des jonctions serrées, représente un partenaire protéique spécifique et un inhibiteur de l'activité de Fz (191).

En 2005, Dollar a prouvé que la régulation de *Lgl* (Lethal giant larvae) par *Dvl* permettait le contrôle de la polarité apico-basale (192). Le recrutement des protéines de la

polarité planaire, au niveau des jonctions d'adhérence, est assuré par les complexes protéiques de polarité apico-basale. En effet, la localisation apicale de Stbm est affectée chez une drosophile invalidée pour le gène *Scribble* (194).

### **1.5.7. La PCP et le cancer**

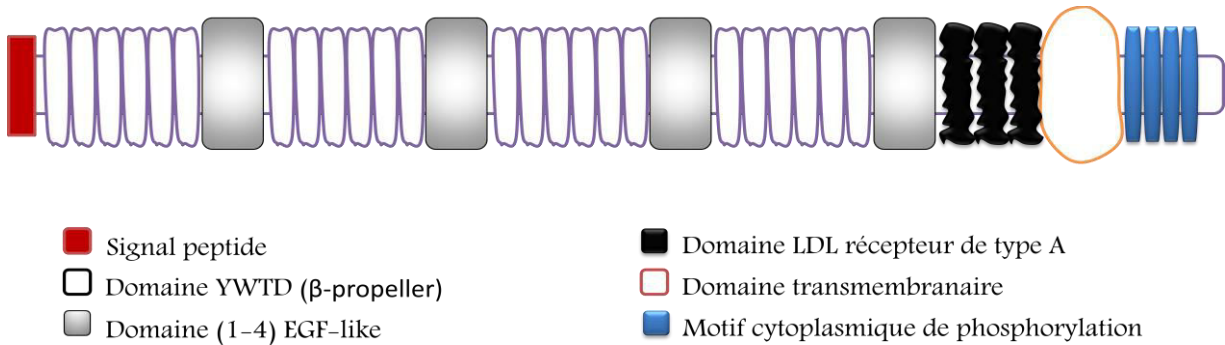
En accord avec les modifications observées au niveau du cytosquelette, l'activation de la voie WNT/PCP a été associée avec une augmentation de l'invasion tumorale et du caractère des cancers. Par exemple, WNT5A, qui active RAC et JNK, a été montré comme activant les métastases dans les mélanomes, les cancers gastriques et les cancers du sein (134-136). WNT/PCP pourrait également jouer un rôle dans l'angiogenèse, c'est-à-dire dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet, l'inhibition de la voie WNT/PCP affecte la croissance, la polarité et la migration des cellules endothéliales (137). La migration de ces cellules est une étape essentielle dans la formation des nouveaux vaisseaux. La voie WNT/PCP apparaît par conséquent importante dans deux mécanismes impliqués dans la progression et l'agressivité tumorale. Pourtant, quelques exemples suggèrent également un rôle dans la suppression tumorale. WNT5A est perdu dans plusieurs modèles tumoraux (138, 139). De plus, l'inhibition de WNT5A par ARNi induit la transformation de cellules épithéliales mammaires (140). L'activité suppressive de tumeur de WNT5A passerait par l'inactivation de la  $\beta$ -caténine, puisque les expressions des deux protéines sont inversement corrélées. Globalement, la voie WNT/PCP aurait plusieurs rôles dans le développement tumoral et ce, selon l'étape considérée : dans les étapes précoces, elle agit comme suppressive de tumeur en inhibant la  $\beta$ -caténine, tandis que dans les étapes tardives elle promeut la progression tumorale en stimulant l'invasion, les métastases et l'angiogenèse.

## 1.6. Le gène *LRP6*

### 1.6.1. Structures et interactions de Lrp6

#### 1.6.1.1. Structure de Lrp6

*LRP6* code pour une protéine transmembranaire et membre de la famille des récepteurs LDL (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) (196) (figure 12). Cette famille inclut les protéines LDLr, VLDLr, ApoER2, LRP1, LRP2, LRP5 et LRP6. Les 1613 acides aminés, qui constituent la protéine LRP6, sont répartis de façon à permettre à celle-ci d'assumer principalement le rôle de médiateur d'endogénose et de transport des ligands. La nature de ces ligands peut être soit des protéines ou des lipoprotéines (197). Le côté N-terminal extracellulaire renferme quatre domaines essentiels pour un bon fonctionnement : un signal peptide qui sert à transmettre la protéine à la membrane, quatre domaines à six répétitions YWTD (tyrosine, tryptophan, thréonine et l'acide aspartique) de type  $\beta$ -propeller chacun (198, 199) ; ces derniers sont espacés par quatre autres domaines EGF (epidermal growth factor like domain), dont le rôle est de permettre l'interaction avec les différents ligands extracellulaires (200), et trois répétitions LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor). Un seul domaine transmembranaire sépare la partie N-terminal du C-terminale cytoplasmique qui contient cinq motifs de phosphorylation PPSPXS (figure 12). La taille des séquences EGF est d'approximativement 40 acides aminés (200) et celle des YWTD est d'environ 43-50 acides aminés. Les motifs cytoplasmiques PPSPXS, une fois phosphorylés, permettent une interaction avec d'autres protéines (201). Il existe un niveau élevé de conservation de la protéine humaine et celle de souris avec une homologie d'environ 98 % (196). Ces motifs possèdent comme rôle spécifique l'internalisation des lipoprotéines ApoB et ApoA dans les LDL et les VLDL (202). Il a été démontré que le phénomène d'internalisation est à l'origine de la régulation de l'activité de ces récepteurs (196).



**Figure 12.** Schéma représentatif des domaines fonctionnels de la protéine transmembranaire LRP6.

### 1.6.1.2. Interactions extracellulaires de Lrp6

Les Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, Wnt9b et Wnt10b sont parmi les principaux ligands qui interfèrent avec la protéine LRP6 du côté extracellulaire. Ces Wnts interagissent principalement avec les domaines EGF-like-1 à 4 de Lrp6 (203-206). Effectivement, dans la voie canonique, la libération ainsi que l'activation de la  $\beta$ -caténine se produit à la suite d'une liaison directe de Wnt3a au complexe Lrp6/Fz2 (207). Ce ligand extracellulaire compétitionne directement avec Dkk1, dont le rôle est semblable à celui de Dkk2 (208), pour les mêmes domaines d'interaction, afin de lier Lrp6 (209). En effet, les domaines C-terminal et N-terminal de Dkk1 vont interférer respectivement avec les domaines EGF-like-3-4 et EGF-like-1-2 de Lrp6 (204, 209). Un autre activateur de la voie Wnt- $\beta$ -caténine est R-spondin-1, l'action de celui-ci est la stimulation de la phosphorylation de la Lrp6 par la protéine Gsk3 (210). Contrairement au Wnt3a, le Wnt5a inhibe par sa liaison avec Lrp6 et Fz2/Fz4 la voie Wnt- $\beta$ -caténine (203), et par la même occasion, active la voie de signalisation PCP (211). Aussi, la Sclerostosis (SOST) va lier Lrp6 dans le but d'antagoniser la signalisation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (212). L'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine se fait aussi par l'intermédiaire de la protéine Mesd qui, en liant les Lrp5 et 6, les empêche d'interagir avec Wnt3a, Dkk, SOST et R-spondin (213).



### 1.6.1.3. Interactions intracellulaires de Lrp6

Le ligand intracellulaire Gsk3 agit sur les sérines des motifs de phosphorylation de Lrp6 en réponse à la liaison de Wnt3a ou R-spondin sur Lrp6 et Fz dans le but d'activer la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (207, 210, 214). La kinase CK1 $\gamma$ , un autre ligand intracellulaire, répond à la liaison de Wnt3a sur le Lrp6 et Fz de la même façon que Gsk3 dans l'objectif d'activer la voie canonique. D'ailleurs, la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine ne peut pas avoir lieu dans une cellule en absence de la kinase CK1 $\gamma$  (215). Les kinases couplées aux protéines G 5/6 (GRK5/6), représentant une autre classe des kinases, agissent en phosphorylant Lrp6 et par conséquent l'activent. Toutefois, cette activation par les GRK5/6 est inhibée par l'antagoniste Dkk1 (216). Par ailleurs, Axin lie la partie cytoplasmique de Lrp6 suite à sa phosphorylation dans le but de libérer  $\beta$ -caténine du complexe de sa dégradation et de permettre l'activation de la signalisation canonique (217). Cette signalisation est inhibée par une surexpression du récepteur du facteur de croissance 10 (GRB10) qui s'associe au domaine cytoplasmique de Lrp6 afin d'annuler sa phosphorylation induite par Wnt3a (218).

### 1.6.2. Animaux modèles de *Lrp6*

Plusieurs modèles animaux ont été générés afin de mieux étudier le rôle du gène *Lrp6*, ainsi que les pathologies qui y sont liées. La première souris mutante a été la *knockout*, qui a été générée par capture de gènes, affiche une forme de spina bifida aperta ou d'exencéphalie avec une pénétrance de 50 %. Cette souris développe d'autres défauts développementaux incluant des déformations du squelette axial, des malformations du système urogénital et des défauts des membres (221).

En 2004, le groupe de Imai K a identifié une souris mutante hypomorphe de *Lrp6*, nommée *ringelschwanz(rs)*, qui présentait une mutation spontanée, R886W, et a utilisé cette souris mutante afin d'investiguer le rôle de Lrp6 dans la formation normale des somites et des os. Cette souris homozygote développe différentes malformations osseuses (ostéoporose) et a des défauts dans l'épithélialisation des somites naissants ainsi que dans la mise en place de leurs compartiments antéro-postérieur. Cette souris présente aussi une combinaison de

plusieurs phénotypes liés à un défaut dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Ces défauts incluent des perturbations du squelette axial et la formation des frontières des segments. L'ensemble de ces défauts conduit à une ossification retardée à la naissance et à une faible masse osseuse chez les adultes. Ceux-ci sont des caractéristiques de la pathogenèse des défauts de segmentation des vertèbres et de l'ostéoporose et ne sont pas liés aux ATN. Des études fonctionnelles, à l'aide de la technique biochimique Topflash, ont démontré que la transduction du signal à travers cette voie n'est pas efficace dans la souris mutante *rs* (219).

La souris mutante Crooked tail (Ct), affectée par une mutation spontanée (G494D) qui inhibe l'interaction avec *Dkk1*, révèle une hyperactivation de la voie  $\beta$ -caténine. Elle développe une queue en forme de crochet, a une déformation du squelette, ainsi qu'une exencéphalie avec une pénétrance de 20 %. Elle subit une mortalité prématurée avant le jour embryonnaire 8. Cette forme d'ATN peut être prévenue par la prise d'acide folique (220).

La souris mutante *Gwazi* (Gz), induite par l'agent ENU et porteuse de la mutation D549G, est affectée par différentes malformations au niveau de la tête (222). Cette souris présente d'autres défauts développementaux, incluant des malformations du système urogénital, des défauts des membres ainsi qu'une déformation du squelette axial (223).

Les études de ces modèles animaux, Gz, Ct et le KO, suggèrent une forte implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la formation du tube neural et par conséquent, les ATN à travers le gène *Lrp6*.

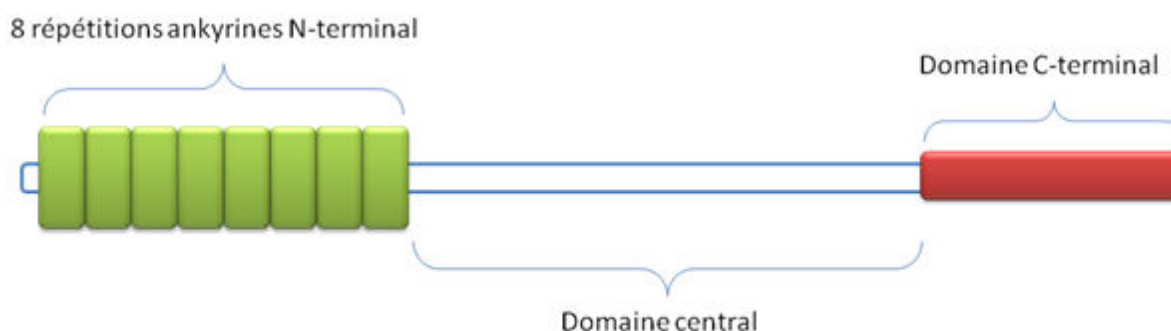
D'autres études, ciblant le gène *Lrp6* chez le *Xenopus*, ont démontré que *Lrp6*, en plus de son rôle dans le processus de l'extension convergence, est impliqué dans l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et que sa présence permet l'inhibition de la voie Wnt/PCP. Chez le *Xenopus*, la suppression (*knockdown*) des ligands PCP *XWnt5a* et *XWnt11* est suffisante pour sauver les phénotypes causés par la suppression (*knockdown*) de *Lrp6/Lrp5*. Aussi, chez le même modèle animal, il a été montré que la surexpression du ligand PCP *Wnt5a* bloque la formation d'un axe de corps secondaire en inhibant la capacité du ligand canonique *Wnt8* d'activer la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (272). Une autre étude chez le poisson zèbre a montré que la perte maternelle de *Wnt5b* entraîne une signalisation ectopique de Wnt/ $\beta$ -

caténine et par conséquent, une augmentation dans le destin cellulaire des cellules dorsales (277, 278).

## 1.7. Le gène **DIVERSIN (ANKRD6)**

### 1.7.1. Structures et interactions

*DIVERSIN*, un distant homologue de *Diego* chez la drosophile, code pour une protéine cytoplasmique à huit répétitions ankyrines N-terminal, un domaine central de liaison pour la CKIe conservé et un domaine C-terminal qui lie Axin/Conduction (245). Appelé aussi *ANKRD6* (**A**nkyrin **r**epeat **d**omain-**c**ontaining **p**rotein **6**), cette protéine de 727 acides aminés appartient à la famille des ankyrines (ankyrin-repeat proteins) (figure 13).



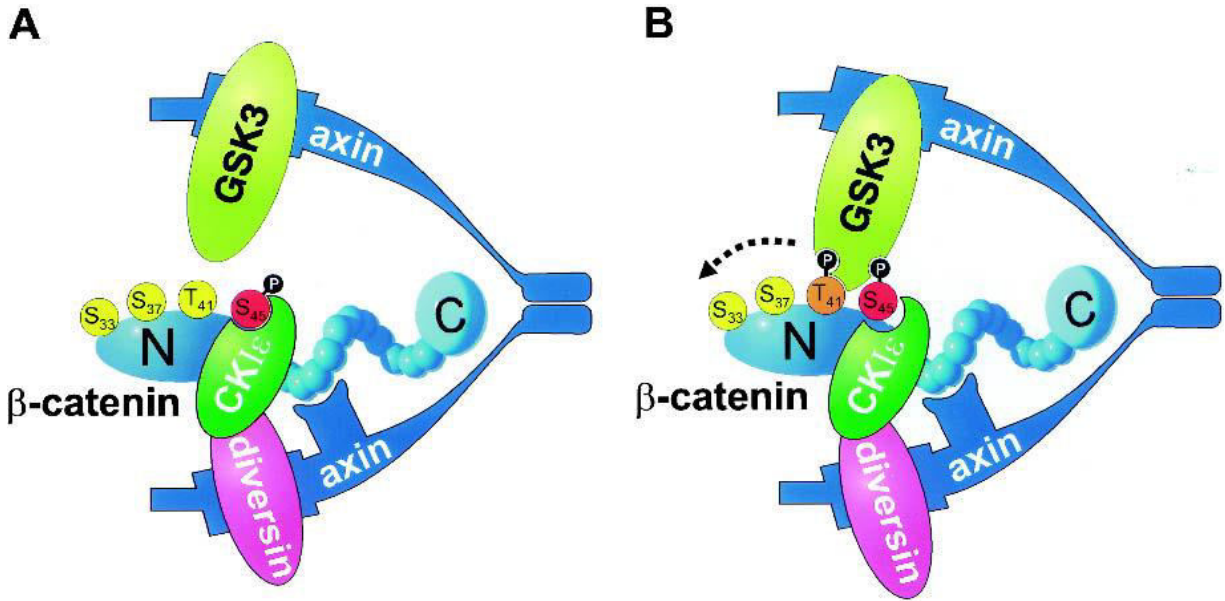
**Figure 13 :** Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de la protéine cytoplasmique DIVERSIN (ANKRD6) (Ankyrin repeat domain-containing protein 6).

Les domaines ankyrines sont des motifs protéiques de 33 résidus constitués de deux hélices alpha séparées par des boucles. Ces domaines ont été découverts pour la première fois suite à des études de signalisation CDC10 dans la levure et de Notch dans la drosophile. Ils sont principalement impliqués dans la médiation des interactions protéine-protéine (246, 247) et ils ont été associés à un certain nombre de maladies humaines. Ces protéines comprennent l'inhibiteur du cycle cellulaire, la p16 qui est associée au cancer et la protéine Notch (un élément clé des voies de signalisation cellulaire) qui peut provoquer le syndrome de CADASIL (Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and

Leukoencephalopathy) quand le domaine des répétitions ankyrines est muté (248). *ANKRD6* agit comme un interrupteur moléculaire en favorisant la signalisation de la voie non-canonique Wnt / PCP et en inhibant celle de la voie canonique Wnt /  $\beta$ -caténine (245).

Chez la drosophile, l'orthologue Diego interagit physiquement avec Stbm et Pk à travers ses domaines de répétitions ankyrines et avec Dvl à travers une région de 181 acides aminés, juste après les domaines ankyrines (159, 249). Ces interactions sont indispensables à la localisation et à la formation asymétrique des complexes multiprotéiques de la voie PCP. Chez les vertébrés, *ANKRD6* interagit directement avec Dvl par l'intermédiaire des huit répétitions ankyrines. Cette interaction est nécessaire et est suffisante pour la médiation de la signalisation Wnt/PCP. Cela se produit en aval à travers la famille des Rho-GTPase et Jun-kinase N-terminal, de manière réciproque dans des cultures cellulaires et dans les embryons de poisson-zèbre (250). Le rôle d'activateur de la voie PCP qu'*ANKRD6* assure semble être médié par ses domaines de répétition ankyrine. Par contre, la partie centrale et la partie C-terminale contrôlent la signalisation Wnt canonique chez les embryons de poisson zébré (245). En effet, *ANKRD6* lie CKI $\epsilon$  et Conductin/Axin respectivement par l'intermédiaire de ses régions centrales et C-terminales.

CKI $\epsilon$ /Axin/Conduc/GSK $\beta$  est le complexe de phosphorylation et de dégradation de la  $\beta$ -caténine (figure 14). Cette phosphorylation permet une ubiquitination par la  $\beta$ -TrCP ligase (251) et par conséquent provoquera simultanément l'inhibition de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et l'activation de la voie PCP (245).



**Figure 14.** Représentation schématique du modèle d'action d'*ANKRD6* sur le mécanisme de dégradation de la  $\beta$ -caténine. (A) Diversin recrute CKI $\epsilon$  au complexe Axin/Conductin, ce qui va amorcer la phosphorylation en Ser 45 de la  $\beta$ -caténine. Le dimère Axin/Conductin permet la liaison simultanée d'*ANKRD6*/CKI $\epsilon$  et d'*GSK3* $\beta$  sur le complexe. (B) *GSK3* $\beta$  déclenche une phosphorylation subséquente de la  $\beta$ -caténine au niveau de la Thr 41, Ser 37 et Ser 33. Ces acides aminés, une fois phosphorylés, deviennent des sites d'ubiquitination pour la ligase  $\beta$ -TrCP (Amit et al. 2002), ce qui favorise la dégradation de la  $\beta$ -caténine. *Adaptée de Schwarz- Romond et al., 2002.* (14)

Diversin contrôle également la formation de l'axe chez les poissons zébrés pendant les premiers stades de développement embryonnaire. Ce processus nécessite la signalisation  $\beta$ -caténine (245). Le double rôle de Diversin dans les deux voies de signalisation Wnt semble être spécifique pour les vertébrés.

Chez la drosophile, Diego promeut le regroupement local de Flamingo, en favorisant sa polarisation proximo-distale (231). *Ankrd6* est exprimé de façon permanente pendant le développement du cerveau du stade E12 à la maturité, ce qui suggère un rôle dans le développement du cerveau (252). Chez les embryons, l'expression est maximale dans les zones ventriculaires et intermédiaires de la prolifération neuronale et s'étend aux champs neuronaux post-migratoires pendant la période postnatale.

Ces données suggèrent qu'Ankrd6 peut être impliqué dans le développement du cerveau en interaction avec Celsr/Flamingo. Cependant, la pertinence physiologique normale et anormale dans le développement reste à éclairer.

## 1.7.2. Animaux modèles

Il a été précédemment rapporté, chez la drosophile, que la protéine diego, à répétitions ankyrines, contrôle la signalisation Wnt non canonique et la PCP au cours du développement de la mouche (250, 253). Pour élucider les implications biologiques de l'action de *ANKRD6* dans la signalisation Wnt non canonique, son ARNm, qui code pour une protéine dépourvue du domaine de répétition ankyrine (Div- $\Delta$ ANK), a été injecté dans des embryons de poisson zèbre. Ces embryons ont développé la bifida cardia, un phénotype où deux cœurs battent séparément (254). Cette anomalie se produit à la fin de la gastrulation lorsque les ébauches du cœur bilatéral ne parviennent pas à fusionner en raison d'une migration défectueuse des précurseurs du myocarde à la ligne médiane dorsale. Celle-ci est régie par la signalisation Wnt non canonique (255-257). Également, l'ARNm Div- $\Delta$ ANK perturbe les phénomènes de l'extension convergence (CE).

La zone sous-ventriculaire (SVZ) est la plus grande région neurogénique dans le cerveau des rongeurs adultes. L'expression et la fonction de *ANKRD6* ont été étudiés dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents, la capacité des neuroblastes et les neurones matures qui prolifèrent durant la migration au sein du SVZ et de l'hippocampe. Contrairement au knockdown, dans le cerveau des souris nouveau-nés et des souris adultes, la surexpression, induite par des rétrovirus, d'*ANKRD6* favorise la prolifération et augmente le nombre des neuroblastes dans le bulbe olfactif (OB) (259).

Le centrosome est essentiel pour la formation des cils et a été impliqué dans la polarisation et la signalisation cellulaire au cours des premiers stades de développement embryonnaire. Un certain nombre d'effecteurs de la voie Wnt ont été identifiés dans le centrosome. La surexpression de l'ARN d'*ANKRD6* perturbe la polarisation des corps basaux des cellules multiciliées de la peau chez la *Xenopus* (258).

## 1.8. Le gène CELSR1

### 1.8.1. Structures et interactions

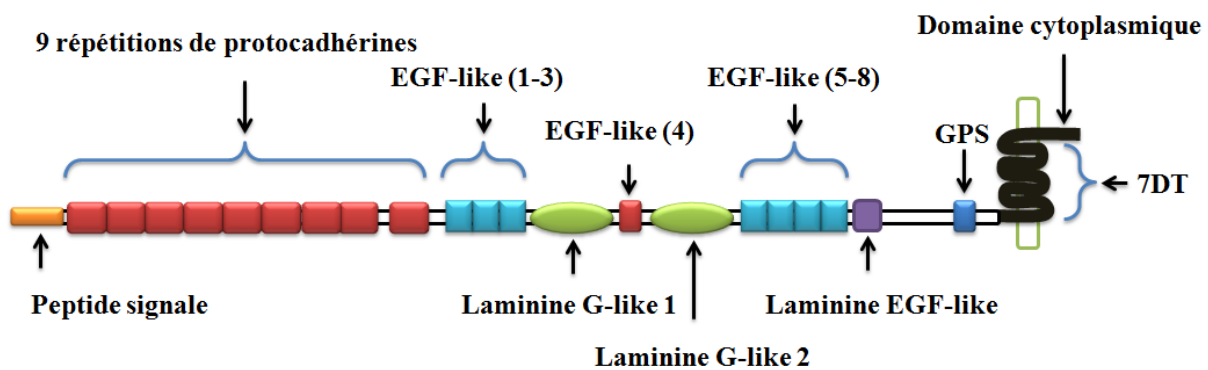
*Structure* : CELSR1 est le gène qui code pour un récepteur à sept domaines transmembranaires (**Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor**) aussi connus sous le nom de (**flamingo homolog**). Cette protéine, de plus de 3000 acides aminés, appartient à la famille des cadhérines atypiques qui inclut les protéines CELSR1, 2 et 3. Les cadhérines sont des molécules d'adhésion cellulaire dépendantes du calcium qui sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, y compris la signalisation des cellules lors de l'embryogenèse et la formation de circuits de neurones.

La large partie N-terminale extracellulaire de la protéine CELSR1 contient un signal peptide qui sert à cibler la protéine à la membrane, neuf répétitions de protocadhérines suivies de huit domaines de type EGF (Epidermal growth factor-like domains), dont le rôle est de permettre l'interaction avec les différents ligands extracellulaires, espacés par trois régions laminine G, et un domaine GPS (G-protein-coupled receptor proteolytic site). La partie N-terminale est séparée de l'extrémité anonyme C-terminale intracellulaire par sept segments putatifs transmembranaires (224) (figure 15).

Des études génétiques de *flamingo* (*fmi*), l'orthologue de *CELSR* chez la drosophile, ont établi un rôle essentiel pour ce gène dans la signalisation PCP, particulièrement dans l'organisation stéréotypique des poils des ailes (trichomes), des soies sensorielles (225, 226), l'orientation des ommatidies dans l'œil (161) ainsi que de la division asymétrique des précurseurs des organes sensoriels (227, 228). *Fmi/stan* interagit génétiquement et fonctionnellement avec d'autres membres de la voie PCP incluant *fz*, *vang/stbm*, *dsh*, *pket* et *dgo* (229-235). Au niveau de l'aile de la mouche, la distribution des protéines de la voie PCP est étroitement régulée de façon dynamique. Initialement réparties au niveau de toutes les jonctions sous-apicales, ces protéines adoptent une brève partition polarisée et transitoire tout au long de l'axe proximo-distal avant le développement des trichomes. Cette distribution est essentielle pour l'établissement d'une polarité et d'une bonne orientation des poils. *Fmi/stan*, *fzd*, *dsh* et *dgo* se retrouvent enrichis du côté distal des cellules des ailes, tandis qu'au niveau

proximal, on trouve fmi/stan, vang et pk. (226, 236, 237). Comme fmi/stan est localisé, à la fois, au niveau des jonctions distale et proximale, il agirait comme une plateforme pour promouvoir l'adhésion cellulaire et un pontage entre le coté distal et celui proximal de la cellule adjacente.

Celsr1-3 sont largement exprimés dans le système nerveux à des stades précoces du développement et chaque paralogue a montré des profils d'expression caractéristique dans le système nerveux central en développement (238).



**Figure 15.** Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de la protéine transmembranaire CELSR1. EGF, epidermal growth factor; DT, domaine transmembranaire; GPS, G-protein-coupled receptor proteolytic site.

## 1.8.2. Les modèles animaux

À ce jour, seulement *Celsr1* a été montré de causer des ATNs une fois muté chez la souris. Les principaux traits phénotypiques liés à *Celsr1-3* sont résumés dans le **tableau 2**. Deux allèles mutants pour *Celsr1*, *Crash* (*Celsr1<sup>Crsh</sup>*) (D1040G) et *SpinCycle* (*Celsr1<sup>Scy</sup>*) (N1110K), étaient générés par ENU (N -éthyl- Nnitrosurea) (239). Les souris *Celsr1<sup>Scy</sup>* et *Celsr1<sup>Crsh</sup>* hétérozygotes affichent un comportement anormal pour le mouvement de la tête et ceux homozygotes présentent une forme sévère d'ATN appelée craniorachischisis où le tube neural reste ouvert tout au long de la moelle épinière (239). Les deux mutants hétérozygotes et



homozygotes développent une organisation déficiente des faisceaux de stéréocils des cellules ciliées de l'oreille interne.

Chez le poisson zèbre, le knockdown de *Celsr1*, généré par des morpholinos antisens, provoque des défauts dans le phénomène d'extension convergence (CE). Ils manifestent principalement un raccourcissement de l'axe antéro-postérieur (240).

Gène	Allèle	Phénotype	Références
<i>Celsr1</i>	<i>Celsr1 Crsh et Scy</i>	Défauts de signalisation PCP dans l'oreille interne, agitation de tête, queue en forme de crochet, anomalies dans la migration des neurones FBM et des difformités pulmonaires chez les hétérozygotes. Les homozygotes meurent au stade embryonnaire avec le tube neural complètement ouvert.	239, 241, 242
	<i>Celsr1 KO</i>	Les hétérozygotes sont normaux et fertiles, les homozygotes viables, mais surtout stériles, environ 20% meurent avec un défaut de fermeture de tube neural. Les adultes montrent des traits de comportement anormal, des queues en crochet et une structure déformée de la chevelure de la peau. La migration des neurones FBM est affectée.	241, 242, 244
<i>Celsr2</i>	<i>Celsr2gt</i>	Les hétérozygotes sont normaux et fertiles. Les homozygotes sont fertiles, sauf pour	241, 243

		<b>certaines femelles atteintes d'atrésie vaginale et ils ont une trajectoire anormale durant la migration des neurones FBM. Ils développent une hydrocéphalie due à une ciliogenèse épendymaire défectueuse.</b>	
	<b><i>Celsr2 KO</i></b>	<b>Les hétérozygotes sont normaux et fertiles. Les homozygotes sont fertiles, mais ont une migration des neurones FBM anormale.</b>	<b>241</b>
<b><i>Celsr3</i></b>	<b><i>Celsr3 KO</i></b>	<b>Les hétérozygotes sont normaux et fertiles. Les homozygotes meurent quelques heures après la naissance et ont un sévère défaut axonal.</b>	<b>241, 243, 245</b>

**Tableau 3** : Sommaire des différents phénotypes développés chez les souris mutantes pour les gènes *Celsr1-3*. FBM : facial branchiomotor.

## 2. Projet de recherche

### 2.1 Problématique

Les anomalies du tube neural représentent l'une des malformations congénitales les plus fréquentes au Canada et constituent, après les malformations cardiaques, la deuxième malformation congénitale en importance associée à une mortalité dans la période périnatale immédiate au Canada (262, 263). Ces anomalies se constituent très tôt au cours de la grossesse, lors de la troisième et de la quatrième semaine de vie embryonnaire. Au Canada, l'incidence des ATNs se situe entre 1 et 4 cas pour 1000 naissances vivantes. Le taux le plus élevé se retrouve dans les provinces atlantiques et diminue à mesure qu'on se déplace vers l'ouest (264-267).

Les enfants vivants et atteints présentent des problèmes à long terme, qui requièrent des soins multidisciplinaires. Pour un taux annuel approximatif de 800 naissances atteintes de

spina bifida, au Canada, l'incidence économique directe relative aux soins médicaux en lien avec les ATNs est estimée à 1,7 million de dollars par année, sans compter les coûts des soins aux enfants souffrants d'anencéphalie et les coûts psychosociaux qu'assument les familles (267-269).

Un supplément en acide folique pour les femmes enceintes aide à diminuer la prévalence de ces malformations (260). La difficulté de la mise en œuvre de cette prévention réside dans le fait qu'elle doit débiter avant même que la femme soit enceinte. Aussi, environ la moitié des grossesses en Amérique du Nord ne sont pas planifiées. Il convient donc de conclure que cette prévention n'est pas absolue, mais qu'elle devrait seulement contribuer à réduire le nombre de cas porteurs de ce type de malformations. Des facteurs génétiques et environnementaux interviennent également. Actuellement, les données sur les gènes impliqués dans le développement des ATNs restent largement inconnus (261). Étudier et comprendre la génétique des ATNs contribueront fortement à mieux conseiller les familles à risque et à prévenir de ces faibles anomalies congénitales.

## **2.2. Hypothèse et objectifs**

Notre travail a pour but de comprendre la base moléculaire de la pathologie des anomalies du tube neural par l'identification des gènes potentiellement impliqués.

Notre hypothèse est que les membres de la voie de signalisation canonique et non-canonique du Fz/Dvl sont impliqués dans le développement des ATNs chez l'humain, plus particulièrement les gènes *CELSRI*, *DIVERSIN* et *LRP6*.

Notre projet de recherche implique l'analyse génétique moléculaire de ces trois gènes de la voie PCP et se développera sur 3 principaux objectifs :

(1) L'analyse de séquençage du gène *CELSRI* dans une cohorte bien caractérisée des ATN, suivi par des validations génétiques et bioinformatiques des mutations rares identifiées dans ce gène chez les ATN.

(2) L'analyse de séquençage du gène *DIVERSIN* dans une cohorte bien caractérisée des ATN, suivi par des validations génétiques, bioinformatiques et fonctionnelles des mutations rares identifiées dans ce gène chez les ATN.

(3) L'analyse de séquençage du gène *LRP6* dans une cohorte bien caractérisée des ATN, suivi par des validations génétiques, bioinformatiques et fonctionnelles des mutations rares identifiées dans ce gène chez les ATN.

### **2.3. Pertinence et retombées**

Cette étude permettra l'identification de nouveaux gènes prédisposants aux ATN et proposera un moyen puissant qui aidera à mieux comprendre les mécanismes pathogéniques impliqués dans ces anomalies toujours très peu connues. Ces études sont autant nécessaires afin de caractériser et d'expliquer le type d'interactions qui existe entre les gènes et l'environnement dans les ATN, ce qui fournira des outils pour développer de nouvelles stratégies de prévention et facilitera ainsi au conseil génétique d'identifier les couples à risque.

### **3. Novel mutations in *Lrp6* orthologues in mouse and human neural tube defects affect a highly dosage-sensitive Wnt non canonical planar cell polarity pathway**

Redouane Allache<sup>†,1</sup>, Stéphanie Lachance<sup>†,1</sup>, Marie Claude Guyot<sup>1</sup>, Patrizia De Marco<sup>2</sup>, Elisa Merello<sup>2</sup>, Monica J. Justice<sup>3</sup>, Valeria Capra<sup>2</sup> and Zoha Kibar<sup>\*,1</sup>

Hum Mol Genet. 2014 Aug 1;23(15):4185.

<sup>1</sup>CHU Sainte Justine Research Center and University of Montréal, Montréal, Québec H3T 1C5 Canada; <sup>2</sup>U.O. Neurochirurgia, Istituto Giannina Gaslini, Genova, 16147, Italy; <sup>3</sup> Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030 USA

<sup>†</sup>Contributed equally to the work

\* Correspondence to Zoha Kibar, University of Montréal, Department of Obstetrics and Gynecology, CHU Sainte Justine Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine, Room A711, Montreal, QC H3T 1C5 Canada; Tel: (514) 345 4931 X 3984; Fax: (514) 345 4801.

## **Apport de coauteurs**

### **Redouane Allache:**

L'analyse bioinformatique des mutations identifiées chez la souris et l'humain

La validation fonctionnelle des mutations, spécifiquement: (1) La conception et la réalisation des expériences des essais TOPFLASH/pGL3-OT et TCF/LEF1-Wnt/ $\beta$ -catenin décrites dans l'article, (2) une partie des expériences de biologie moléculaire, (3) Préparation des lysats de cellules et analyse par buvardage de western (western blot), (4) entretien des cultures cellulaires.

Les analyses statistiques liées à mes expériences.

La conception et la préparation des figures et tableaux liées à mes expériences

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

### **Stéphanie Lachance:**

Cartographie par homozygotie et clonage positionnel.

Séquençage du gène *LRP6* chez la souris SKax<sup>26m1Jus</sup>

Séquençage du gène *LRP6* dans 285 patients atteints par des ATN qui ont fait l'objet de l'étude et dans 275 contrôles.

Une partie des expériences de biologie moléculaire

Les analyses statistiques liées à ses expériences

### **Marie Claude Guyot :**

Entretien et phénotypage de souris

Extraction d'ADN et géotypage de souris

Immunohistochimie de la cochlée et l'analyse de l'orientation des stéréocils

Les analyses statistiques liées à ses expériences

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

Le recrutement du groupe de 285 patients italiens inclus dans cette étude ainsi que des 275 contrôles italiens

**Monica Justice:** Nous avoir fourni la souris Skax26<sup>m1Jus</sup>

**Zoha Kibar:**

La conception du projet et la supervision des expériences décrites dans l'article.

Le soutien scientifique, technique et matériel pour le déroulement et la réalisation des expériences.

La rédaction du manuscrit.

## ABSTRACT

Wnt signaling has been classified as canonical Wnt/  $\beta$ -catenin dependent or non-canonical planar cell polarity (PCP) pathway. Misregulation of either pathway is linked mainly to cancer or neural tube defects (NTDs) respectively. Both pathways seem to antagonize each other and recent studies have implicated a number of molecular switches that activate one pathway while simultaneously inhibiting the other thereby partially mediating this antagonism. The lipoprotein receptor-related protein *Lrp6* is crucial for activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway but its function in Wnt/PCP signaling remains largely unknown. In this study, we investigate the role of *Lrp6* as a molecular switch between both Wnt pathways in a novel ENU mouse mutant of *Lrp6* (*Skax26<sup>m1Jus</sup>*) and in human NTDs. We demonstrate that *Skax26<sup>m1Jus</sup>* represents a hypermorphic allele of *Lrp6* with increased Wnt canonical and abolished PCP-induced JNK activities. We also show that *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* genetically interacts with a PCP mutant (*Vangl2<sup>Lp</sup>*) where double heterozygotes showed an increased frequency of NTDs and defects in cochlear hair cells' polarity. Importantly, our study also demonstrates the association of rare and novel missense mutations in *LRP6* that is an inhibitor rather than an activator of the PCP pathway with human NTDs. We show that three *LRP6* mutations in NTDs led to a reduced Wnt canonical activity and enhanced PCP signaling. Our data confirm an inhibitory role of *Lrp6* in PCP signaling in neurulation and indicate the importance of a tightly regulated and highly dosage sensitive antagonism between both Wnt pathways in this process.



## Introduction

Wnt Signaling plays key roles in regulating various aspects of embryonic development from embryo patterning and cell specification, to regulation of cell movements and tissue polarity (1). Binding of the Wnt ligand to a cell surface receptor can stimulate a range of intracellular signaling pathways, of which the two best studied are the canonical Wnt  $\beta$ -catenin dependent pathway and the non-canonical planar cell polarity (PCP) pathway (1, 2). In the canonical pathway, Wnt binds to Frizzled (Fz) receptor and the lipoprotein receptor-related protein (LRP)-5/6 to induce their clustering on Dishevelled (Dvl) and to form endocytic '(LRP)-5/6 signalosomes'. These complexes then destabilize the  $\beta$ -catenin destruction complex that constitutively targets  $\beta$ -catenin for poly-ubiquitination and degradation in the proteasome. When the  $\beta$ -catenin destruction complex is destabilized,  $\beta$ -catenin accumulates in the nucleus, where it binds to members of TCF/LEF-1 transcription factor family, preventing their repression of gene transcription and functioning as a transcription co-activator (1, 2). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway has a crucial role in mediating cell proliferation and cell fate determination during development and defects in this pathway have been strongly associated with many types of cancer in humans (1).

The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway shares the Fz receptors and the scaffolding proteins Dvl with the non canonical Wnt/PCP signaling pathway (1). The latter regulates the process of PCP by which cells become polarized in the plane of an epithelium (3). PCP signaling has been well studied in the adult wing hairs and ommatidia (eye units) in *Drosophila* and includes a group of "core" PCP genes including *fz*, *dsh* and *vang gogh/strabismus (vang/stbm)* (3). Downstream effectors of this pathway include the small GTPases of the RhoA family and JNK that upon activation lead to a variety of cellular responses including cytoskeletal rearrangements (4). In vertebrates, PCP signaling controls the morphogenetic process of convergent extension (CE) during gastrulation and neurulation (5, 6). This pathway is highly dosage sensitive where over- or under-expression of PCP genes in zebrafish and *Xenopus* lead to CE defects (7, 8). Studies in animal models and human cohorts have strongly implicated the non canonical Wnt/ PCP signaling pathway in the pathogenesis of neural tube defects (NTDs) (9–11).

NTDs represent a group of very common congenital malformations in humans, affecting 1-2 infants per 1000 births. They are caused by a partial or complete failure of neural tube closure during embryogenesis and can occur at any level along the rostrocaudal axis (9). The most common forms of NTDs are referred to as open NTDs and include anencephaly, and myelomeningocele (spina bifida), which result from the failure of fusion in the cranial and spinal region of the neural tube, respectively (9). A number of skin-covered (closed) NTDs are categorized clinically depending on the presence (including lipomyeloschisis, lipomyelomeningocele, and meningocele) or absence of a subcutaneous mass (including dermal sinus and caudal agenesis) (12). Population and family studies indicate a complex etiology to NTDs involving environmental and genetic factors. To date, the number, identity and relative contribution of such genes to NTDs remain largely unknown (9, 10)

Both Wnt pathways seem to antagonize each other, and inhibiting one will simultaneously activate the other (2). The direction of Wnt signaling and this antagonistic crosstalk are highly dependent on cellular context and on the presence of an intricate and large network of Wnt receptors, co-receptors and regulators (2). Recent studies have identified a group of “molecular switches” that act on both pathways simultaneously (2, 13–15). For example, while *Lrp5* or *Lrp6* is crucial for activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway, it was shown in *Xenopus* that it could simultaneously inhibit the non-canonical pathway (16, 17). *Lrp6* is a type I single-span transmembrane protein that belongs to the LDL receptor (LDLR) family which has diverse roles in metabolism and development (18). It consists of four YWTD  $\beta$ -propeller domains that are each followed by an EGF-like domain, followed by 3 LDL-receptor (LDLR) type A repeats, a transmembrane domain and a short intracellular domain (18). Complete inactivation of *Lrp6* in mouse generated multiple defects in many organs including eye, limb, heart, neural tube and brain, and cause perinatal mortality (19, 20). A spontaneous *Lrp6<sup>ts</sup>* allele caused skeletal malformations, osteoporosis and spina bifida (21) while two hypermorphic alleles, one ENU-induced (*Lrp6<sup>Gw</sup>*) (22) and one spontaneous (*Lrp6<sup>Cd</sup>*), caused a reduced forebrain size or exencephaly respectively (22, 23). Although the role of *Lrp6* in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during development is well established, its role in the PCP pathway remains poorly defined.

Here we conducted *in vivo* and *in vitro* studies in mouse and in cell lines to further investigate the role of *Lrp6* as a molecular switch between both Wnt pathways in neural tube closure. We characterized a new ENU hypermorphic allele of *Lrp6*, *Skax26<sup>m1Jus</sup>*, that demonstrated an inhibitory role of *Lrp6* in PCP signaling as manifested by an increased Wnt canonical activity and abolished PCP-induced JNK activity. We showed that *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* genetically interacts with a PCP mutant *Vangl2<sup>Lp</sup>* in PCP signaling in neural tube closure and planar polarity of the inner ear hair cells. Also importantly, our study demonstrates the association of rare and novel mutations in *LRP6* with human NTDs. Particularly, we show that three of these mutations caused a reduced Wnt canonical activity and enhanced PCP signaling, thereby confirming a dosage effect of *LRP6* in PCP signaling in neurulation.

## RESULTS

### Cloning of the gene mutated in *Skax26<sup>m1Jus</sup>*

*Skax26<sup>m1Jus</sup>* (MGI: 3577510) was identified as a recessive ENU mouse mutant with a homozygous kinky/looped tail phenotype at the Mouse Mutagenesis and Phenotyping Center for Developmental Defects in Texas Medical Center in Houston. This mutant was generated on a mixed C57BL/6J; 129S6/SvEvTac genetic background as part of the chromosome 4 balancer mutagenesis screens (24). G3 mutants from this line were archived as frozen sperm and were consequently recovered at The Jackson Laboratory by using the Assisted *In Vitro* Fertilization method. A total of 2 female and 5 male mice with a normal appearance were generated. To expand the *Skax26<sup>m1Jus</sup>* mutant line, these 7 founder mice were backcrossed to 129S6/SvEvTac for one generation (backcross 1) followed by 4 generations of brother sister matings. A total of 112 N1F1-N1F4 mice were obtained including 11 mice with a kinky/looped tail that were used for subsequent genetic mapping studies.

To map the gene defective in *Skax26<sup>m1Jus</sup>*, mice with a kinky/looped tail phenotype were subjected to 3 additional consecutive backcrosses to 129S6/SvEvTac combined with brother-sister matings at each backcross to recover the tail phenotype. A total of 37 mice were genotyped with 149 single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed across the genome

and that were informative for both C57BL/6J; 129S6/SvEvTac strains. Homozygosity mapping identified one SNP rs13479079 located at 140.1 Mb at the telomeric end of chromosome 6 that was homozygous for the C57BL/6J allele in 84% of genotyped mutant mice (Figure 1A). To fine map this candidate region, we conducted additional genotyping of the same 37 mutant mice with 16 informative SNPs spanning a 23.4 Mb region defined by rs6200835 at 125.7 Mb and rs30113154 at 149.1 Mb at the telomeric end of chromosome 6. Haplotype analysis identified a homozygous region spanning rs3023102 and rs4226339 (haplotypes 1 to 6) and segregating with the phenotype in 86% of genotyped mice (32/37) (Figure 1B). Importantly, we detected one crossover (haplotype 7) that would place the gene responsible for the *Skax26*<sup>m1Jus</sup> phenotype centromeric to rs3023102 at 135.3 Mb (Figure 1B). The mutant with this critical crossover along with 3 other mutant mice (haplotype 8) with a kinky/looped tail phenotype were heterozygous at B6 alleles suggesting that the *Skax26*<sup>m1Jus</sup> mutation could cause a phenotype in a heterozygous state at a low penetrance.

Just 0.9 Mb centromeric to rs3023102 resides the *Lrp6* gene (Accession NM\_008514.4) that represents an excellent candidate for *Skax26*<sup>m1Jus</sup>. We consequently sequenced the open reading frame and exon-intron junctions of this gene in 3 *Skax26*<sup>m1Jus</sup>/*Skax26*<sup>m1Jus</sup> mutants and 3 wild-type controls. We identified a homozygous missense mutation c.2042T>G in exon 9 of *Lrp6* in *Skax26*<sup>m1Jus</sup>/*Skax26*<sup>m1Jus</sup> that was absent in parental strains, C57BL/6 and 129S6/SvEvTac, and in 30 other inbred strains (Figure 1C). This mutation leads to p.Ile681Arg that resides in the third  $\beta$  propeller domain in the extracellular part of the protein. Ile681 is highly conserved across vertebrates where it is only replaced by valine in frog *Lrp6* and by phenylalanine in fly *Arrow* (Figure 1D). While a change to valine or phenylalanine preserves the hydrophobic nature of isoleucine, the change to arginine in *Skax26*<sup>m1Jus</sup> is not conservative as it introduces a positive charge and a hydrophilic residue at this otherwise neutral position.

Genotype-phenotype studies were next conducted to assess the penetrance of the *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> p.Ile681Arg mutation. A total of 112 N1F1-N1F4 mice and 99 N5F1 mice were examined for the presence of Kinky/looped tail (Table 1). The *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> p.Ile681Arg mutation showed a recessive mode of inheritance where all wild-type were phenotypically normal and heterozygous and homozygous adult mice had a looped/kinky tail appearance with

a variable penetrance (Table 1). In N1F1-N1F4 mice, the penetrance of the looped/kinky tail was 3% in heterozygotes and 11% in homozygotes. Following 4 additional backcrosses to 129S6SvEvTac, this penetrance increased to 8% in heterozygotes and 53% in homozygotes (Table 1). To determine whether the *Lrp6* p.Ile681Arg mutation can cause an NTD phenotype, as previously reported for other *Lrp6* mutations and knockouts (23, 21, 20, 19), a total of 30 heterozygous and 47 homozygous E12.5-E18.5 embryos recovered at N5F1 were examined macroscopically for the presence of an NTD and none was found to be affected with this malformation (Table 1).

## Functional analysis of *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> in Wnt canonical and non canonical pathways

*Lrp6* is a co-receptor of Frizzled that mediates Wnt-induced activation of the transcription factor family TCF/LEF-1 during Wnt canonical  $\beta$ -catenin signaling (18). We consequently tested the effect of the variant p.Ile681Arg detected in *Lrp6* on this signaling pathway using a TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin reporter assay in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) isolated from E13.5 mutant embryos and in mammalian HEK293T cells. Heterozygous and homozygous MEFs showed an increased reporter activity of ~1.4X and ~3X respectively as compared to wild-type fibroblasts ( $P < 0.05$  and  $P < 0.00001$  respectively) (Figure 2A). In HEK293T cells, TCF/LEF-1 activity was significantly increased to ~2X in cells transfected with *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> cDNA as compared to wild-type *Lrp6* ( $P < 0.005$ ) (Figure 2D), consistent with results obtained in MEFs. This increased activity of *Lrp6* in mutant MEFs or HEK293T cells was not caused by increased protein expression levels (Figure 2C, F). These data demonstrate that the *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> mutant represents a hypermorphic allele that over-activates Wnt canonical  $\beta$ -catenin signaling.

*Lrp6* can act also as an inhibitor of the Wnt non canonical PCP pathway in *Xenopus* (16, 17). To determine whether the hyperactive *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> allele will also over-inhibit PCP signaling in mouse, we measured the JNK activity in the presence of Wnt5a in wild-type and mutant MEFs using an JNK-AP-1 reporter assay. In wild-type E13.5 MEFs, Wnt5a-induced JNK activity was increased to 2.5X. This activity reduced by half in *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> heterozygous

cells and completely absent in  $Lrp6^{Skax26-Jus}$  homozygous cells as compared to wild-type cells ( $P<0.05$ ) (Figure 2B). These data confirm that  $Lrp6^{p.Ile681Arg}$  in  $Lrp6^{Skax26-Jus}$  represents a novel hypermorphic allele of  $Lrp6$ .

## Genetic interaction studies between $Lrp6^{Skax26-Jus}$ and $Vangl2^{Lp}$

We next tested for genetic interaction between  $Lrp6^{Skax26-Jus}$  and a PCP mutant called  $Vangl2^{Lp}$  that carries a loss of function mutation, p. Ser464Asn, in a core PCP gene called  $Vangl2(25)$ . We crossed  $Lrp6^{Skax26-Jus}$  heterozygous or homozygous mice to  $Vangl2^{Lp}$  heterozygous mice and examined for the presence of NTDs in double heterozygous embryos. Whereas mice heterozygous for either mutation showed no evidence for NTD, 36% of the double heterozygotes exhibited spina bifida ( $P<0.001$ ) (Table 2, Fig. 3A,B). This genetic interaction was specific, as  $Vangl2^{Lp}$  heterozygotes crossed to wild-type littermates of the  $Lrp6^{Skax26-Jus}$  animals did not produce any progeny with NTDs (Table 2). An increase in frequency of kinky/looped tail was also observed in double heterozygotes (80%) as compared to single heterozygotes at either loci (3% in N1 and 8% in N5 in  $Lrp6^{Skax26-Jus}/+$  and 40% in  $Vangl2^{Lp}/+$ ) ( $P<0.005$ ) (Tables 1 and 2).

PCP signaling also controls the orientation of hair cells in the cochlea of the inner ear (26). The cochlea has one row of inner hair cells and three rows of outer hair cells, which are interlinked with non-sensory support cells. Each hair cell forms a unique “V”-shaped stereociliary bundle and all vertices of these hair bundles point toward the periphery of the cochlea. PCP mutants, including  $Vangl2^{Lp}/Vangl2^{Lp}$  homozygotes, display defects in this planar organization (27, 28). We next analyzed genetic interaction between  $Lrp6^{Skax26-Jus}$  and  $Vangl2^{Lp}$  in inner ear cell polarity. We examined cochleae isolated from wild-type,  $Lrp6^{Skax26-Jus}/+$ ,  $Lrp6^{Skax26-Jus}/Lrp6^{Skax26-Jus}$  and  $Lrp6^{Skax26-Jus}/+$ ;  $Vangl2^{Lp}/+$  E18.5 embryos at the apical, middle and basal regions of the organ of Corti. No statistically significant difference in the orientation of IHC and OHC was detected between wild-type and  $Lrp6^{Skax26-Jus}/+$  (data not shown). In  $Lrp6^{Skax26-Jus}/Lrp6^{Skax26-Jus}$ , bundle orientation was affected as compared to wild-type controls only in the OHC3 layer of the apical region ( $\chi^2$  test,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 3C). In

*Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup>/+; *Vangl2*<sup>Lp</sup>/+ double heterozygotes, bundle orientation was severely affected in OHC2 and OHC3 layers at all 3 regions analyzed except for OHC3 in the middle region of the organ of Corti ( $\chi^2$  test,  $P < 0.01$  for OHC2 in all regions and OHC3 at the base and  $P < 0.0001$  for OHC3 at the apex) (Fig. 3C). These data confirm a genetic interaction between *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> and *Vangl2*<sup>Lp</sup> in Wnt non canonical PCP signaling.

## Sequencing analysis of human *LRP6* in NTD patients

The genetic interaction between *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> and *Vangl2*<sup>Lp</sup> demonstrated in this study as well as the NTD phenotype associated with *Lrp6* mouse mutants and the hypothesized role of *Lrp6* as an inhibitor of the PCP pathway prompted us to examine *LRP6* for a role in the pathogenesis of NTDs in humans. The open reading frame and the exon-intron junction of *LRP6* were sequenced in a cohort of 285 Italian patients affected with various types of open and closed forms of NTDs. The exact distribution of NTD type in the patients' cohort is detailed in Subjects and Methods. We identified 4 novel rare missense mutations, c.916T>C, c.1118A>G, c.4157T>G and c.4622G>T, in *LRP6* in 4 NTD patients that were not present in 275 ethnically-matched controls or in public databases (Supplementary Material, Table S1). Each of these mutations was detected in a heterozygous state and was private. None of the mutations mapped close to the exon-intron junctions and hence most likely do not affect gene splicing. The ORF and exon-intron junctions of *LRP6* were also sequenced in 95 Italian controls and no novel mutation was detected in this gene in controls.

The variant c.916T>C was detected in a 20 year old male affected with a severe form of open NTDs called myelomeningocele in the lumbosacral region of the spine (Supplementary Material, Table S1). This variant changes a highly conserved Tyr residue in the EGF-like domain 1 into histidine (p.Tyr306His) (Figure 4). A tyrosine to histidine change is conservative however it could introduce a positively charged amino acid at an otherwise neutral hydrophobic position. The variant c.1118A>G was detected in a 15 year old female affected with lumbosacral myelomeningocele and Chiari malformation II (Supplementary Material, Table S1). This variant leads to p.Tyr373Cys in the seventh YWTD  $\beta$ -propeller domain (Fig 4A). Tyr373 is highly conserved and a tyrosine to cysteine substitution is not

conservative as it introduces a cysteine side chain at this position. The variant c.4157T>G was detected in a 10 year old female affected with a severe form of closed NTDs called encephalocele at the parietal lobe of the brain. This type of NTDs is characterized by protrusions of the brain through the skull that are sac-like and covered with membranes (29). The variant c.4157T>G affects a highly conserved valine residue at position 1386 in the transmembrane domain of the protein (Figure 4). This leads to a p.Val1386Leu substitution that is conservative as both residues have very similar structures. The variant c.4622G>T was detected in an 11 year old female affected with a severe form of closed NTDs called caudal agenesis that represents a heterogeneous constellation of anomalies comprising total or partial agenesis of the spinal column, anal imperforation, genital anomalies, bilateral renal dysplasia or aplasia, pulmonary hypoplasia, and lower limb abnormalities (12). This variant changes a highly conserved tyrosine at position 1541 in the cytoplasmic domain of LRP6 between the second and third PPPSP phosphorylation motifs and leads to a nonconservative p.Tyr1541Cys substitution.

### ***Functional validation of LRP6 variants detected in NTD patients***

To determine whether any of the four LRP6 variants detected in NTD patients, *LRP6<sup>p.Tyr306His</sup>*, *LRP6<sup>p.Tyr373Cys</sup>*, *LRP6<sup>p.Val1386Leu</sup>*, and *LRP6<sup>p.Tyr1541Cys</sup>* affects the function of LRP6 in both Wnt canonical and non canonical pathways, we conducted TCF responsive Wnt/ $\beta$ -catenin and AP1 responsive JNK reporter assays respectively in mammalian cells (HEK293T). In the presence of Wnt3A, TCF/LEF-1 activity was increased to ~6X upon transfection of wild-type LRP6, in agreement with previous studies (Figure 5A). In contrast, TCF/LEF-1 activity was significantly decreased in cells transfected with each of the *LRP6<sup>p.Tyr306His</sup>*, *LRP6<sup>p.Tyr373Cys</sup>* and *LRP6<sup>p.Val1386Leu</sup>* cDNAs, as compared to wild-type *Lrp6*, suggesting a hypomorphic activity for each of these mutants (P<0.05) (Figure 5A). TCF/LEF-1 activity was not affected in HEK293T cells transfected with the *LRP6<sup>p.Tyr1541Cys</sup>* (Figure 5A). Protein expression levels for all LRP6 variants were comparable to the wild-type (Figure 5B).



While the function of *Lrp6* as inhibitor of PCP signaling was deduced from phenotypic effects of abolishing or over-expressing its activity in *Xenopus* (17, 16), how and where exactly it exerts this inhibitory function is not known. We transfected HEK293T with a full-length myc-tagged *DVL3* or *VANGL2* construct as activators of the PCP pathway in the presence of Wnt5a that was added exogenously. JNK activity was increased to ~5.5X and ~3.5X upon transfection of *DVL3* and *VANGL2* respectively in the presence of Wnt5a. This activation was inhibited upon co-transfection of wild-type *LRP6* cDNA in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$  at all doses as compared to *DVL3* or *VANGL2* alone in the presence of Wnt5a) (Figure 5C). We next tested the effect of the mouse *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> and the four *LRP6* variants detected in human NTDs on their ability to inhibit JNK activation by Wnt5a and *DVL3*. Co-transfection of the *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> cDNA with *DVL3* resulted in a significant increase in its ability to inhibit JNK activation during PCP signaling, confirming its hypermorphic activity ( $P < 0.05$ ) (Figure 2E). Co-transfection of each of *LRP6*<sup>p.Tyr306His</sup>, *LRP6*<sup>p.Tyr373Cys</sup> and *LRP6*<sup>p.Val1386Leu</sup> with *DVL3* resulted in a significant reduction in its ability to inhibit JNK activation during PCP signaling. On the other hand, *LRP6*<sup>p.Tyr1541Cys</sup> behaved like the wild-type in this assay.

Our results in both readouts assays are consistent with the idea that *LRP6*<sup>p.Tyr306His</sup>, *LRP6*<sup>p.Tyr373Cys</sup> and *LRP6*<sup>p.Val1386Leu</sup> act as hypomorphs and *LRP6*<sup>p.Tyr1541Cys</sup> acts in Wnt signalling as the wild-type *LRP6*.

## Discussion

### *Skax26*<sup>m1Jus</sup> is a new hypermorphic allele of *Lrp6*

Many lines of evidence support our conclusion that *Lrp6* is the gene defective in *Skax26*<sup>m1Jus</sup>. *Lrp6* maps to the *Skax26*<sup>m1Jus</sup> candidate region identified by homozygosity mapping on chromosome 6. *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> carries a disease-specific variant, p.Ile681Arg, that was absent in parental strains and in 30 other inbred strains. This variant affects *Lrp6* function since it caused enhanced Wnt canonical  $\beta$ -catenin signaling and abolished PCP-induced JNK activation in homozygous MEFs. Ile681 maps to the third YWTD  $\beta$ -propeller domain, similar

to the variant p.Arg886Trp identified in the ENU *Rs* mutant. The  $\beta$ -propeller-EGF-like domains in *Lrp6* appear to bind extracellular ligands and particularly the region encompassing the third and fourth YWTD  $\beta$ -propeller-EGF-like domains of *Lrp6* was demonstrated to interact with Dickkopf1 (*Dkk1*) (18, 30, 31). *Dkk1* antagonizes Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through interactions with *Lrp6* and is able to activate the PCP pathway in both *Xenopus* and zebrafish (32). The p.Ile681Arg variant in *Lrp6* could affect its interaction with *Dkk1* or other unknown mediators leading to over-activation of the Wnt pathway and inhibition of the PCP pathway. Additional biochemical and *in silico* tests are needed to test the potential pathogenic effect of this variant.

All previously studied mouse mutants at *Lrp6* except *Lrp6*<sup>Gw</sup> were reported to suffer from severe developmental anomalies in various organs including eye, limb, heart, neural tube and brain (19, 20, 23, 21). We did not encounter any severe malformation in either heterozygous or homozygous *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> embryos suggesting that either this allele could exert a milder effect on protein function or this could reflect the presence of genetic modifiers in the various backgrounds of the *Lrp6* mutants. While *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> is on a mixed C57BL/6J;129S6/SvEvTac background, the other *Lrp6* alleles, *Lrp6*<sup>cd</sup>, *Lrp6*<sup>Gw</sup> and *Lrp6*<sup>rs</sup>, were on mixed DBA/2;A/J (23), C3H/HeH (22) and mixed BALB/C; C57BL/6J (21) backgrounds respectively.

### ***Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> interacts genetically with *Vangl2*<sup>Lp</sup>**

The genetic interaction between *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> and *Vangl2*<sup>Lp</sup> in neural tube closure and inner ear hair cells' planar polarity provides evidence that both genes function in a common genetic pathway or in two parallel pathways to regulate these developmental processes. Spina bifida was absent from single heterozygotes and was detected in 36% of their double heterozygous littermates. These data show that the mutant kinky/looped tail and NTD phenotypes in *Vangl2*<sup>Lp</sup> caused by diminished PCP signaling were enhanced by a hyperactive *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> allele that over-inhibits this pathway. These results also strongly suggest that the tail kink or looping observed in *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> heterozygotes is associated with a gain of *Lrp6* function as an inhibitor of the Wnt non canonical PCP pathway due to the *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup>

mutation, rather than an effect of an increased activation of the Wnt/  $\beta$ -catenin canonical pathway. Our observations are supported by a recent study in gain (*Lrp6<sup>cd</sup>*) and loss (*Lrp6<sup>-/-</sup>*) of function mouse lines that demonstrated Lrp6 can mediate non-canonical pathways involving RhoA dependent mechanisms during neurulation (33).

Genetic interaction between *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* and *Vangl2<sup>Lp</sup>* does not seem as strong as that reported between *Vangl2<sup>Lp</sup>* and mouse mutants at other PCP loci notably *Scribble1* (*Circle* or *Crc*) and *Dvl3*. A subset of *Vangl2: Scribble1* and *Vangl2:Dvl3* double heterozygotes developed the more severe craniorachischisis where the neural tube remains open throughout the spinal cord (34, 35). On the other hand, *Vangl2:Ptk7* (another PCP gene) double heterozygotes develop spina bifida (36), suggesting that either *Lrp6* or *PTK7* alleles exert a weaker effect on protein function or the dosage of *Lrp6* or *Ptk7* is less limiting than that of *Scrib1* or *Dvl3* or that there may be different genetic modifiers in the various background strains.

## ***Novel rare mutations in LRP6 are associated with human NTDs***

We and others have previously demonstrated an important role for PCP signaling in the pathogenesis of NTDs where novel and rare mutations in PCP genes including *VANGLI1*, *PK1*, *FZD6*, *FUZZY*, *SCRIBBLE1* and *CELSRI*, were associated with NTDs in a subset of patients (37–42). All these genes are activators of the PCP pathway and some mutations were hypothesized to be hypomorphic. In this study and for the first time we demonstrate the presence of rare and novel mutations associated with NTDs (1.4% or 4 in 285 patients) in an inhibitor of the PCP pathway that is *LRP6*. This frequency of 1.4% of novel potentially pathogenic mutations in *LRP6* in NTD patients is very similar to the previously reported mutation frequencies for other PCP genes in NTDs. All 4 patients were affected with severe forms of open (2 MMC), and closed (1 encephalocele, 1 caudal agenesis) NTDs. As compared to other PCP genes previously associated with NTDs, no *LRP6* mutation was detected in the mild forms of closed spinal NTDs. Re-sequencing analysis of *LRP6* in a larger cohort is needed to further investigate this observation.

Our results in both Wnt canonical and noncanonical readouts assays are consistent with the hypothesis that LRP6<sup>p.Tyr306His</sup>, LRP6<sup>p.Tyr373Cys</sup> and LRP6<sup>p.Val1386Leu</sup> act as hypomorphs and LRP6<sup>p.Tyr1541Cys</sup> acts in Wnt signalling as the wild-type LRP6. The latter is either not pathogenic or it exerts a very mild effect that could not be detected by these reporter assays. Enhanced or diminished PCP signaling was previously demonstrated to cause PCP defects but only in zebrafish and frog models. Our study indicates the importance of a precise regulation of dosage in PCP signaling in neural tube closure in humans.

The molecular impact of these 3 hypomorphic variants on the function of LRP6 can be deduced from the known function of the specific domains of the protein to which they map. Lrp6<sup>p.Tyr306His</sup> and Lrp6<sup>p.Tyr373Cys</sup> are located in the first EGF-like domain and in the second propeller domain (PD) of LRP6 respectively. The first two YWTD  $\beta$ -propeller EGF-like domains bind to canonical Wnts and seem to mediate the Wnt–Fz interaction during Wnt canonical signaling (18). These two domains also bind to the Wise family of proteins which antagonize Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through interactions with Lrp6 (31). LRP6<sup>p.Tyr306His</sup> and LRP6<sup>p.Tyr373Cys</sup> might alter the interaction of LRP6 with Wnt-Fz negatively or with Wise proteins positively to reduce the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling activity and to reciprocally activate the noncanonical PCP pathway. The variant LRP6<sup>p.Val1386Leu</sup> maps to the transmembrane domain of LRP6. Leucine is a hydrophobic amino acid possessing similar structure to valine but longer side-chain. This mutation was predicted to be possibly damaging with Polyphen despite the fact that it is a substitution to a similar amino acid. Clearly, additional tests are needed to investigate and better define the pathogenic nature of these four LRP6 variants.

### ***Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin and non-canonical Wnt/PCP signaling: two antagonistic and highly dosage sensitive pathways***

Genetic studies in various animal models demonstrated the existence of a reciprocal antagonism between both Wnt pathways where inhibiting one pathway will simultaneously activate the other one. For example, in zebrafish, maternal loss of *wnt5b* resulted in ectopic  $\beta$ -catenin signaling and a consequent increase in dorsal cell fates (43, 44). In *Xenopus*,

knockdown of *Lrp6* and its homologue *Lrp5* resulted in PCP defects that were rescued by knockdown of noncanonical *XWnt5a* and *XWnt11* (16, 17). In mouse, knockdown of *Lrp6* led to PCP defects including exencephaly and heart defects, that were rescued by loss of *Wnt5a*, suggesting that these phenotypes could result from noncanonical Wnt gain-of-function (45). In this study, we identified 4 mutations in *Lrp6* orthologues (one in mouse and three in humans) in NTDs that affected both Wnt pathways in a reciprocal manner, thereby presenting additional evidence for the existence of such dosage-sensitive antagonism between Wnt pathways in neurulation.

### ***LRP5 and LRP6: homologues with a pleiotropic role in human diseases***

Mutations in *LRP6* gene have been implicated in late-onset Alzheimer's disease and familial coronary artery disease associated with diabetes and osteoporosis syndrome (46, 47). In this study, we extend the mutational spectrum of *LRP6* to another complex trait, NTDs, demonstrating a crucial but pleiotropic role of this gene in developmental diseases. *LRP6* has a homologous gene *LRP5* that shares 73% and 64% identity in extracellular and intracellular domains, respectively (18). *Lrp5* knockout mice have normal embryogenesis and grow to adulthood but show osteoporosis and some metabolic abnormalities. An allelic series of mouse mutants suggested that *Lrp5* and *Lrp6* share significant overlapping functions but that *Lrp6* plays a more crucial role, at least during embryogenesis (18). In humans, *LRP5* mutations underlie familial osteoporosis, high bone density syndromes and ocular disorders (18). Interestingly, *Lrp5* was also shown to act as a physiologically relevant inhibitor of non-canonical Wnt PCP signaling during *Xenopus* development in vivo (16). These studies represent *LRP5* as a good candidate gene for human NTDs. Additional molecular genetic studies of *LRP5* and *LRP6* in human NTD cohorts and animal models are needed to better dissect their roles in normal and abnormal neurulation.

## Materials and Methods

### Maintenance and phenotyping of mice

The *Skax26*<sup>m1Jus</sup> mouse mutant (MGI:3577510) with a looptail phenotype was generated and identified as part of the chromosome 4 balancer mutagenesis screens at the Mouse Mutagenesis and Phenotyping Center for Developmental Defects in Texas Medical Center in Houston (<http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu>). The study design of the chromosome 4 balancer chromosomes and the mutagenesis screens have been described elsewhere in details (24). Briefly, mice homozygous for the chromosome 4 balancer chromosome (on a C57BL/6BrdTyr<sup>-/-</sup> B6-albino genetic background), which could be visually recognized by their dark brown coat because of the presence of tyrosinase and K14-agouti transgenes at the inversion breakpoints were crossed to ENU-injected C57BL/6BrdTyr<sup>-/-</sup> (albino) mice. G1 pups that were heterozygous for a potential mutation and the balancer (light brown coat) were backcrossed to balancer homozygotes (dark brown coat). G2 mice that were heterozygous for the inversion (light brown coat) were intercrossed and the offspring (G3) were analyzed. *Skax26*<sup>m1Jus</sup> was identified as a recessive mouse mutant with a looped tail phenotype in the G3 cross that failed to segregate to Chromosome 4. *Skax26*<sup>m1Jus</sup> G3 mutants were archived as frozen sperm and were consequently recovered at The Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/services/>) by using the Assisted In Vitro Fertilization (AIVF) method with C57BL/6J oocytes. The *Skax26*<sup>m1Jus</sup> mutant stock was generated and maintained by brother-sister matings. For genetic mapping studies, *Skax26*<sup>m1Jus</sup> mutants with a kinked/looped tail phenotype were backcrossed to 129S6/SvEv for four consecutive times and at each outcross, the “looped” or “kinked” tail recessive phenotype was recovered by brother-sister intercrosses.

Two *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> males on a mixed A/J:B6 background were obtained from Philippe Gros (McGill University, Montreal, Quebec) and were maintained by crosses to C57BL/6J mice.

Mice were examined macroscopically for the presence of a severely “kinked” or “looped” tail. Embryos were recovered at various stages and examined for the presence of NTDs.

The protocol relevant to support this study was approved by the Institutional Committee for Animal Care in Research of the Research Center of Sainte Justine Hospital.

## **DNA extraction and genotyping**

Genomic DNA was extracted from mouse tail or embryonic yolk sac using the EZ-10 Spin Column Animal DNA Mini-Preps kit (BS628, Bio Basic Inc. Canada, ON). Phenotype and genotype were confirmed for all mice included in the study. For the *Skax26*<sup>m1Jus</sup> mice, genotyping was done by PCR amplification using genomic DNA. Exon 9 of *Lrp6* (471 bp) was amplified using intronic primers 5′-catgaacaaatatgtctgctt-3′ and 5′-tcagtgtagcttcccaccagc-3′. Direct dye terminator sequencing of PCR products was done using Applied Biosystem’s 3730xl DNA Analyzer technology. The p.Ile681Arg mutation was also detected by EcoRV digestion on *Lrp6*-exon9 PCR product and visualized on 2% agarose gel. For the *Vangl2*<sup>Lp</sup> mutation, genotyping was done by PCR amplification on genomic DNA for *Vangl2*- exon 7 (360bp) as previously described (48).

## **Homozygosity mapping**

For genetic mapping studies, a total of 180 single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed across the genome were selected for genotyping 37 mice (11 N1F1-N1F4, 5N2F1, 2 N3F1 and 19N3F1). These markers were informative for both C57BL/6J; 129S6/SvEvTac strains and average intermarker distance was 13 Mb. Of these, 31 markers failed to genotype. To fine map the *Skax26*<sup>m1Jus</sup> candidate region, additional genotyping of the same 37 mutant mice was done with 19 informative SNPs spanning a 23.4 Mb region defined by rs6200835 and rs30113154 at the telomeric end of chromosome 6. The average intermarker distance was 1.5 Mb. Of these, 3 failed to genotype. Genotyping was done using the Sequenom iPLEX Gold technology at the McGill and Genome Quebec Innovation Center.

## Patients and controls

The patients' cohort consisted of 285 Italian patients recruited at the Spina Bifida Center of the Gaslini Hospital in Genova, Italy. All patients were affected with non-syndromic or isolated NTDs. The distribution of the major NTD forms in this cohort was as follows: 6 cranial closed NTDs (6 encephalocele), 153 open spinal NTDs (153 myelomeningocele) and 126 closed spinal NTDs (17 Lipomyeloschisis, 18 Lipomyelomeningocele, 38 caudal agenesis, 28 lipoma, 7 tight filum terminale, 2 myelocystocele, 1 meningocele, 11 diastematomyele, 1 meningocele, 3 lipomyelocele). Myelomeningocele was the major NTD present in this cohort at a frequency of 44%. All NTD patients included in this cohort were white Caucasians. The control group consisted of 275 Italian healthy individuals with no NTD family history. All research involving human participants was approved by the Local Ethics Committee of the Institute of Gaslini, Genoa, Italy. Written informed consent was obtained from all participating individuals.

## Sequencing analyses

The coding exons of mouse *Lrp6* (Accession #: NM\_008514.4) and *LRP6* (Accession NM\_002336.2) were amplified from genomic DNA by PCR using primers flanking the exon-intron junctions. Primers' sequences and PCR conditions are available upon request. Direct dye terminator sequencing of PCR products was carried out using the ABI Prism Big Dye Systems at the McGill and Genome Quebec Innovation Center. Samples were run on ABI 3700 automated sequencer and analyzed using the SeqMan<sup>®</sup> sequence assembly and SNP discovery software (from DNASTAR<sup>®</sup>).

Human *LRP6* mutations were verified for absence in 275 ethnically-matched controls by sequencing analysis and in 3 public databases dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), the 1000 genome project (<http://www.1000genomes.org>) and the NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) (<http://snp.gs.washington.edu/EVS/>). Novel rare mutations (<1%) were confirmed in a second round of sequencing of the original DNA sample. For novel missense mutations absent in controls and in public databases, their effect on the protein was



predicted *in silico* using the PolyPhen (Polymorphism Phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>) programs. Multiple alignments of orthologous Lrp6 proteins were done using ClustalW.

## **Cochlear immunohistochemistry and analysis of stereociliary bundle orientation**

Cochlea from E18.5 embryos were isolated under microscope and flat mounted, then fixed in 4% paraformaldehyde for 1 hour at room temperature, and washed 3X in PBS. Immunohistochemical staining was done as previously described. At least 30 cells for each row at the apical, middle or basal region of the organ of Corti were used for quantification per sample. To determine stereociliary bundle orientation, a line was drawn through the middle of the “V”-shaped stereocilia (bisecting line). The angle formed between this line and the line parallel to the mediolateral axis was used for quantifications. In wild-type animals, this angle is close to 0 degrees. Stereocilia with a deviation from normal larger than 30° were considered to be misoriented. For statistical analysis, the  $\chi^2$  test was used to compare the distributions of the various subgroups of hair cells.

## ***Preparation of cell lysates and immunoblot analysis***

After 48 hrs in culture, cells were rinsed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and collected in cold lysis RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton x-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors and spun at 13,000g at 4C for 15 min. Protein concentrations of the supernatant were determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay. Endogenous Lrp6 in MEFS was detected using Phospho-specific LRP6 antibodies to the A site (S1490) obtained from Cell Signaling Technology (cat # 2568) and the VSVG-tagged hLRP6 in HEK293T cells using polyclonal anti-VSVG antibody obtained from Sigma-Aldrich Corporation (cat # V4888).  $\beta$ -Actin antibody was from NOVUS Biologicals, LLC (cat # NB600-501), secondary antibody to mouse (cat # ab6789) and rabbit (cat # ab6721) were obtained from abcam.

## ***Cell cultures and cDNA expression constructs***

All cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium with 10% FBS and 1% antibiotic and antimycotic cocktail. The L cells that produce Wnt3a were a generous gift from Dr Sylvain Chemtob and those producing Wnt5a from Nicolas Pilon. To collect the conditioned medium (CM) (Wnt3a or Wnt5a) from cultures of Wnt3a/5a-producing L cells, we seeded these cells at a density of  $1 \times 10^6$  cells in a 94mm dish containing a 1:1 mixture of DMEM and HAM F12 supplemented with 10% FCS, and cultured them for 4 days. Then CM was harvested, centrifuged at 1000 g for 10 min, and filtered through a nitrocellulose membrane.

The pTOPFLASH (pGL3) vector was a generous gift from Nicolas Pilon. The pCS2-VSVG-tagged wild-type LRP6 vector was kindly provided by Dr. Xi He. Mouse *Lrp6*, human *DVL3* and human *VANGL2* constructs were subcloned into the pCDNA3.1 Myc/His A and pCS2+ expression vectors respectively the SLIC method (49). Site directed mutagenesis was performed using the PfuTurbo® DNA Polymerase (Stratagene) as directed. Primers used for cloning and for site directed mutagenesis are provided upon request.

## ***TCF/LEF-1 Wnt/ $\beta$ -catenin and JNK-AP-1 dependent reporter assays***

All mammalian cell transfections in HEK293T cells were done using either Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent or Polyethylenimine (PEI) and were performed in triplicates. For the Lef/Tcf reporter assay, HEK293T cells were transfected with [50 ng TOPFLASH/pGL3-OT, 10 ng pRL-TK and 100 ng of wild-type or mutant LRP6 constructs or pCS2 vector alone as control] per well in 24-well plates. Following transfection, cells were grown in DMEM/10%FBS overnight and in Wnt3a-enriched medium for another overnight before measuring the TCF/LEF-1 activity.

For the JNK-AP-1 reporter assay, HEK293T cells were transfected with a total of [50 ng TOPFLASH/pAP1-Luc, 100 ng *DVL3* or 500 ng *VANGL2*, 10 ng pRL-TK, and increasing amounts (100-500ng) of *LRP6* constructs or pCS2 empty vector control] /well in 24-well

plates. For functional validation of *LRP6* mutations, HEK293T cells were transfected with (100 ng pAP1-Luc, 10 ng TK-Renilla, and 100 ng of DVL3 constructs alone or with 500 ng LRP6 wild-type or empty pCS2 vector alone as control] DNA/well in 24-well plates. The assay was performed using the PathDetect Kit (Stratagene) according to manufacturer's instructions (catalogue # 219074-51).

MEFs were prepared from N5F1 embryos at E13.5 using standard procedures and were transfected with 10 µg reporter vector (pGL3-OT or pAP1-Luc) and 5 µg pRL-TK/60 mm dish by electroporation, and incubated overnight in DMEM/10%FBS and another overnight in Wnt 5a or Wnt3a conditioned medium.

pRL-TK (Promega, cat # E224A), which encodes a Renilla luciferase gene downstream of a minimal HSV-TK promoter, was included in each transfection to control for transfection efficiency. Dual luciferase reporter assays were performed as described by the manufacturer (Promega, cat # E1960).

## ***Statistical analysis***

Two-tailed Fisher's exact test was used for statistical analysis of genetic interaction data between *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> and *Vangl2*<sup>Lp</sup>. All reporter activity experiments were carried out at least three times. Data were represented as mean ± SE. Significance of differences between two groups was tested either by  $\chi^2$  test or Student's t test. A *P* value less than 0.05 was considered as significant.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank all participants in this study. We also thank Corinne Saint Denis, Genevieve Lefebvre, Ruiu Ilaria and Mara Uglietta for technical assistance. We thank Drs. Philippe Gros (McGill University, Montreal, Quebec) for providing *Vangl2*<sup>Lp</sup> mice, Nicolas Pilon (University of Québec in Montréal) for providing L Wnt-5a cells and the pTOPFLASH (pGL3) vector, Sylvain Chemtob (University of Montréal) for providing L Wnt-3a cells and Xi He (Harvard Medical School) for providing the pCS2-VSVG-tagged wild-type

*LRP6* vector. We also thank A.S.B.I. (Associazione Spina Bifida Italia). ZK has a salary award from the “Fonds de Recherche du Québec – Santé” and is funded by the Canadian Institutes for Health Research. MJJ is funded by NIH grants U54 HD39372 and R01 CA115503.

## REFERENCES

1. Niehrs, C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 767–779.
2. Chien, A.J., Conrad, W.H. and Moon, R.T. (2009) A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J. Invest. Dermatol.*, **129**, 1614–1627.
3. Maung, S.M.T.W. and Jenny, A. (2011) Planar cell polarity in Drosophila. *Organogenesis*, **7**, 165–179.
4. Montcouquiol, M., Crenshaw, E.B. 3rd and Kelley, M.W. (2006) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 363–386.
5. Tada, M. and Heisenberg, C.-P. (2012) Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. *Dev. Camb. Engl.*, **139**, 3897–3904.
6. Wang, Y. and Nathans, J. (2007) Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Dev. Camb. Engl.*, **134**, 647–658.
7. Roszko, I., Sawada, A. and Solnica-Krezel, L. (2009) Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **20**, 986–997.
8. Wallingford, J.B. (2005) Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **135C**, 59–68.
9. Bassuk, A.G. and Kibar, Z. (2009) Genetic basis of neural tube defects. *Semin. Pediatr. Neurol.*, **16**, 101–110.
10. Wallingford, J.B., Niswander, L.A., Shaw, G.M. and Finnell, R.H. (2013) The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science*, **339**, 1222002.
11. Juriloff, D.M. and Harris, M.J. (2012) A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, **94**, 824–840.
12. Rossi, A., Biancheri, R., Cama, A., Piatelli, G., Ravegnani, M. and Tortori-Donati, P. (2004) Imaging in spine and spinal cord malformations. *Eur. J. Radiol.*, **50**, 177–200.
13. Peradziryi, H., Tolwinski, N.S. and Borchers, A. (2012) The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch. Biochem. Biophys.*, **524**, 71–76.

14. Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kühl, M., Schaeffer, H.-J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. (2002) The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev.*, **16**, 2073–2084.
15. Li, S., Esterberg, R., Lachance, V., Ren, D., Radde-Gallwitz, K., Chi, F., Parent, J.-L., Fritz, A. and Chen, P. (2011) Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 2264–2269.
16. Bryja, V., Andersson, E.R., Schambony, A., Esner, M., Bryjová, L., Biris, K.K., Hall, A.C., Kraft, B., Cajanek, L., Yamaguchi, T.P., et al. (2009) The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 924–936.
17. Tahinci, E., Thorne, C.A., Franklin, J.L., Salic, A., Christian, K.M., Lee, L.A., Coffey, R.J. and Lee, E. (2007) Lrp6 is required for convergent extension during Xenopus gastrulation. *Dev. Camb. Engl.*, **134**, 4095–4106.
18. He, X., Semenov, M., Tamai, K. and Zeng, X. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Dev. Camb. Engl.*, **131**, 1663–1677.
19. Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J. and Skarnes, W.C. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, **407**, 535–538.
20. Zhou, C.J., Wang, Y.-Z., Yamagami, T., Zhao, T., Song, L. and Wang, K. (2010) Generation of Lrp6 conditional gene-targeting mouse line for modeling and dissecting multiple birth defects/congenital anomalies. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, **239**, 318–326.
21. Kokubu, C., Heinzmann, U., Kokubu, T., Sakai, N., Kubota, T., Kawai, M., Wahl, M.B., Galceran, J., Grosschedl, R., Ozono, K., et al. (2004) Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Dev. Camb. Engl.*, **131**, 5469–5480.
22. Fossat, N., Jones, V., Khoo, P.-L., Bogani, D., Hardy, A., Steiner, K., Mukhopadhyay, M., Westphal, H., Nolan, P.M., Arkell, R., et al. (2011) Stringent requirement of a proper level of canonical WNT signalling activity for head formation in mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.*, **138**, 667–676.
23. Carter, M., Chen, X., Slowinska, B., Minnerath, S., Glickstein, S., Shi, L., Campagne, F., Weinstein, H. and Ross, M.E. (2005) Crooked tail (Cd) model of human folate-responsive neural tube defects is mutated in Wnt coreceptor lipoprotein receptor-related protein 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 12843–12848.

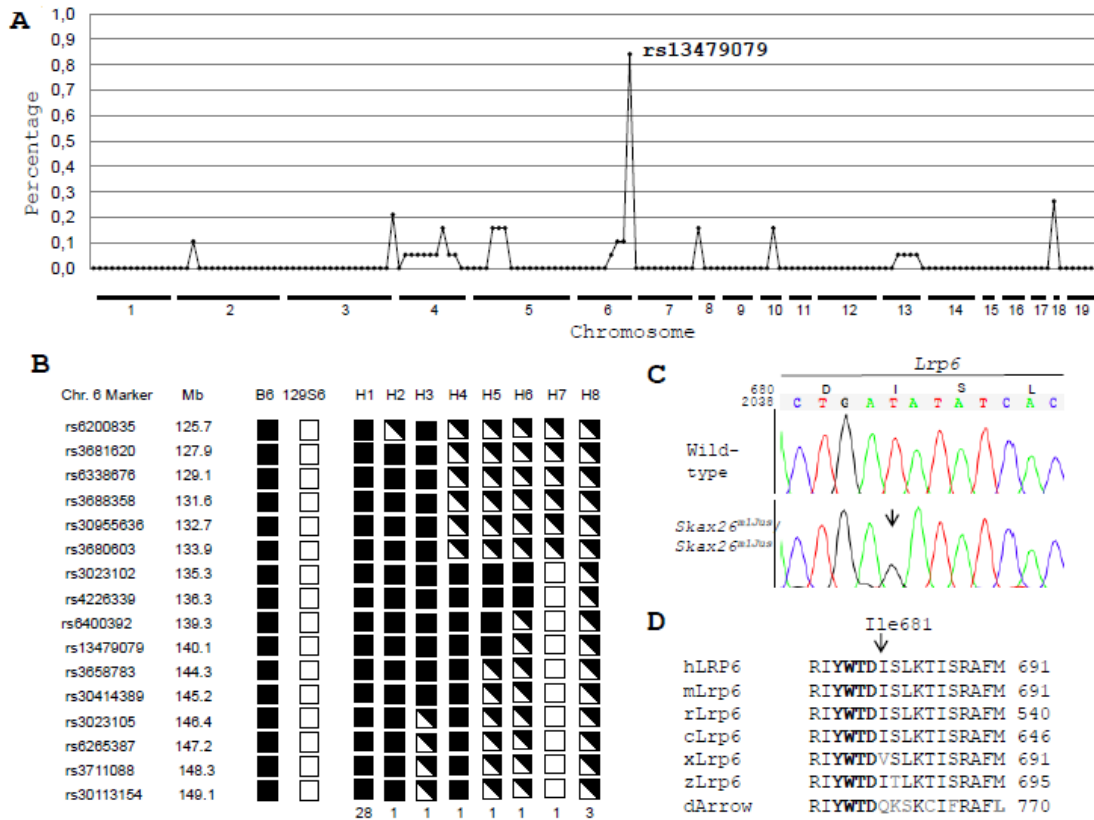
24. Hentges, K.E., Nakamura, H., Furuta, Y., Yu, Y., Thompson, D.M., O'Brien, W., Bradley, A. and Justice, M.J. (2006) Novel lethal mouse mutants produced in balancer chromosome screens. *Gene Expr. Patterns GEP*, **6**, 653–665.
25. Kibar, Z., Vogan, K.J., Groulx, N., Justice, M.J., Underhill, D.A. and Gros, P. (2001) Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat. Genet.*, **28**, 251–255.
26. Ezan, J. and Montcouquiol, M. (2013) Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **24**, 499–506.
27. Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Kelley, M.W. (2003) Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature*, **423**, 173–177.
28. McNeill, H. (2010) Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a003376.
29. Diebler, C. and Dulac, O. (1983) Cephaloceles: clinical and neuroradiological appearance. Associated cerebral malformations. *Neuroradiology*, **25**, 199–216.
30. Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C. (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, **411**, 321–325.
31. Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C. and Krumlauf, R. (2003) Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Dev. Camb. Engl.*, **130**, 4295–4305.
32. Caneparo, L., Huang, Y.-L., Staudt, N., Tada, M., Ahrendt, R., Kazanskaya, O., Niehrs, C. and Houart, C. (2007) Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek. *Genes Dev.*, **21**, 465–480.
33. Gray, J.D., Kholmanskikh, S., Castaldo, B.S., Hansler, A., Chung, H., Klotz, B., Singh, S., Brown, A.M.C. and Ross, M.E. (2013) LRP6 exerts non-canonical effects on Wnt signaling during neural tube closure. *Hum. Mol. Genet.*, 10.1093/hmg/ddt277.
34. Murdoch, J.N., Henderson, D.J., Doudney, K., Gaston-Massuet, C., Phillips, H.M., Paternotte, C., Arkell, R., Stanier, P. and Copp, A.J. (2003) Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 87–98.
35. Etheridge, S.L., Ray, S., Li, S., Hamblet, N.S., Lijam, N., Tsang, M., Greer, J., Kardos, N., Wang, J., Sussman, D.J., et al. (2008) Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet.*, **4**, e1000259.

36. Lu, X., Borchers, A.G.M., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J.C. and Tessier-Lavigne, M. (2004) PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*, **430**, 93–98.
37. Kibar, Z., Torban, E., McDearmid, J.R., Reynolds, A., Berghout, J., Mathieu, M., Kirillova, I., De Marco, P., Merello, E., Hayes, J.M., et al. (2007) Mutations in VANG1 associated with neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 1432–1437.
38. Bosoi, C.M., Capra, V., Allache, R., Trinh, V.Q.-H., De Marco, P., Merello, E., Drapeau, P., Bassuk, A.G. and Kibar, Z. (2011) Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene PRICKLE1 in human neural tube defects. *Hum. Mutat.*, **32**, 1371–1375.
39. De Marco, P., Merello, E., Rossi, A., Piatelli, G., Cama, A., Kibar, Z. and Capra, V. (2012) FZD6 is a novel gene for human neural tube defects. *Hum. Mutat.*, **33**, 384–390.
40. Seo, J.H., Zilber, Y., Babayeva, S., Liu, J., Kyriakopoulos, P., De Marco, P., Merello, E., Capra, V., Gros, P. and Torban, E. (2011) Mutations in the planar cell polarity gene, Fuzzy, are associated with neural tube defects in humans. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4324–4333.
41. Allache, R., De Marco, P., Merello, E., Capra, V. and Kibar, Z. (2012) Role of the planar cell polarity gene CELSR1 in neural tube defects and caudal agenesis. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, **94**, 176–181.
42. Robinson, A., Escuin, S., Doudney, K., Vekemans, M., Stevenson, R.E., Greene, N.D.E., Copp, A.J. and Stanier, P. (2012) Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis. *Hum. Mutat.*, **33**, 440–447.
43. Weidinger, G. and Moon, R.T. (2003) When Wnts antagonize Wnts. *J. Cell Biol.*, **162**, 753–755.
44. Westfall, T.A., Brimeyer, R., Twedt, J., Gladon, J., Olberding, A., Furutani-Seiki, M. and Slusarski, D.C. (2003) Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J. Cell Biol.*, **162**, 889–898.
45. Andersson, E.R., Bryjova, L., Biris, K., Yamaguchi, T.P., Arenas, E. and Bryja, V. (2010) Genetic interaction between Lrp6 and Wnt5a during mouse development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, **239**, 237–245.
46. Alarcón, M.A., Medina, M.A., Hu, Q., Avila, M.E., Bustos, B.I., Pérez-Palma, E., Peralta, A., Salazar, P., Ugarte, G.D., Reyes, A.E., et al. (2013) A novel functional low-density lipoprotein receptor-related protein 6 gene alternative splice variant is associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **34**, 1709.e9–18.

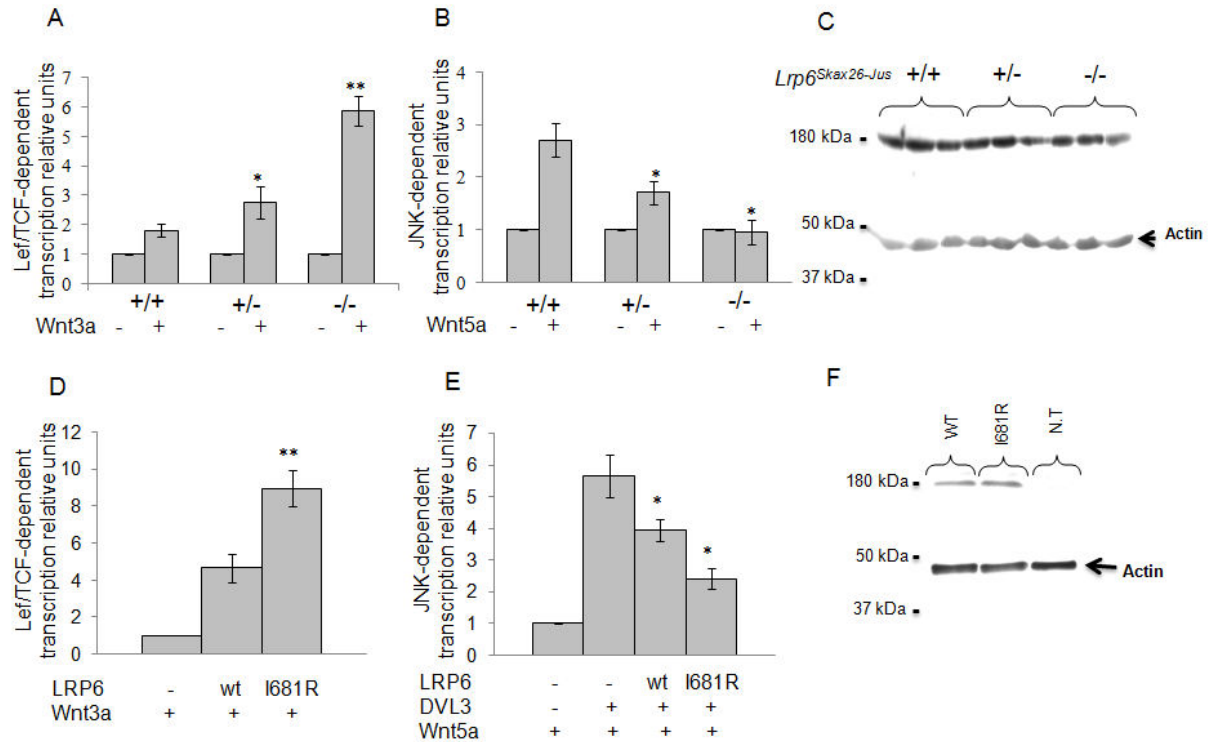


47. Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H., Mani, A., Mani, M.-A., Nelson-Williams, C., Carew, K.S., Mane, S., Najmabadi, H., Wu, D., et al. (2007) LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, **315**, 1278–1282.
48. Guyot, M.-C., Bosoi, C.M., Kharfallah, F., Reynolds, A., Drapeau, P., Justice, M., Gros, P. and Kibar, Z. (2011) A novel hypomorphic Looptail allele at the planar cell polarity Vangl2 gene. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, **240**, 839–849.
49. Li, M.Z. and Elledge, S.J. (2007) Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods*, **4**, 251–256.

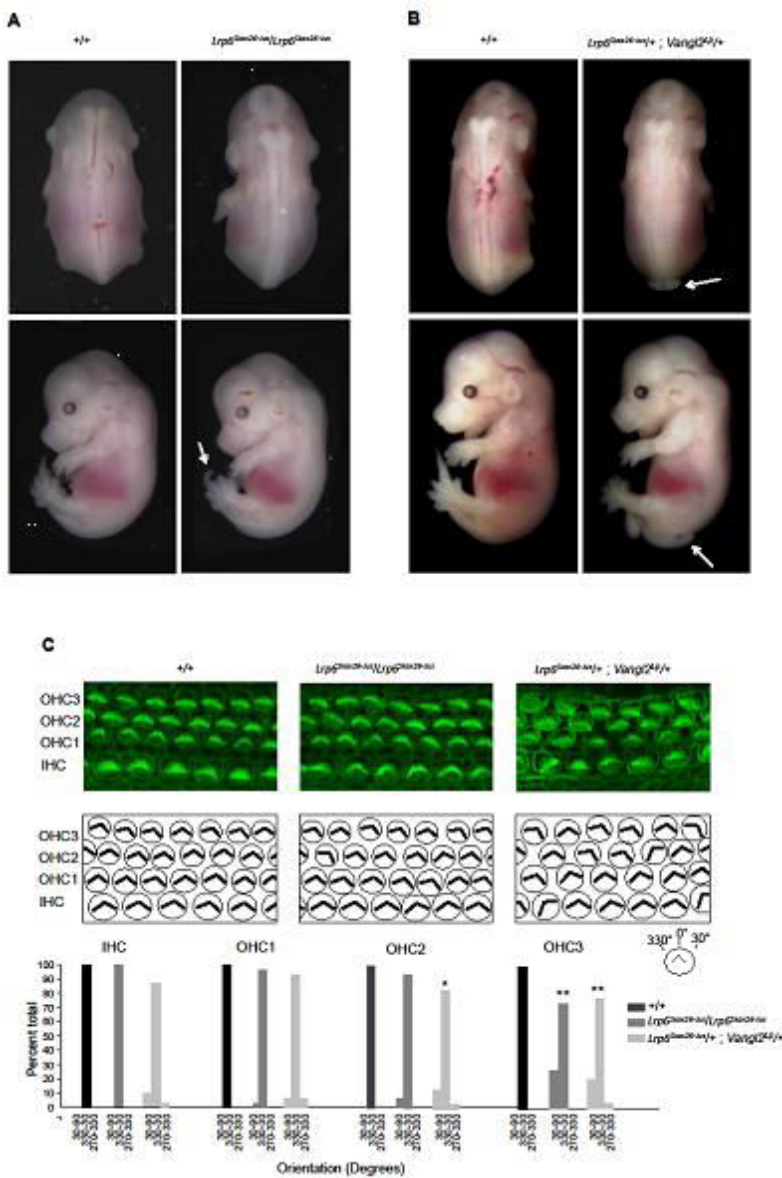
# FIGURE LEGEND



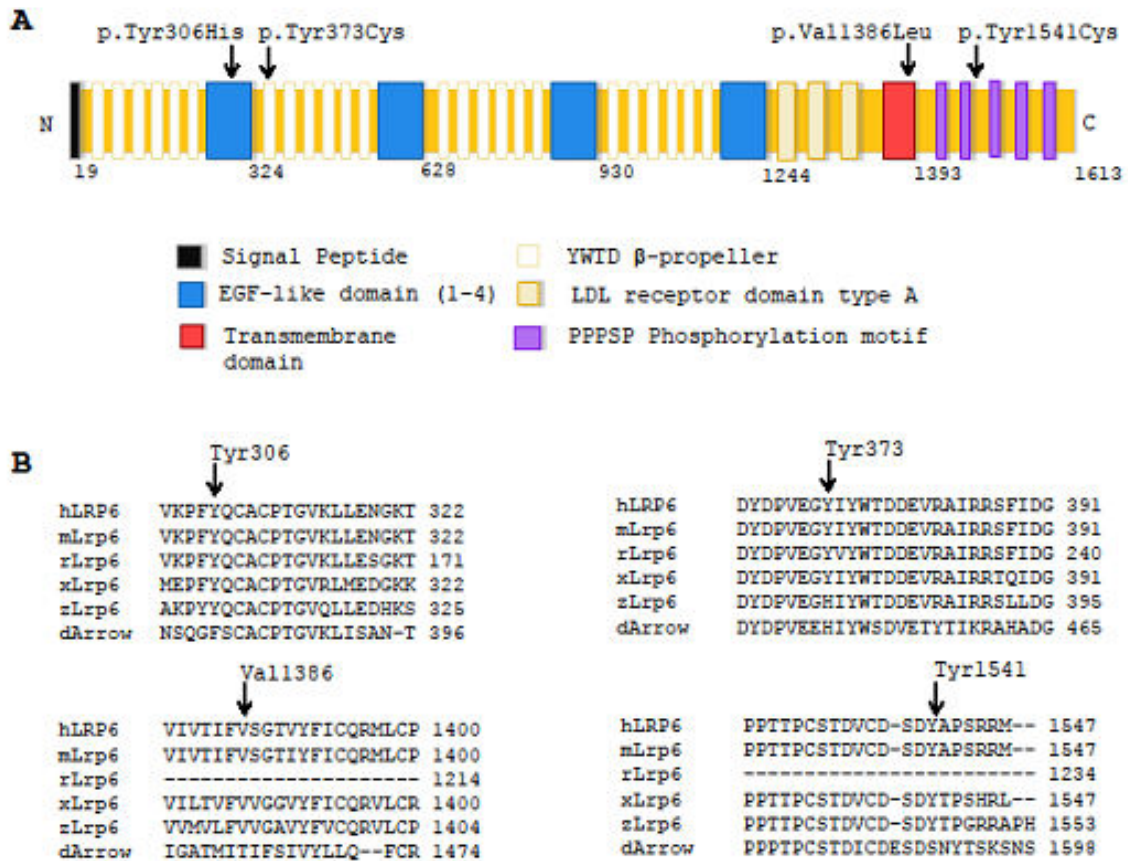
**Figure 1.** Identification of the gene mutated in *Skax26*<sup>m1Jus</sup> (A) Homozygosity mapping shows linkage of *Skax26*<sup>m1Jus</sup> to telomeric position of chromosome 6. The graph shows the percentage of homozygous mice for C57Bl/6J allele for each SNP (n= 149) for each chromosome (n=19). (B) Haplotype analysis with 16 SNPs places the *Skax26*<sup>m1Jus</sup> gene centromeric to rs3023102 at 135.3 Mb on chromosome 6. Black box, C57BL/6J (B6) allele. Open box, 129S6/SvEvTac allele (129S6). Black and open box, heterozygous for B6 and 129S6 alleles. H, haplotype (C) Chromatograms of partial sequences of exon 9 of *Lrp6* show a c.2042T>G nucleotide change in *Skax26*<sup>m1Jus</sup> / *Skax26*<sup>m1Jus</sup> which leads to p.Ile681Arg in the encoded protein. (D) Partial protein alignments of mouse *Lrp6* with 5 orthologues. The p.Ile681Arg variant maps to a highly conserved region following an YWTD repeat (indicated in bold). Accession numbers: *Homo sapiens* LRP6 (hLRP6), NP\_002327.2; *Mus musculus* Lrp6 (mLrp6), NP\_032540.2; *Rattus norvegicus* Lrp6 (rLrp6), NP\_001101362.1; *Gallus gallus* Lrp6 (cLrp6), XP\_417286.3; *Danio rerio* Lrp6 (zLrp6), NP\_001128156.1; *Xenopus tropicalis* Lrp6 (xLrp6), NP\_001079233.1; *Drosophila melanogaster* Lrp6, (dArrow), NP\_524737.2.



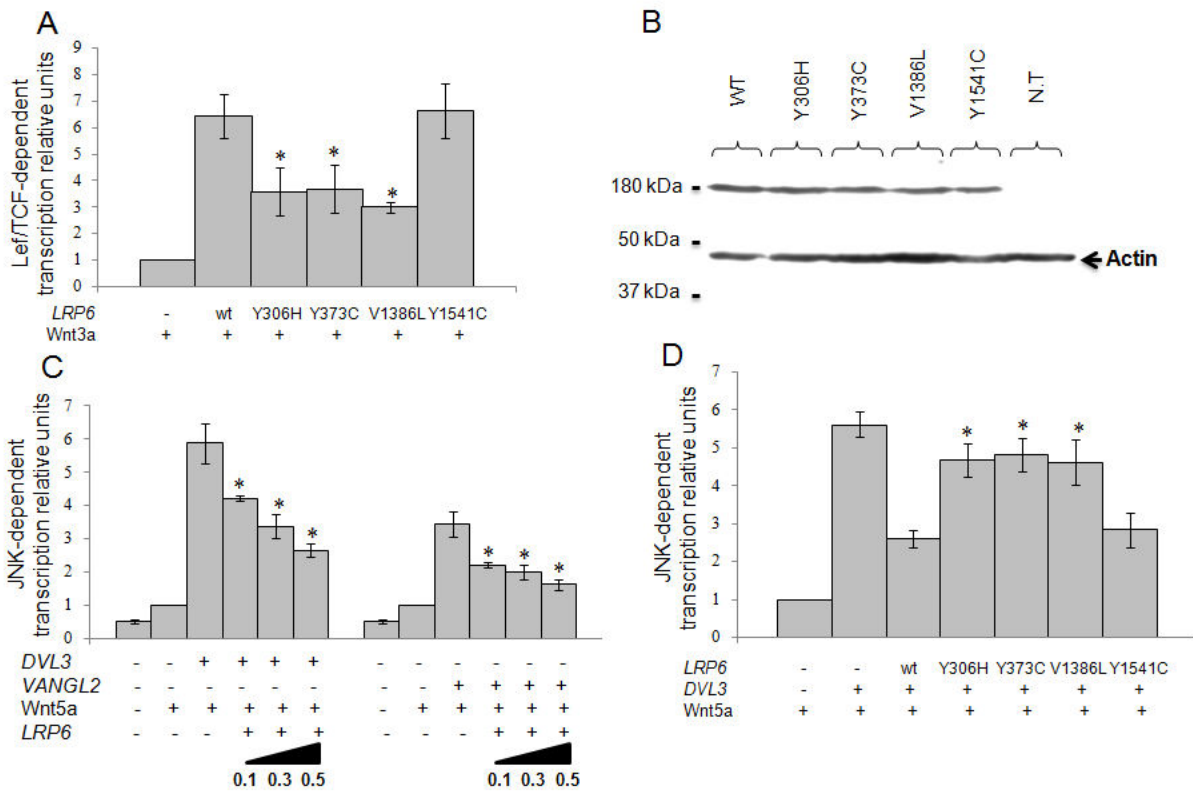
**Figure 2.** Functional validation of the mutant *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> in wild-type, heterozygous and homozygous *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> littermates and in HEK293T cells. A. TCF/LEF-1 activity was measured in E13.5 mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in the presence of Wnt3a. Heterozygous (n=7) and homozygous (n=5) MEFs showed a significantly increased reporter activity as compared to wild-type fibroblasts (n=5) (t test,  $P < 0.05$  and  $P < 0.00001$  respectively). B. JNK-AP-1 activity was measured in E13.5 MEFs in the presence of Wnt5a. JNK activity was reduced by half in heterozygous MEFs (n=7) ( $P < 0.05$ ) and completely absent in homozygous cells (n=4) ( $P < 0.05$ ) as compared to wild-type littermates (n=4). C. Representative western blots of 3 E13.5 embryos from each genotype (+/+, *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup>/+, *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup>/*Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup>) show comparable levels of Lrp6 protein expression. D. TCF/LEF-1 activity was significantly increased in cells transfected with *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> cDNA as compared to wild-type *Lrp6* ( $P < 0.005$ ). E. Co-transfection of the *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> cDNA with *DVL3* resulted in a significant increase in its ability to inhibit Wnt5a-induced JNK activation ( $P < 0.05$ ). F. Representative western blot of HEK293T cells transfected with *Lrp6*<sup>p.Ile681Arg</sup> cDNA shows a protein expression level that was comparable to the wild-type.



**Figure 3.** Genetic interaction studies between *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* and *Vangl2<sup>Lp</sup>*. **A.** *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup> /Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* E18.5 embryos displayed a kinky tail (arrow) but no neural tube defects (NTDs) as compared to their wild-type littermates. **B.** *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup> /+; Vangl2<sup>Lp</sup> /+* double heterozygotes showed spina bifida (arrow) as compared to their wild-type littermates. **C.** Comparison of hair bundle orientation at the apical region of the organ of Corti in wild-type, *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup> /Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* and *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup> /+; Vangl2<sup>Lp</sup> /+* at E18.5. Top, Stereocilia labeled with phalloidin (green). Middle, Diagrams showing the scoring of hair bundle orientation for the images above. IHC, Inner hair cells; OHC1, Inner row of outer hair cells; OHC2, central row of outer hair cells; OHC3, outer row of outer hair cells. The genotype is indicated above each column of panels. Bottom, quantification of the IHC, OHC1, OHC2, and OHC3 bundle orientations for each of the three genotypes indicated above based on phalloidin staining. The convention for angular measurements is shown in the top right corner of the panel. *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup> /Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup>* showed significant defects in OHC3 orientation and *Lrp6<sup>Skax26-Jus</sup> /+; Vangl2<sup>Lp</sup> /+* showed significant defects in OHC2 and OHC3 orientation as compared to their wild-type littermates. For statistical analysis, the  $\chi^2$  test was used to compare the distributions of the various subgroups of hair cells (\*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



**Figure 4.** Rare novel mutations in *LRP6* in human neural tube defects (NTDs). A. A schematic diagram of *LRP6* showing the approximate locations of the 4 NTD-associated mutations p.Tyr306His, p.Tyr373Cys, p.Val1386Leu, and p.Tyr1541Cys. B. A partial alignment of human *LRP6* with 5 other orthologous sequences. The *LRP6* variants found in NTD patients affect conserved residues (indicated by arrows). Accession numbers: *Homo sapiens* *LRP6* (hLRP6), NP\_002327.2; *Mus musculus* *Lrp6* (mLrp6), NP\_032540.2; *Rattus norvegicus* *Lrp6* (rLrp6), NP\_001101362.1; *Gallus gallus* *Lrp6* (cLrp6), XP\_417286.3; *Danio rerio* *Lrp6* (zLrp6), NP\_001128156.1; *Xenopus tropicalis* *Lrp6* (xLrp6), NP\_001079233.1; *Drosophila melanogaster* *Lrp6*, (dArrow), NP\_524737.2.



**Figure 5.** Functional validation of NTD-associated mutations in *LRP6* using TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin and JNK-AP-1 reporter assays. **A.** TCF/LEF-1 activity was significantly decreased in cells transfected with each of the *LRP6*<sup>p.Tyr306His</sup>, *LRP6*<sup>p.Tyr373Cys</sup> and *LRP6*<sup>p.Val1386Leu</sup> cDNAs, as compared to wild-type *LRP6* (t test, \*,  $P < 0.05$ ). This activity was not affected in HEK293T cells transfected with the *LRP6*<sup>p.Tyr1541Cys</sup> cDNA. **B.** A representative western blot analysis of HEK293T cells transfected with each of the 4 variants show protein expression levels for all LRP6 variants that were comparable to the wild-type. **C.** JNK-AP1-1 activity was significantly inhibited by co-transfection of *LRP6* with either *DVL3* or *VANGL2* in the presence of Wnt5a in a dose dependent manner (t test \*,  $P < 0.05$ ). **D.** Co-transfection of each of *LRP6*<sup>p.Tyr306His</sup>, *LRP6*<sup>p.Tyr373Cys</sup> and *LRP6*<sup>p.Val1386Leu</sup> cDNAs with *DVL3* in the presence of Wnt5a resulted in less inhibition of JNK-AP1-1 activity as compared to wild-type *LRP6* (t test, \*,  $P < 0.05$ ). *LRP6*<sup>p.Tyr1541Cys</sup> behaved like the wild-type *LRP6*.

**Table 1. Genotype-phenotypes studies in *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup>**

Mice	N	p.Ile681Arg genotype at <i>Lrp6</i>	Phenotype	
			Kinky/Looped tail	Neural tube defect
N1F1-N1F4 adults	112	12 +/+	0	NA
		30 +/-	1 (3%)	NA
		70 -/-	8 (11%)	NA
N5F1 adults	99	3 +/+	0	NA
		36 +/-	3 (8%)	NA
		60 -/-	32 (53%)	NA
N5F1 E12.5- E18.5	91	14 +/+	0	0
		30 +/-	2 (6%)	0
		47 -/-	25 (53%)	0

NA, not applicable.

**Table 2. Analysis of the neural tube defect phenotype in genetic interaction studies between *Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> and *Vangl2*<sup>Lp</sup>.**

Genotype <sup>a</sup>	N	Phenotype	
		Kinky/Looped tail	Spina Bifida
+/+; +/+	32	0	0
+/+; <i>Vangl2</i> <sup>Lp</sup> /+	25	10 (40%)	0
<i>Lrp6</i> <sup>Skax26-Jus</sup> /+; +/+	47	0	0
<i>Lrp6</i> <sup>Skax26-Jus</sup> /+; <i>Vangl2</i> <sup>Lp</sup> /+	45	36 (80%) <sup>b</sup>	16 (36%) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Lrp6*<sup>Skax26-Jus</sup> and *Vangl2*<sup>Lp</sup> embryos from N1, N4 and N5 were genotyped for the presence of p.Ile681Arg in *Lrp6* and p.Ser464Asn in *Vangl2*<sup>Lp</sup> respectively.

<sup>b</sup>*P*<0.005

<sup>c</sup> *P*<0.001



**Table S1.** Novel rare mutations (<1%) in *LRP6* in human neural tube defects absent in controls.

Mutation <sup>a</sup>	Amino acid change <sup>a</sup>	Polyphen <sup>b</sup>	SIFT <sup>b</sup>	NTD patient <sup>c</sup>
c.916T>C	p.Tyr306His	Benign	Tolerated	M, DOB 1993, lumbosacral MMC, tethered cord
c.1118A>G	p. Tyr373Cys	Probably damaging	Tolerated	F, DOB 1998, lumbosacral MMC, hydrocephalus, CMII
c.4156G>T	p.Val1386Leu	Possibly damaging	Tolerated	F, DOB 2003, intraparietal posterior encephalocele
c.4622A>G	p.Tyr1541Cys	Benign	Not tolerated	F, DOB 2002, sacral agenesis type II, lumbosacral meningocele, lumbar diastematomyelia type II, tethered cord

<sup>a</sup> The DNA mutation and amino acid numbering systems are based on *LRP6* cDNA sequence with the accession NM\_002336.2 and LRP6 protein sequence with the accession NP\_002327.2 respectively. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence.

<sup>b</sup> PolyPhen or Polymorphism Phenotyping at <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> and SIFT or Sorting Intolerant from Tolerant at <http://sift.jcvi.org/>.

<sup>c</sup> DOB: date of birth; CMII, Chiari malformation II; F, female; M, male; MMC, myelomeningocele

## **4. Genetic studies of *ANKRD6* as a molecular switch between Wnt signaling pathways in human neural tube defects**

Redouane Allache<sup>1</sup>, Mingqin Wang<sup>1</sup>, Patrizia De Marco<sup>2</sup>, Elisa Merello<sup>2</sup>, Valeria Capra<sup>2</sup>, and Zoha Kibar<sup>1,\*</sup>

Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology. 2014 Sep 8. doi: 10.1002/bdra.23273.

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, CHU Sainte Justine Research Center and University of Montréal; <sup>2</sup>U.O. C. Neurochirurgia, Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

\*To whom correspondence should be addressed: Zoha Kibar, CHU Sainte Justine Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine, Room 5999C, Montréal, QC H3T 1C5 Canada; Tel: (514) 345 4931 X 3984.

## **Apport de coauteurs**

### **Redouane Allache:**

Le séquençage du gène *ANKRD6* dans 391 patients atteints par des ATN qui ont fait l'objet de l'étude et dans 433 contrôles

L'analyse bioinformatique des mutations identifiées

La validation fonctionnelle des mutations, spécifiquement: (1) La conception et la réalisation des expériences des essais TOPFLASH/pGL3-OT et TCF/LEF1-Wnt/ $\beta$ -catenin décrites dans l'article, (2) les expériences de biologie moléculaire, (3) les analyses statistiques.

La conception et la préparation des figures et tableaux décrites dans l'article,

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

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

Le recrutement du groupe de 391 patients italiens inclus dans cette étude ainsi que des 433 contrôles italiens

### **Mingqin Wang:**

La réalisation d'une partie des expériences de Biologie moléculaire.

### **Zoha Kibar:**

La conception du projet et la supervision des expériences décrites dans l'article.

Le soutien technique, scientifique et matériel pour le déroulement et la réalisation des expériences.

La correction de la rédaction du manuscrit.

# ABSTRACT

**BACKGROUND:** Planar cell polarity (PCP) is a major branch of Wnt signaling that controls the process of convergent extension in gastrulation and neurulation. PCP defects were associated with neural tube defects (NTDs) that are the most common central nervous system anomalies. PCP signaling is highly dosage sensitive and exhibits an antagonistic relationship with the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. Diversin, encoded by *Ankrd6*, is an ankyrin repeat protein that activates the non canonical PCP signaling and simultaneously inhibits the canonical pathway. **METHODS:** In this study, we analyzed this dual role of *ANKRD6* in NTDs. We sequenced its coding region in 473 NTD patients and 150 controls and we validated the effect of the identified variants on Wnt signaling using reporter assays in mammalian cells. **RESULTS:** We identified four rare missense mutations in 0.8% of the NTD patients and 2 rare missense mutations in 1.3% of the controls. Notably, when all 6 mutations were validated, only two mutations identified in NTD patients, p.Pro548Leu, p.Arg632His, significantly altered DIVERSIN activity in Wnt signaling assays in a hypomorphic fashion. **CONCLUSION:** Rare missense mutations in *ANKRD6* could affect a balanced reciprocal antagonism between both Wnt pathways in neurulation and act as predisposing factors to NTDs in a subset of patients.

## Keywords

*ANKRD6*; DIVERSIN; neural tube defects; planar cell polarity; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling

## Introduction

Planar cell polarity (PCP) signaling is one of the non-canonical Wnt signaling pathways that regulate the process by which epithelial cells become polarized along the plane of the epithelium. It was first studied and described in detail in *Drosophila* where it controls the orientation of the sensory organ precursor cells of the notum, the ommatidial arrangement in the compound eye and the hair cells in the developing wing and abdomen (Simons and Mlodzik, 2008). PCP core members include the highly conserved transmembrane proteins frizzled (fz), the intracellular protein dishevelled (dsh), strabismus (stbm), Flamingo (fmn), Prickle (pk) and diego. These PCP proteins form a membrane-associated signaling complex where their subcellular localization, amount and distribution are crucial for normal PCP signaling. Downstream effectors of this pathway include the small GTPases of the RhoA family and JNK that upon activation lead to a variety of cellular responses including cytoskeletal rearrangements (Simons and Mlodzik, 2008). In vertebrates, these members mediate the complex morphogenetic process of convergent extension that is essential for gastrulation and neural tube formation. During this process, cells elongate, move mediolaterally and intercalate between neighboring cells, leading to convergence towards the mediolateral axis and extension along the anteroposterior axis (Roszko et al., 2009). Defects in convergent extension have been linked directly to failure of neural tube closure in mouse PCP mutants (Wallingford, 2005).

Defects in PCP signaling in mouse and in humans have been associated mainly with neural tube defects (NTDs). These are the most common anomalies of the central nervous system affecting 1–2 per 1000 pregnancies (Bassuk and Kibar, 2009; Juriloff and Harris, 2012). NTDs, including anencephaly and spina bifida, arise when the neural tube fails to close during neurulation early during development. They are categorized into 2 major types: “open NTDs” where the nervous system and/or meninges are exposed to the environment without normal skin covering and “closed NTDs” where there is no exposed neural tissue. The latter is highly heterogeneous and is categorized clinically depending on the presence (lipomyeloschisis, lipomyelomeningocele, meningocele, and myelocystocele) or absence of a subcutaneous mass (split cord malformations, dermal sinus, and intradural lipoma) (Rossi et

al., 2004). The risk of NTDs is significantly reduced by 50-70% when supplemental folic acid is consumed in addition to a healthy diet before conception and during the first month of pregnancy (MRC Vitamin Study Research Group, 1991). NTDs have a multifactorial and complex etiology involving both environmental and genetic factors that remain largely undetermined. Genetic studies in NTDs have focused mainly on folate-related genes and on candidate genes derived from animal models (Bassuk and Kibar 2009). A few significant associations have been identified between variants in folate-related genes and an increased risk for NTDs (Blom et al., 2006) . Recent studies have addressed the possible role of epigenetic alterations including unbalanced DNA methylation in susceptibility to NTDs. These alterations can affect expression levels of key neurulation genes and can be directly modified by various environmental insults or maternal dietary factors such as folate (Blom et al., 2006; Greene et al., 2011).

Whereas some PCP proteins, such as Vangl2, are exclusively involved in the non canonical Wnt/ PCP pathway (Torban et al., 2004), others function in multiple Wnt pathways including the canonical Wnt/  $\beta$ -catenin dependent pathway (Schwarz-Romond et al., 2002; Bryja et al., 2009; Chien et al., 2009). In the latter, Wnt binds to Fz and Lrp5/6, and this is followed by Fz binding to Dishevelled (Dvl) in vertebrates. Dvl then binds and destabilizes the  $\beta$ -catenin destruction complex that consists of Axin/Conductin, the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein, and glycogen synthase kinase 3. This complex constitutively binds to  $\beta$ -catenin and targets it for poly-ubiquitination and degradation in the proteasome. When the  $\beta$ -catenin destruction complex is destabilized,  $\beta$ -catenin accumulates in the nucleus, where it binds to members of LEF/TCF transcription factor family, preventing their repression of gene transcription and functioning as a transcription co-activator. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway has a crucial role in mediating cell proliferation and cell fate during development (Niehrs, 2012). A recent study of a conditional mouse knockout of  $\beta$ -catenin in the dorsal neural folds has demonstrated the importance of this pathway in caudal neural tube closure and elongation. In these knockout mice, a diminished expression of *Pax3* and *Cdx2* at the dorsal posterior neuropore and of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling target genes *T*, *Tbx6* and *Fgf8* at the tail bud lead to spina bifida aperta, caudal axis bending and tail truncation (Zhao et al. 2014).

*Ankrd6* (*Ankyrin repeat domain 6*) is a distant homolog of the fly PCP mediator *diego* and acts as a molecular switch between both Wnt pathways. It promotes signaling of the non-canonical Wnt/PCP pathway and simultaneously inhibits gene transcription through the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin, encoded by *Ankrd6*, is a cytoplasmic protein with eight N-terminal ankyrin repeat domains, a conserved central domain and a C-terminal domain (Schwarz-Romond et al., 2002). In *Drosophila*, it was demonstrated that its orthologue *diego* specifically interacts with *stbm* and *pk* through its ankyrin repeats and with *dsh* through the 181 amino acids just after these repeats (Das et al., 2004; Jenny et al., 2005). These interactions are essential for asymmetric formation and localisation of PCP multiprotein complexes. In vertebrates, Diversin interacts directly with *Dvl* through its ankyrin repeats and both proteins mediate Wnt/PCP signaling in a mutual manner in cell cultures and in zebrafish embryos (Moeller et al., 2006). The function of Diversin as a PCP activator seems to be mediated by its ankyrin repeat domain. Notably, Diversin also binds to CKI $\epsilon$  and Conductin or Axin through its central and C-terminal domains respectively. This leads to recruitment of CKI $\epsilon$  to the  $\beta$ -catenin degradation complex leading to phosphorylation and degradation of  $\beta$ -catenin and subsequent inhibition of  $\beta$ -catenin/TCF signaling (Schwarz-Romond et al., 2002). The dual role of Diversin in both Wnt pathways seems to be specific to vertebrates; however, its physiological relevance in normal and abnormal development remains unclear. In this study, we studied the role of *DIVERSIN* as a molecular switch between both Wnt pathways in human NTDs. We first analysed the coding sequence of its gene *ANKRD6* in a well characterized cohort of patients affected with various forms of open and closed NTDs and controls and we next evaluated the effect of rare novel mutations identified in *ANKRD6* on downstream effectors of both Wnt pathways.

## Subjects and methods

Our screening strategy of *ANKRD6*(NM\_001242809.1) in human NTDs focused on its coding region that consists of 2184 nucleotides distributed over 15 exons. Our NTD cohort consisted of 391 NTD Italian patients and 82 patients (mainly French Canadians) affected with various forms of open and closed nonsyndromic or isolated NTDs (473) who were respectively recruited at the Spina Bifida Center of the Gaslini Hospital in Genova, Italy and at

Sainte Justine Hospital in Montreal, Canada. Details of this cohort are provided elsewhere (De Marco et al., 2012). Briefly, 44% were males, 97 % were white Caucasians, the mean age at diagnosis was 2.6 years and the distribution of the major subgroups was 3% cranial, 52% open spinal, and 45% closed spinal NTDs. The control group consisted of 433 Italian individuals and 206 Caucasians of French-Canadian origin. Samples from patients and controls were collected with the approval of the Local Ethics Committees and written informed consent was obtained from all participating individuals.

Rare mutations (minor allele frequency <5%) identified in *ANKRD6* were verified in the 1000 Genomes project (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) and the NHLBI GO Exome Sequencing Project (Exome Variant Server at [evs.gs.washington.edu/EVS](http://evs.gs.washington.edu/EVS)). Initial bioinformatics analysis of these mutations was done using PolyPhen (Polymorphism Phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>) programs. Functional validation of the effect of these mutations on protein interaction with each of VANGL2, PK1, DVL3, CK1 $\epsilon$  and Axin was done using the yeast two hybrid system as previously described (Kibar et al., 2007). The wild-type DIVERSIN open reading frame was cloned in pCDNA3.1 Myc/His A and the human mutations were introduced in this backbone by in site-directed mutagenesis. The effect of the DIVERSINvariants on PCP signaling and on canonical Wnt/ $\beta$  catenin signaling was tested using the AP1 responsive JNK reporter assay (PathDetect Kit, Stratagene) and the TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin assay using the TOPFLASH/pGL3-OT in mammalian HEK cells respectively as previously described (Allache et al., 2014). Briefly, HEK cells were transfected with [100 ng pAP1-Luc, 300 ng pSV- $\beta$ -Galactosidase, and 100 ng wild-type or mutant DIVERSINor empty pCDNA3.1 vector alone as control] DNA/well in 24-well plates. For the TCF/LEF-1 assay, HEK 293T cells were transfected with [150 ng TOPFLASH/pGL3-OT, 300 ng pSV- $\beta$ -Galactosidase and 50 ng of wild-type DVL3, 100 ng of wild-type or mutant DIVERSINconstructs or pCDNA3.1 vector alone as control] per well in 24-well plates. All mammalian cell transfections were done using Polyethylenimine (PEI) and performed in triplicates. Following transfection, cells were grown in DMEM/10% FBS overnight and in Wnt5a-enriched medium (obtained from L Wnt-5a cells) or Wnt3a-enriched medium



(obtained from L Wnt-3a cells) for another overnight before measuring the TCF/LEF-1 or JNK-dependent AP1 activity respectively.

## RESULTS

### Mutation screening of *ANKRD6* in NTD patients and controls

We have identified 4 novel rare missense mutations (c.1643C>T, c.1760G>A, c.1840G>A, c.1895G>A) in 4 NTD patients that were absent in 471 ethnically-matched controls. The SNV c.1840G>A was reported once in the 1000 Genomes project and the SNV c.1895G>A was reported with a frequency of 0.02% (3/12664 chromosomes) in the NHLBI GO Exome Sequencing Project. All 4 mutations were detected in a heterozygous state in sporadic cases of NTDs. All variants mapped to the C terminal Axin/Conductin binding domain of the protein and 3 were predicted to be damaging to protein function using bioinformatics tools (PolyPhen or SIFT) (Table 1). None mapped close to the exon-intron junctions and thus most likely does not affect gene splicing.

The c.1643C>T variant was identified in a 20 year old Italian female affected by right anterior thoracic meningocele, hydromyelia, intra-dural lipoma, multiple costo-vertebral malformations and scoliosis. This variant changes a highly conserved proline residue into leucine at position 548 (p.Pro548Leu, Supplementary Figure 1). Proline and leucine are both nonpolar amino acids; however, proline-leucine substitution can be considered a nonconservative as the size of the hydrophobic side group is significantly increased. The c.1760G>A variant was detected in a 7 year old female affected with sacral lipomyeloschisis and posterior meningocele. This mutation changes a weakly conserved arginine residue at position 587 by glutamine, a nonconservative substitution that removes the positive charge of the amino acid side chain and changes its size (p.Arg587Gln, Supplementary Figure 1). The c.1840G>A variant was detected in a 28 year old Italian female affected with sacral lipomyeloschisis, bilateral flat feet and scoliosis. It changes a moderately conserved valine residue at position 614 to an isoleucine (p.Val614Ile, Supplementary Figure 1). Although a substitution with isoleucine preserves the hydrophobic character of valine, it introduces a

bulky side chain, which may have structural or functional consequences. The c.1895G>A variant was detected in a 12 year old Italian male with caudal agenesis which is a partial agenesis of sacrum, total agenesis of coccyx, tethered cord, lipoma of the filum, hydromelia and ano-rectal malformations (Rossi et al. 2004). This mutation changes a moderately conserved arginine residue at position 632 into a histidine (p.Arg632His, Supplementary Figure 1). This substitution is conservative; however, histidine is a medium size less polar amino acid with an imidazole ring compared to the larger basic arginine.

To compare the frequency of rare mutations in *ANKRD6* in NTD patients versus controls, we sequenced the whole coding region of this gene in 150 ethnically matched controls. We identified 2 rare variants in 2 controls: c.505C>T and c.1397 T>G that lead to p.Leu169Phe and p.Val466Gly respectively (data not shown). Only the variant, p.Leu169Phe, was reported with a MAF of 0.1 % (2 in 1258 chromosomes) in the 1000 Genomes project.

## **Functional validation of rare mutations identified in *ANKRD6***

We first tested the functional effects of each of the 4 NTD variants detected in *ANKRD6* on the direct interaction of its encoded protein DIVERSIN with members of the non canonical/PCP (VANGL2, PK1 and DVL3) and the canonical Wnt/B catenin (CKI $\epsilon$  and Axin) pathways using the yeast two hybrid system. All constructs, except for CKI $\epsilon$ , were expressed at stable levels in yeast cells (data not shown). All interactions between wild-type constructs were confirmed in our study including the interaction of DIVERSIN with each of VANGL2 and PK1 previously demonstrated only in *Drosophila* (Das et al., 2004). None of the 4 NTD variants detected in DIVERSIN in our cohort affected the various interactions tested, suggesting the lack of effect on this specific functional aspect of the protein. All Y2H results are summarized in Supplementary Table 1.

Diversin plays a dual regulatory role in Wnt signaling where it activates the non canonical Wnt/PCP pathway and simultaneously inhibits the Wnt/ $\beta$  catenin pathway

(Schwarz-Romond et al. 2002). We consequently tested the effect of the four DIVERSIN variants identified in NTD patients ( $DIV^{p.Pro548Leu}$ ,  $DIV^{p.Arg587Gln}$ ,  $DIV^{p.Val614Ile}$ ,  $DIV^{p.Arg632His}$ ) on final readouts of both pathways. For PCP signaling, activity of JNK in the presence of the well known PCP activator Wnt5A was assayed using the AP1 responsive JNK reporter assay in mammalian HEK293T cells. JNK activity was increased to ~4.5X by wild-type DIVERSIN transfection in the presence of Wnt5A (Figure 1A), in agreement with previous studies. Notably, this activity was significantly lower in cells transfected with each of the  $DIV^{p.Pro548Leu}$  and  $DIV^{p.Arg632His}$  cDNAs compared to wild-type DIVERSIN, suggesting a hypomorphic activity for each of these mutants ( $P<0.01$  and  $P<0.05$  respectively) (Figure 1A). The other 2 variants  $DIV^{p.Arg587Gln}$ ,  $DIV^{p.Val614Ile}$ , behaved like the wild-type allele (Figure 1A). Protein expression levels for all Myc-tagged DIVERSIN variants were similar to the wild-type (Fig. 1E).

For investigating the effect of the 4 DIVERSIN NTD-associated variants on canonical Wnt/ $\beta$  catenin signaling, the TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin assay using the TOPFLASH/pGL3-OT in mammalian HEK cells was used. It was previously shown that DIVERSIN inhibits DVL3 activation of the Wnt canonical pathway in the presence of Wnt3A and DVL3 (Schwarz-Romond et al. 2002). We consequently tested the effect of the four DIVERSIN variants detected in human NTDs on this inhibitory role. Transient over-expression of a full-length myc-tagged DVL3 construct in HEK293T cells in the presence of Wnt3A gave robust activation of the TCF/ $\beta$ -catenin-dependent luciferase (Figure 1C). This activation was significantly inhibited by co-transfection of wild-type DIVERSIN cDNA ( $P<0.05$  compared to *DVL3* alone) (Figure 1C). When DVL3 was co-transfected with each of the  $DIV^{p.Pro548Leu}$  and  $DIV^{p.Arg632His}$  variants, a significant reduction in the ability of the mutant DIVERSIN to inhibit TCF/LEF-1 activation by DVL3 was observed ( $P<0.01$  and  $P<0.05$  respectively) (Figure 1C). The other 2 variants  $DIV^{p.Arg587Gln}$ ,  $DIV^{p.Val614Ile}$ , behaved like the wild-type allele (Figure 1C). This is in agreement with results from the PCP/ JNK activation assay, confirming that  $DIV^{p.Pro548Leu}$  and  $DIV^{p.Arg632His}$  act as hypomorphs and are most likely pathogenic.

To compare the functional relevance of the 2 variants identified in DIVERSIN in controls, p.Leu169Phe and p.Val466Gly, to those identified in NTD patients, we validated

them using the TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin and the AP1 responsive JNK reporter assays as described above. Both variants identified in controls behaved like the wild-type allele in both assays suggesting that they do not affect protein function in canonical and non canonical Wnt signaling pathways (Figure 1 B, D). Protein expression levels for both Myc-tagged DIVERSIN variants were similar to the wild-type (Fig. 1F).

## Discussion

Genetic studies in animal models clearly demonstrate the presence of an antagonism between both Wnt pathways that is tightly regulated by a group of proteins including Diversin and Lrp6 (Schwarz-Romond et al. 2002; Chien et al. 2009; Niehrs 2012). The role of this antagonism in normal and abnormal developmental processes remains largely undetermined. In a recent study by our group, we demonstrated the association of rare and novel missense mutations in *LRP6* with human NTDs (Allache et al. 2014). Lrp6 has an opposite regulatory role in Wnt signaling to Diversin: it activates the canonical Wnt pathway while simultaneously inhibiting the PCP pathway. We showed that three *LRP6* mutations in NTDs affected both Wnt pathways reciprocally and led to a reduced Wnt canonical activity and enhanced PCP signaling. In this study, we identified 2 hypomorphic variants in DIVERSIN in human NTDs that also affect both Wnt pathways, where they led to reduced PCP signaling and enhanced Wnt canonical activity. These recent data on this group of molecular switches provide important insights into the role of a tightly regulated and highly dosage sensitive antagonism between both Wnt pathways in neurulation.

We hypothesize that the two hypomorphic variants detected in DIVERSIN in NTDs could lead to less recruitment of the  $\beta$ -catenin degradation complex causing an over-activation of the Wnt canonical pathway and simultaneous inhibition of Wnt/PCP signaling, resulting in defects in neural tube formation. Alternatively, these two variants could have a direct effect on PCP signaling since it was demonstrated in *Drosophila* that Diego binds directly to Dishevelled and promotes Frizzled signalling (Jenny et al. 2005). Additional experiments in cellular or animal models are needed to further validate either hypothesis and

to investigate the importance of such dosage-sensitive antagonism between Wnt pathways in neurulation.

Two other rare variants identified in DIVERSIN in NTD patients did not affect the protein function in any of the validation assays used in this study. These variants could be either non pathogenic or could represent very weak alleles and the functional assays we used were not sensitive enough to detect a difference. Additional studies in complementary *in vivo* models, like zebrafish, are essential for determining the pathogenic nature of these variants.

While the difference in rare mutation frequency between NTD patients ( 4 in 473) and controls ( 2 in 150) is not statistically significant, it is interesting that both variants identified in the controls mapped to the ankyrin repeats and CKIe binding domains while all 4 NTD-associated variants clustered in the C terminal Axin/Conductin binding domain of the protein. Both variants identified in controls did not affect either PCP signaling or Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the reporter assays used in this study. One could argue that these variants could represent weak alleles whose effects cannot be detected in the used assays; however, the fact that these variants were detected in apparently healthy controls increases the likelihood that they are not pathogenic. Genetic and functional studies in larger cohorts are needed before drawing major conclusions on the role of novel rare variants in this gene in NTD cases versus controls.

Although more than 200 genes are known to cause NTDs in mice (Juriloff and Harris 2012), there has been rather limited progress in delineating the molecular basis underlying most human NTDs. Genetic studies in human cohorts have focused primarily on candidate genes derived from mouse models and were relatively successful in associating variants in PCP genes including *VANGLI*, *PK1*, and *CELSRI* with a small fraction (1-2%) of NTD cases (Kibar et al., 2007; Bosoi et al., 2011). In all of these studies, genetic variants at PCP genes were incompletely penetrant and it was hypothesized that they must interact with other genes to modulate the incidence and severity of the disease. In this study, we present additional evidence for the role of an activator of PCP signaling, *ANKRD6*, as a predisposing genetic factor to a small fraction of NTDs. Unfortunately, parents of NTD patients carrying *ANKRD6* novel mutations were not available for segregation analyses. Both patients who

carried hypomorphic variants in *ANKRD6* did not represent classical isolated NTDs. In addition to their NTDs, one patient had multiple costo-vertebral malformations and scoliosis and the other patient had agenesis of the sacrum and coccyx and ano-rectal malformations. This polymalformative phenotype could reflect a pleiotropic effect of the gene and/or the presence of distinct genetic modifiers. Notably, one patient carrying the DIV<sup>p.Pro548Leu</sup> (c.1643C>T) variant was also heterozygous for a potentially pathogenic *de novo* null mutation, p.Cys615X (c.1843\_1844insA), in *FZD6* (De Marco et al., 2012). It will be interesting to examine if these two mutations might act in combination to confer a high risk for developing NTDs. Future studies aimed at investigating genetic interactions among PCP novel rare variants identified in NTD patients and aggregation of these rare variants as a class in patients versus controls will help better understand the overall contribution of this pathway to NTD pathogenesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all participants in this study. We thank Drs. Nicolas Pilon (University of Québec in Montréal) for providing Wnt5a producing L cells and the pTOPFLASH (pGL3) vector, Sylvain Chemtob (University of Montréal) for providing Wnt3a producing L cells. ZK is funded by the Canadian Institutes for health Research and Le Fonds de Recherche du Québec - Santé, PDM by 5x Mille Ricerca 2008 and EM Associazione Italiana Studio Malformazioni ONLUS. VC would like to acknowledge Telethon-Italy (Grant no.GGP08051), Ricerca Corrente Ministero della Salute and private funding resources. We also thank A.S.B.I. (Associazione Spina Bifida Italia).

Authors have no conflict of interest to declare.

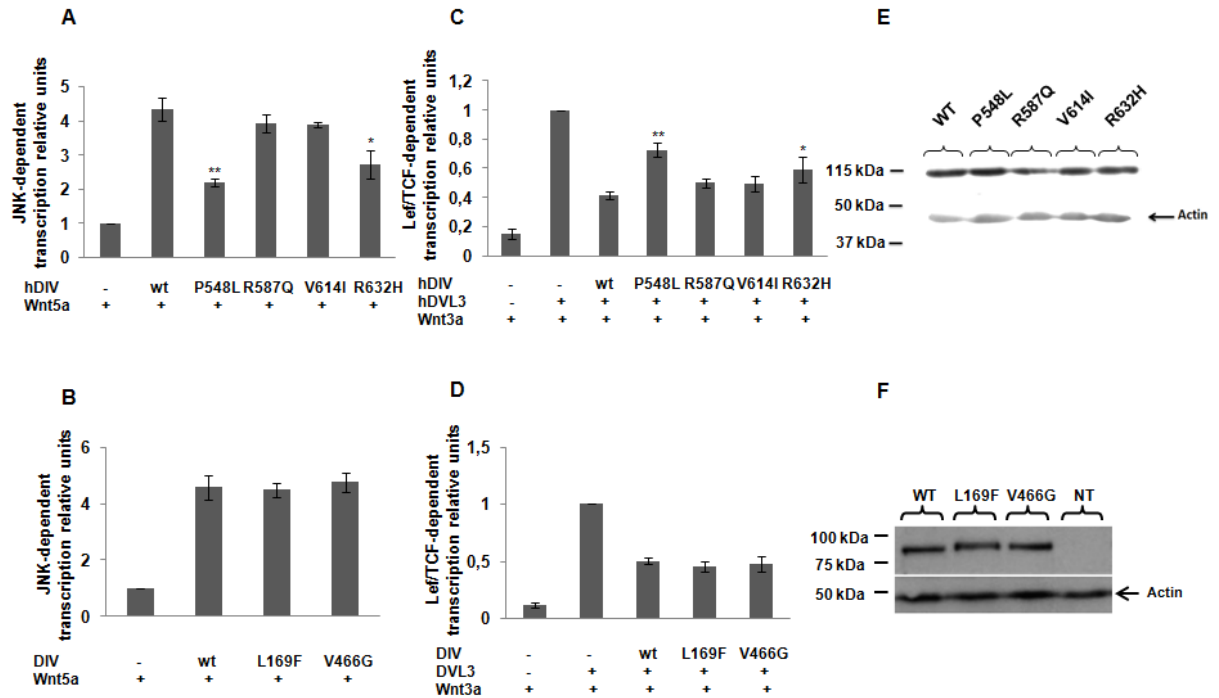
## REFERENCES

- Allache R, Lachance S, Guyot MC, Marco P De, Merello E, Justice MJ, Capra V, Kibar Z. 2014. Novel mutations in Lrp6 orthologs in mouse and human neural tube defects affect a highly dosage-sensitive Wnt non-canonical planar cell polarity pathway. *Hum. Mol. Genet.* 23: 1687–1699.
- Bassuk AG, Kibar Z. 2009. Genetic basis of neural tube defects. *Semin. Pediatr. Neurol.* 16: 101–110.
- Blom HJ, Shaw GM, Heijer M den, Finnell RH. 2006. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 724–731.
- Bosoi CM, Capra V, Allache R, Trinh VQ-H, Marco P De, Merello E, Drapeau P, Bassuk AG, Kibar Z. 2011. Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene PRICKLE1 in human neural tube defects. *Hum. Mutat.* 32: 1371–1375.
- Bryja V, Andersson ER, Schambony A, Esner M, Bryjová L, Biris KK, Hall AC, Kraft B, Cajanek L, Yamaguchi TP, Buckingham M, Arenas E. 2009. The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo. *Mol. Biol. Cell* 20: 924–936.
- Chien AJ, Conrad WH, Moon RT. 2009. A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J. Invest. Dermatol.* 129: 1614–1627.
- Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. 2004. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Dev. Camb. Engl.* 131: 4467–4476.
- Greene NDE, Stanier P, Moore GE. 2011. The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 6: 875–883.
- Jenny A, Reynolds-Kenneally J, Das G, Burnett M, Mlodzik M. 2005. Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat. Cell Biol.* 7: 691–697.
- Juriloff DM, Harris MJ. 2012. A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 94: 824–840.
- Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, Kirillova I, Marco P De, Merello E, Hayes JM, Wallingford JB, Drapeau P, et al. 2007. Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 356: 1432–1437.
- Marco P De, Merello E, Rossi A, Piatelli G, Cama A, Kibar Z, Capra V. 2012. FZD6 is a novel gene for human neural tube defects. *Hum. Mutat.* 33: 384–390.

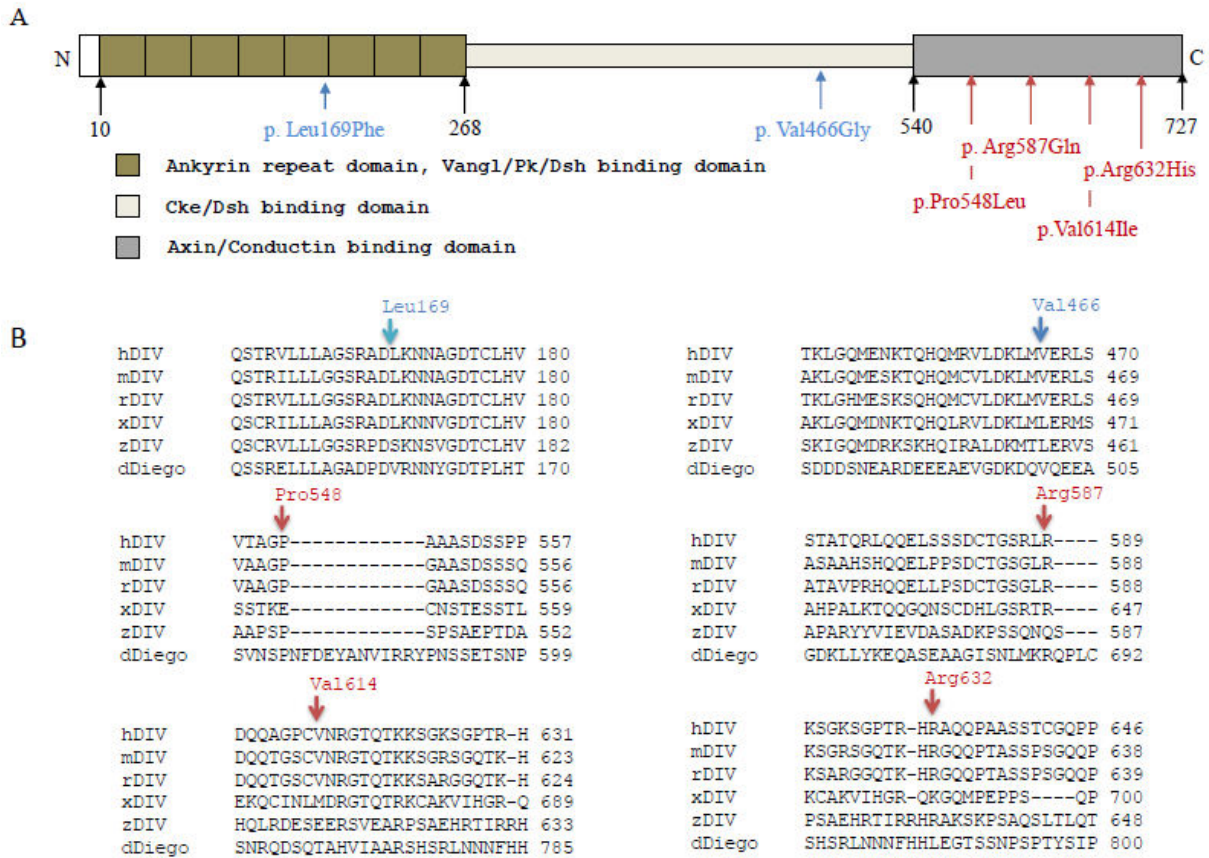
- Moeller H, Jenny A, Schaeffer H-J, Schwarz-Romond T, Mlodzik M, Hammerschmidt M, Birchmeier W. 2006. Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 15900–15905.
- MRC Vitamin Study Research Group. 1991. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338: 131–137.
- Niehrs C. 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 767–779.
- Rossi A, Biancheri R, Cama A, Piatelli G, Ravegnani M, Tortori-Donati P. 2004. Imaging in spine and spinal cord malformations. *Eur. J. Radiol.* 50: 177–200.
- Roszko I, Sawada A, Solnica-Krezel L. 2009. Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20: 986–997.
- Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer H-J, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W. 2002. The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev.* 16: 2073–2084.
- Simons M, Mlodzik M. 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu. Rev. Genet.* 42: 517–540.
- Torban E, Kor C, Gros P. 2004. Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet. TIG* 20: 570–577.
- Wallingford JB. 2005. Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 135C: 59–68.
- Zhao T, Gan Q, Stokes A, Lassiter RNT, Wang Y, Chan J, Han JX, Pleasure DE, Epstein JA, Zhou CJ. 2014.  $\beta$ -catenin regulates Pax3 and Cdx2 for caudal neural tube closure and elongation. *Dev. Camb. Engl.* 141: 148–157.



## FIGURE LEGEND



**Figure 1.** Functional validation of rare variants detected in DIVERSIN in NTD patients and controls using JNK-AP-1 responsive and TCF/LEF-1 responsive Wnt/ $\beta$ -catenin and reporter assays. A-B. JNK-dependent AP1 activity was significantly decreased in cells transfected with each of the  $DIV^{p.Pro548Leu}$  and  $DIV^{p.Arg632His}$  cDNAs, as compared to wild-type DIVERSIN (A). This activity was not affected in HEK cells transfected with either  $DIV^{p.Arg587Gln}$  or  $DIV^{p.Val614Ile}$  from NTD patients (A) or  $DIV^{p.Leu169Phe}$  and  $DIV^{p.Val466Gly}$  cDNAs from controls (B). C-D. TCF/LEF-1 activity in the presence of Wnt3a was significantly inhibited by co-transfection of DIVERSIN with DVL3. Co-transfection of each  $DIV^{p.Pro548Leu}$  and  $DIV^{p.Arg632His}$  with DVL3 in the presence of Wnt3a significantly reduced this inhibitory effect (C).  $DIV^{p.Leu169Phe}$  and  $DIV^{p.Val466Gly}$  cDNAs from NTD patients (C) or  $DIV^{p.Leu169Phe}$  and  $DIV^{p.Val466Gly}$  cDNAs from controls (D) behaved like the wild-type DIV in the TCF/LEF-1 reporter assay. E-F. Representative western blots of HEK cells transfected with each of the myc-tagged DIVERSIN variants detected in NTD patients (E) and in controls (F) show protein expression levels that were comparable to the wild-type. Statistical analysis was done using the student's t- test; \*,  $P > 0.05$ .



**Supplementary Figure 1.** Rare novel variants in DIVERSIN in human neural tube defects (NTDs). A. A schematic representation of DIVERSIN. The approximate positions of the rare missense mutations identified in NTD patients (p.Pro548Leu, p.Arg560Gln, p.Val614Ile, and p.Arg632His) (indicated in bold) and in controls (p.Leu169Phe and p.Val 466Gly) (indicated in Italics) are shown. B. A partial alignment of human DIVERSIN with 5 other orthologous sequences. Altered amino acid residues are indicated by arrows. Accession numbers: Homo sapiens DIVERSIN (hDIV), NP\_001229738.1; Mus musculus Diversin (mDiv), NP\_001012453.1; Rattus norvegicus Diversin (rDiv), NP\_001128441.1; Danio rerio Diversin (zDiv), NP\_919404.1; Xenopus tropicalis Diversin (xDiv), NP\_001106372.1; Drosophila melanogaster Diego, (dDiego), NP\_724973.1.

Table 1. Novel rare mutations (<5%) identified in <i>ANKRD6</i> in neural tube defect patients and controls. <sup>a</sup>							
Mutation	AA change	Polyphen	SIFT	JNK-AP1	LEF/TCF	Rs #	Phenotype
<i>Variants detected in patients</i> <sup>b</sup>							
c.1643C>T	p.Pro548Leu	Benign	Not tolerated	+	+	NA	F, DOB 1993, RA-MC, hydromyelia, IDL, costo-vertebral malformation and scoliosis
c.1760G>A	p.Arg587Gln	Possibly damaging	Tolerated	-	-	NA	F, DOB 2006, sacral lipomyeloschisis, sacral posterior MC
c.1840G>A	p.Val614Ile	Benign	Tolerated	-	-	rs200296488	F, DOB 1985, sacral lipomyeloschisis, BFF, scoliosis
c.1895G>A	p.Arg632His	Probably damaging	Not tolerated	+	+	rs200289900	M, DOB 2000, Caudal agenesis
<i>Variants detected in controls</i>							
c.505C>T	p.Leu169Phe	Probably damaging	Tolerated	-	-	rs189493829	Apparently healthy
c.1397T>G	p.Val466Gly	Benign	Not tolerated	-	-		Apparently healthy

<sup>a</sup> The DNA mutation and amino acid numbering systems are based on *ANKRD6* cDNA sequence with the accession NM\_001242809.1 and DIVERSIN protein sequence with the accession NP\_001229738.1 respectively.

<sup>b</sup> All 4 mutations were absent in 471 ethnically matched controls.

Abbreviations: +, significantly different from wt; -, not significantly different from wt; DOB: date of birth; F, female; M, male; AA, amino acid; Polyphen, polymorphism phenotyping software; SIFT, Sorting Intolerant From Tolerant software; MC, meningocele; RA-MC, right anteriorthoracic-meningocele; IDL, intra-dural lipoma; BFF, bilateral flat feet; JNK-AP1, c-Jun N-terminal kinase activator protein-1; TCF/LEF, T-cell factor/lymphoid enhancing factor.

**Supplementary Table 1. Interaction studies of wild type and mutant DIVERSIN with DVL3, PK1, VANGL2 and AXIN2 using the yeast two hybrid system.**

	DIVERSIN (aa1-727)		DIVERSIN-N-Terminal (aa1 -287)	DIVERSIN-C-Terminal (aa269-727)	
	wt	Mutant <sup>a</sup>	wt	wt	Mutant <sup>a</sup>
DVL3 (aa1-716)	+	+	+	-	nd
DVL3-N-Terminal (aa1-395)	+	+	+	-	nd
DVL3-C-Terminal (aa385-716)	+	+	+	-	nd
PK1 (aa1-831)	+	+	+	-	nd
PK1-C-Terminal (aa309-831)	+	+	+	-	nd
Vangl2-C-Terminal (aa238-521)	+	+	+	-	nd
AXIN2 (aa1-843)	+	+	-	+	+
AXIN2-N-Terminal (aa1-472)	+	+	-	+	+
AXIN2 (aa337-472)	+	+	-	+	+

Each of the DIVERSIN mutants, DIVp.Pro548Leu, DIVp.Arg587Gln, DIVp.Val614Ile, DIV p.Arg632His, was tested for its effect on interaction with other proteins as indicated.

aa; amino acid; nd: not determined

## **5. Role of the planar cell polarity gene *CELSRI* in neural tube defects and caudal agenesis**

Redouane Allache<sup>1</sup>, Patrizia De Marco<sup>2</sup>, Elisa Merello<sup>2</sup>, Valeria Capra<sup>2</sup>, and Zoha Kibar<sup>1,\*</sup>

Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology. 2012 Mar; 94(3):176-81.

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, CHU Sainte Justine Research Center and University of Montréal; <sup>2</sup>U.O. Neurochirurgia, Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

Presented at the XII International Congress of Human Genetics, 11-15 October 2011, Montréal, Québec, Canada

\*To whom correspondence should be addressed: Zoha Kibar, CHU Sainte Justine Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine, Room A711, Montréal, QC H3T 1C5 Canada; Tel: (514) 345 4931 X 3984.

Keywords: neural tube defects, caudal agenesis, planar cell polarity pathway, *CELSRI*, candidate gene, sequencing analysis.

## **Apport de coauteurs**

### **Redouane Allache:**

Le séquençage du gène CELSR1 dans 437patients atteints par des ATN qui ont fait l'objet de l'étude et dans 639contrôles

L'analyse bioinformatique des mutations identifiées

Les expériences de biologie moléculaireet les analyses statistiques

La conception et la préparation des figures et tableaux décrites dans l'article,

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

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

Le recrutement du groupe de 437patients italiens inclus dans cette étude ainsi que des 433contrôles italiens

### **Zoha Kibar:**

La conception du projet et la supervision des expériences décrites dans l'article.

Le soutien technique,scientifiqueet matériel pour le déroulement et la réalisationdes expériences.

La correction de la rédaction du manuscrit.

## ABSTRACT

**Background:** Neural tube defects (NTDs), including anencephaly and spina bifida, have a complex etiology. Defects in the planar cell polarity (PCP) signaling pathway have been strongly associated with NTDs in animal models and human cohorts. In this genetic study, we examined the core PCP gene *CELSRI* in NTDs and caudal agenesis cases to determine whether mutations at this gene predispose to these defects.

**Methods:** We sequenced the coding region and the exon-intron junctions of *CELSRI* in a cohort of 473 patients affected with various forms of open and closed NTDs (412) or caudal agenesis (61). Novel and rare variants (<1%) were genotyped in a cohort of 639 ethnically-matched individuals. The effect of novel missense mutations absent in controls and in public databases on protein function was predicted *in silico*.

**Results:** We identified in our cohort one nonsense mutation in exon 1 of *CELSRI* that truncates the majority of the protein in one NTD patient and one in-frame 12 bp deletion that removes a putative PKC phosphorylation “SSR” motif in one caudal agenesis patient. We also detected a total of 13 novel missense variants in 12 patients (11 NTDs and 1 caudal agenesis) that were predicted to be pathogenic *in silico*.

**Conclusions:** We detected novel *CELSRI* mutations predicted to be pathogenic in 2.9% of our NTD cohort and 3.3% of our caudal agenesis cohort. Our findings implicate *CELSRI* as a risk factor for NTDs or caudal agenesis and provide additional evidence for a pathogenic role of PCP signaling in these malformations.

## Introduction

Neural tube defects are the most common and severe malformations of the central nervous system, affecting 1-2/1000 live births. They result from failure of neural tube closure early during embryogenesis, which could occur at any level along the rostrocaudal axis. The two most common NTDs are anencephaly and myelomeningocele (spina bifida) that affect the cranial and spinal region of the neural tube respectively (Bassuk and Kibar, 2009). Anencephaly is characterized by complete absence of the skull and is invariably lethal. Myelomeningocele (MMC), which is most commonly lumbosacral, involves the protrusion of the spinal cord through a bony defect within a sac-like membrane that contains cerebrospinal fluid. MMC is compatible with life but leads to severe and life-long physical and developmental disabilities. Anencephaly and MMC are referred to as “open” NTDs where the nervous system and/or meninges are exposed to the environment without normal skin covering. A heterogeneous group of “closed” NTDs involves no exposed neural tissue or visible cystic mass and is categorized clinically depending on the presence (lipomyeloschisis, lipomyelomeningocele, meningocele, and myelocystocele) or absence of a subcutaneous mass (split cord malformations, dermal sinus, and intradural lipoma). Although periconceptional folic acid supplementation has significantly reduced the frequency of NTDs, roughly 30% of NTDs appear resistant to folic acid and these devastating conditions still affect thousands of families each year (Bassuk and Kibar, 2009). Caudal agenesis is a heterogeneous constellation of anomalies comprising total or partial agenesis of the spinal column, anal imperforation, genital anomalies, bilateral renal dysplasia or aplasia, pulmonary hypoplasia, and lower limb abnormalities (Rossi et al., 2004). Caudal regression is thought to arise from a defect in gastrulation leading to a deficiency of caudal mesoderm (Aslan et al., 2001). It has been suggested that there is an etiological relationship between NTDs and caudal agenesis and they have been considered together in some clinical reviews (Tortori-Donati et al., 2000).

There are few reported associations of NTDs with chromosomal abnormalities and distinct syndromes. Most cases of NTDs are sporadic with a complex etiology involving both environmental and genetic factors that remain largely uncharacterized (Bassuk and Kibar, 2009). Of the genes that have been associated with NTDs, planar cell polarity (PCP) genes



have been implicated as predisposing factors in a fraction of isolated NTDs (Kibar et al., 2007; 2009; 2011; Bosoi et al., 2011; Seo et al., 2011). The PCP pathway, also called the non-canonical Frizzled/Dishevelled pathway, controls the polarity of cells within the plane of an epithelium in numerous tissues in both *Drosophila* and vertebrates. A group of “core” PCP genes was initially identified in the fly and include: *frizzled (fz)*, *dishevelled (dvl)*, *vang gogh/strabismus(vang/stbm)*, *flamingo (fmi)*, *prickle (pk)* and *diego (dg)* (Simons and Mlodzik, 2008). These genes are highly conserved in vertebrates where they mediate a complex morphogenetic process called convergent extension (CE) during gastrulation and neurulation. CE reflects a polarized cellular rearrangement that leads to the narrowing and lengthening of the embryonic axis during gastrulation and of the neural plate during neurulation. Mutations in PCP genes lead to a wide range of developmental defects mainly a shortened body axis, a widened neural plate and neural tube defects (Simons and Mlodzik, 2008). In humans, rare and novel mutations at *VANGL1*, *VANGL2* and *PRICKLE1* (homologs of *Vang/Stbm* and *Pk* respectively) were associated with NTDs in a subset of patients (Kibar et al., 2007; 2009; 2011; Bosoi et al., 2011).

*CELSR1-3* (for *Cadherin EGF LAG Seven-pass G-type Receptor1-3*), homologs of the PCP core gene *Fmi*, are evolutionary conserved seven-pass transmembrane receptors that belong to the cadherin superfamily. Cadherins are calcium-dependent cell adhesion molecules that are implicated in many biological processes, including cell signaling during embryogenesis, and the formation of neural circuits. *CELSR* proteins contain nine N-terminal cadherin repeats, followed by eight EGF-like domains, seven putative transmembrane segments and an anonymous intracellular C-terminus (Takeichi, 2007). *Celsr1–3* are broadly expressed in the nervous system at early developmental stages, and each paralog showed characteristic expression patterns in the developing CNS (Tissir et al., 2002). To date, only *Celsr1* was shown to cause NTDs when mutated in mice. In fact, homozygous mouse mutants generated by N-ethyl-N-nitrosurea (ENU) and carrying missense mutations within the coding region of *Celsr1* exhibit a severe form of NTDs called craniorachischisis where the neural tube remains open from the midbrain/hindbrain boundary throughout the spinal region (Curtin et al., 2003). In zebrafish, knockdown of the *Celsr1* homologous gene product with antisense morpholino oligonucleotides caused CE defects manifested mainly by marked shortening of

the anteroposterior axis (Formstone et al., 2005). Given these data, along with the strong implication of PCP signaling in NTDs, we hypothesized that *CELSRI* mutations might increase the risk for NTDs in a proportion of affected cases and that they might also affect risk for caudal agenesis.

## Subjects and Methods

The patients cohort consisted of 391 Italian patients recruited at the Spina Bifida Center of the Gaslini Hospital in Genova, Italy and 82 patients (mainly French Canadians) recruited at Sainte Justine Hospital in Montreal, Canada. The majority of patients included in this cohort (97%) were white Caucasians. Details of this cohort were as previously described (Supplementary Table I; De Marco et al., 2011). Patients (N=473) were affected with non-syndromic or isolated NTDs (412) or caudal agenesis (61) and were diagnosed according to Tortori-Donati classification (Tortori-Donati et al., 2000; Rossi et al., 2004; 2006). The distribution of the major subgroups in the NTD cohort was as follows: 3% cranial, 52% open spinal and 45% closed spinal NTDs. Myelomeningocele was the major NTD present in the NTD cohort at a frequency of 52%. All caudal agenesis patients included in this study had spinal defects. Around 19% of patients had a positive family history documented by clinical records (MRI and X-ray images). The control group consisted of 639 ethnically-matched individuals including 433 Italian individuals and 206 Caucasians of French-Canadian origin. Samples from patients and controls were collected with the approval of the Local Ethics Committees and written informed consent was obtained from all participating individuals.

Our screening strategy of *CELSRI* focused on the coding exons where most of the disease-associated mutations are found (Stenson et al., 2009). The entire coding region of *CELSRI* of 9042 nucleotides is distributed over 35 exons (GeneBank accession number AF231024; ENST00000262738). The coding region of *CELSRI* along with the exon-intron junctions were amplified in 42 PCR amplicons and sequenced using the Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (ABI, Carlsbad, California, USA). Samples were run on the ABI Prism Big Dye Systems at the Genome Quebec Innovation Center (Montréal, Québec, Canada) and analyzed using the SeqMan<sup>®</sup> sequence assembly and SNP discovery software (DNASTAR<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, USA). All sequence variations were queried against three public

databases: the dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), the 1000 genome project (<http://www.1000genomes.org>) and the NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) (<http://snp.gs.washington.edu/EVS/>). Novel rare mutations (<1%) were confirmed in a second round of sequencing of the original DNA sample. The level of conservation of affected residues was evaluated following multiple alignment of 7 orthologous CELSR1 proteins (human, dog, cow, mouse, rat, zebrafish and fly) using the CLUSTALW program (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) (data not shown). The potential pathogenic impact of novel rare mutations identified in *CELSR1* was first validated genetically using allelic association (i.e. absence of the variant in healthy control subjects). For novel missense mutations absent in controls and in public databases, their effect on the protein was predicted *in silico* using the PolyPhen (Polymorphism Phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>) programs.

## RESULTS

Here, we report a genetic molecular study of *CELSR1* by re-sequencing analysis in a large multi-ethnic cohort of patients. We included both open and closed forms of NTDs and caudal agenesis in our study to test the hypothesis whether a defective PCP signaling resulting from mutations in *CELSR1* could represent a common underlying pathogenic mechanism. We detected a total of 30 novel rare mutations (<1%) in *CELSR1* in 32 patients that were not reported in the public databases (Table I) (Fig.1). Detailed clinical information on these patients is listed in Supplementary Table II. The DNA mutation and amino acid numbering systems are based on *CELSR1* cDNA sequence with the accession NM\_014246 and CELSR1 protein sequence with the accession NP\_055061.1 respectively. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence. All of these mutations (except p.Asn2230Ser) were detected in a heterozygous state and most of them were private. None of these mutations mapped close to the exon-intron junctions and hence they most likely do not affect gene splicing.

Of these novel and rare *CELSR1* mutations detected in our cohort, 27 were absent in all controls analyzed and included a 12 bp in frame deletion in exon 34 (c.8887\_8898del12), one nonsense mutation in exon 1 (p.Gln834X) and 25 missense mutations distributed along the

entire gene (Table I, groups 1 and 2) (Fig. 1A-C). The in-frame deletion in exon 34 (c.8887\_8898del12) was detected in a male affected by caudal agenesis type II (according to Pang classification) with hydromyelia and tethered cord. The chromatogram of this deletion is depicted in Fig.1C. The mother was affected by congenital scoliosis and a maternal second degree cousin was born with club feet malformation. The deletion was detected in the mother and absent in the father. Although in-frame, this deletion, p.Ser2963\_Thr2966del, is particularly interesting as it affects 4 highly conserved residues “SSRT” and importantly it removes an “SSR” motif that was identified as a putative phosphorylation site by PKC after scanning the sequence of the cytoplasmic part of CELSR1 against PROSITE patterns and profiles (prosite.expasy.org) (Fig.1D).

The variant p.Gln834X was detected in a sporadic case affected with myelomeningocele localized in D12-L1, Chiari II malformation, hydrocephalus and hydromyelia. The chromatogram of this deletion is shown in Fig.1B. This variant was detected in the apparently normal father. This nonsense mutation occurs in the Cadherin 6 domain in exon 1 and truncates the majority (~3/4) of the protein. To our knowledge, this is the first description of a truncating mutation in *CELSR1* in a pathological condition, in this case NTDs. The dbSNP database includes one entry (rs142032661) in exon 14 of *CELSR1* that represents a frameshift deletion, c.5884delG, predicted to lead to a premature truncation. However, this variant was reported only once and was not validated by the submitter, presenting most likely an artifact of alignment errors in short mononucleotide runs. No nonsense mutation or frameshift truncating deletion or insertion was reported for *CELSR1* in the ~2500 exomes included in the NHLBI Exome Sequencing Project.

A total of 13 rare and novel missense mutations detected in 12 patients (11 NTDs and 1 caudal agenesis) and absent in controls were predicted to be damaging or having functional relevance according to the PolyPhen or/and SIFT programs (group 1, Table I). The majority of these mutations affected highly conserved amino acid residues among *CELSR1* orthologues (data not shown) and were nonconservative. Five of these variants, p.Arg541Trp, p.Val551Met, p.Arg835Cys, p.Val1008Leu and p.Arg1456Gln, were conserved across all 6 vertebrates analyzed (data not shown). Interestingly, one of these variants, p.Val1008Leu, was

also conserved in the fly and mapped to the cadherin repeat of the extracellular domain of CELSR1, the same domain where two previously-identified ENU-induced mouse mutations (p.Asp1040Gly and p.Asp1110Lys) were detected (Curtin et al., 2003).

A total of 12 novel and rare missense mutations were identified in 14 patients (10 NTDs and 4 caudal agenesis) and absent in all controls analyzed and in public databases were predicted to be tolerated or benign based on Polyphen and SIFT analyses (group 2, Table I). In addition, we detected 3 novel rare variants in *CELSR1* in 5 NTD patients that were present in our controls' group (also at a rare frequency), and two of which were predicted to be pathogenic based on bioinformatics analyses (group 3, Table I). Group 2 and group 3 variants of *CELSR1* listed in Table I were kept unclassified as their potential pathogenicity was not supported by both genetic and bioinformatics analyses.

In addition to these 30 novel and rare mutations identified in *CELSR1* in our patients' cohort, we detected in this gene two novel common variants, p.Asn1884Ser and p.Ser2919Asn, at a frequency of 1.9% and 11.9% respectively. These two variants were not conserved and were predicted to be tolerated or benign based on Polyphen and SIFT analyses (data not shown). We next tested for association between common variants in *CELSR1* and human NTDs. Our case group consisted of 164 Italian patients affected with myelomeningocele (the major NTD subtype and major ethnic group in our cohort) and our control group included 184 ethnically-matched controls. SNPs included in this analysis consisted of the 2 novel variants detected in *CELSR1* (p.Asn1884Ser and p.Ser2919Asn), 3 common SNPs previously reported and predicted to be pathogenic *in silico* (rs11704506, rs4823561, rs4823850) and 10 tagSNPs selected from the HapMap CEU population (rs9615969, rs8138290, rs6008793, rs9615358, rs10470293, rs6520023, rs2223515, rs9616036, rs9616040, rs5767253) (data not shown). No significant association was detected between any of these SNPs and the myelomeningocele phenotype, consistent with previous findings (Wen et al., 2010). Genetic studies of common variants at *CELSR1* in larger NTD cohorts are needed before drawing final conclusions on their associations to the disease.

## Discussion

A large number of candidate gene studies in animal models and human cohorts support an important role for the PCP pathway in the pathogenesis of NTDs. In this study, we analysed one core PCP gene *CELSR1* in a large cohort of various types of open and closed NTDs and caudal agenesis. We detected in our cohort a total of 13 novel missense variants in *CELSR1* that were predicted to be pathogenic *in silico*. Importantly, we identified for the first time a nonsense mutation, p.Gln834X, in *CELSR1* in an NTD patient. This mutation removes the majority of the protein (aa834- aa3013) including the central portion of the protein that normally interacts with Fz and its cytoplasmic C-tail important for homotypic intracellular interactions of Celsr1 during PCP signalling (Chen et al., 2008). While the impact of the p.Gln834X truncation will need to be evaluated, it is quite plausible that the truncation could affect CELSR1's role in PCP by affecting its interaction with Fz and/or homotypic intracellular interactions; alternatively, the truncated form of the protein could acquire novel toxic roles in established or unknown abnormal interactions.

We also detected in our caudal agenesis cohort one in-frame 12 bp deletion, p.Ser2963\_Thr2966del, that removes a putative PKC phosphorylation “SSR” motif. The CELSR1 protein is predicted to contain seven membrane spanning domains having homology to a group of peptide hormone binding G-protein coupled receptors (GPCRs) (Usui et al., 1999). Structurally, GPCRs are characterized by an extracellular N-terminus, followed by seven transmembrane  $\alpha$ -helices and an intracellular C-terminus. The C-terminus of GPCRs often contains serine (Ser) or threonine (Thr) residues that, when phosphorylated, increase the affinity of the intracellular surface for the binding of scaffolding proteins. Removal of these phosphorylation sites could affect this affinity and downstream signalling pathways (Tobin et al., 2008).

Both CELSR1 variants, p.Gln834X and p.Ser2963\_Thr2966del, were detected in one unaffected parent. The variant p.Ser2963\_Thr2966del segregated with the caudal agenesis phenotype in the affected proband and with scoliosis in the mother. Our findings are consistent with other genetic studies of the PCP pathway in NTDs where mutations associated with the

disease were found to be partially penetrant (Kibar et al., 2007; 2009; 2011; Bosoi et al., 2011; Robinson et al., 2011).

We detected novel rare *CELSRI* variants in both open (13 myelomeningocele) and closed (3 lipoma, 2 tight filum terminale, 2 lipomyelomeningocele, 3 lipomyelocele, 1 diastematomyelia and 2 of unknown type) forms of NTDs and in 6 cases of caudal agenesis, suggesting potential common molecular etiologies. Even if NTD patients presented with various and distinct phenotypes, they were all diagnosed clinically as being affected with NTDs based on the classification of Tortori-Donati et al. (2000) and Rossi et al. (2004; 2006). One mutation, p.Asn2230Ser, was identified in two sisters affected with myelomeningocele. Two patients were compound heterozygotes for mutations in *CELSRI*: one patient affected with lipoma and tethered cord was heterozygous for p.Ser2190Leu and p.Ala2228Val, and another patient affected with lipomyelomeningocele was heterozygous for p.Thr1443Pro and p.Pro2937Leu.

Our cohort in this study overlapped with the cohorts used in our previous studies of 3 other PCP genes, *VANGLI1*, *VANGLI2* and *PRICKLE1* (Kibar et al., 2007; 2009; 2011; Bosoi et al., 2011). We identified two patients that were double heterozygotes for variants in *VANGLI1* and *CELSRI*: p.Arg175Trp (*VANGLI1*) and p.Arg2229Cys (*CELSRI*) were detected in one patient affected with myelomeningocele, Chiari II malformation and hydrocephalus; and p.Glu25Lys (*VANGLI1*) and p.Asp1889Asn (*CELSRI*) in one patient affected with spinal lipoma. As additional sequencing data will be available for PCP genes in NTD cohorts, the list of patients carrying novel and rare mutations in more than one PCP gene will keep expanding. While additional tests are needed to demonstrate pathogenicity of these PCP mutations and potential genetic interactions among them, these findings are consistent with the multifactorial model proposed for NTDs where mutations at many genes interact among each other and with other environmental factors to modulate the incidence and severity of NTDs.

Novel rare *CELSRI* variants identified in our study were detected in 27 sporadic cases (21 NTDs, 6 caudal agenesis) and 5 familial NTD cases. For familial cases carrying PCP mutations, PCP testing seems to hold promise as a clinical tool where identification of mutations in PCP genes would permit better counseling strategies for recurrence risks for

families affected with NTDs. Since PCP mutations are not completely penetrant (and most of the time present in one of the unaffected parents), it would still not be possible to offer an accurate recurrence risk after identifying a mutation in a PCP gene.

The number of NTD patients carrying novel *CELSRI* mutations predicted to be pathogenic that we detected in this study (12 of 412; 2.9%) is comparable to other studies of PCP genes in NTDs (1% for *VANGL2*; 2.1% and 1% for *VANGL1* and 0.8% for *PRICKLE1*) (Kibar et al., 2007; 2009; 2011; Bosoi et al., 2011). The major form of NTDs in our cohort was myelomeningocele (MMC) (52% or 214/412 patients) that represents the most common form of NTDs. When analyzed separately, a total of 13 MMC patients (6% or 13/214) carried novel and rare mutations in *CELSRI* that included one nonsense mutation and 4 missense mutations predicted to be pathogenic *in silico*. For the caudal agenesis cohort, a total of 6 caudal agenesis patients (9.8% or 6/61) carried novel and rare mutations in *CELSRI*, that included one in-frame 12 bp deletions and one missense mutation predicted to be pathogenic *in silico*.

Our findings are consistent with a recently published study of potentially causative mutations in *CELSRI* in fetuses affected with the severe NTD craniorachischisis (Robinson et al., 2011). Importantly, 3 *CELSRI* mutations detected in the study of Robinson et al. (2011) exhibited a profound alteration in subcellular protein localization in polarized Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells (strain II), suggesting a defective PCP protein trafficking to the plasma membrane as a likely pathogenic mechanism for these mutations in NTDs (Robinson et al., 2011). While future investigations will be necessary to establish if *CELSRI* mutations detected in our cohort affect the protein function in PCP signaling, our study and that of Robinson et al. (2011) enlarge the spectrum of mutations that link PCP signaling to NTDs and caudal agenesis pathology and will help better understand the role of this tissue polarity pathway in abnormal development.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

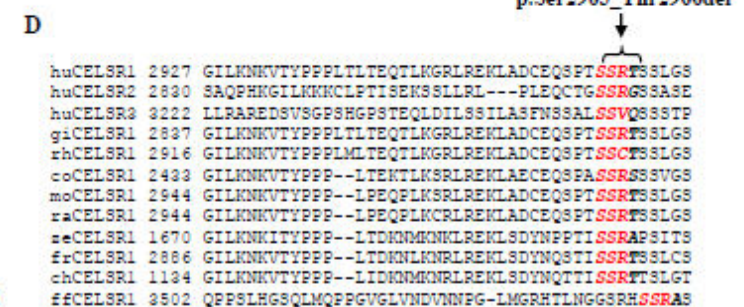
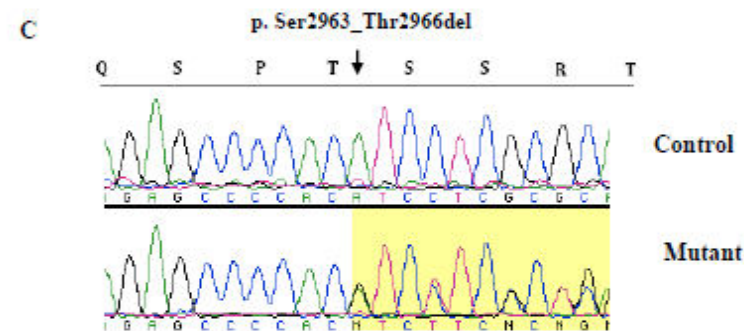
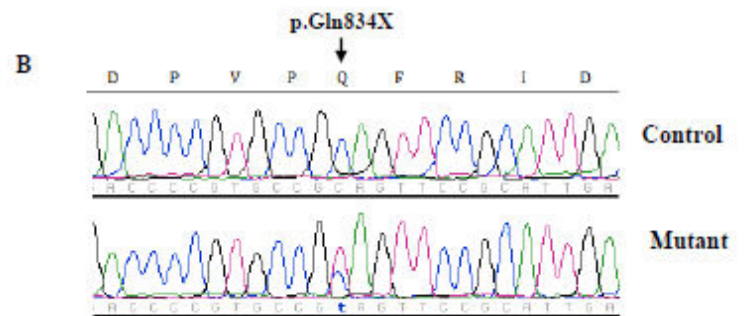
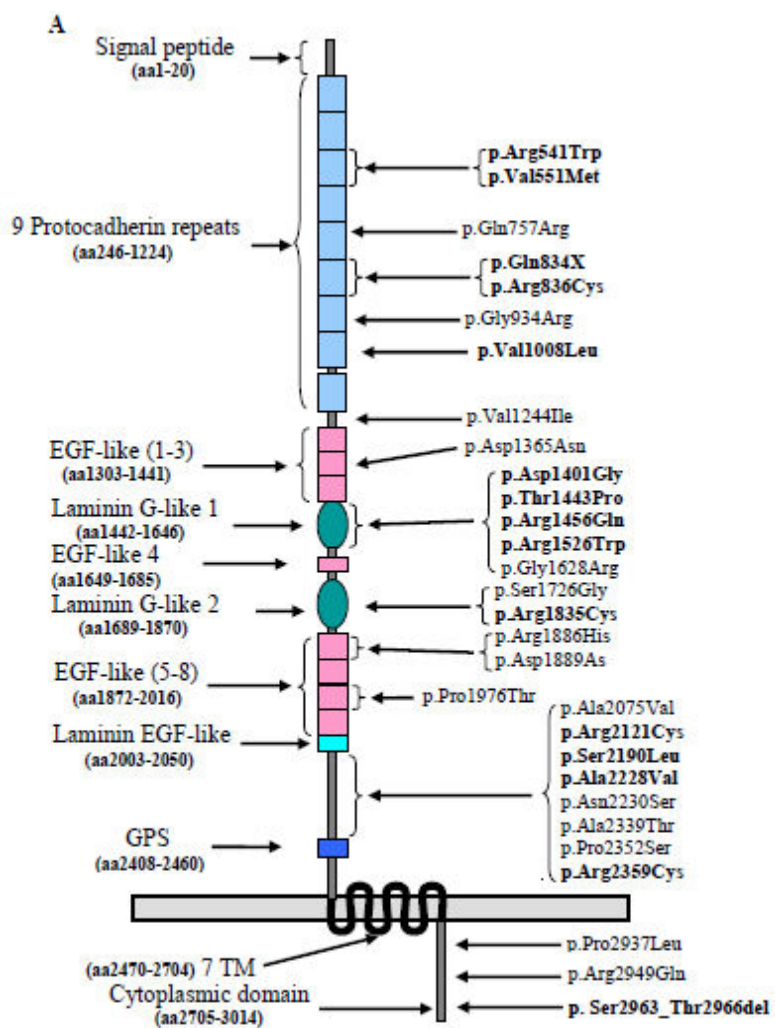
We thank all participants who made this study possible. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (Z.K.), the SickKids Foundation (Z.K.), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Z.K.) and Telethon-Italy (Grant no. GGP08051) (V.C.). We also thank A.S.B.I. (Associazione Spina Bifida Italia).

## REFERENCES

- Aslan H, Yanik H, Celikaslan N, Yildirim G, Ceylan Y. 2001. Prenatal diagnosis of Caudal Regression Syndrome: a case report. *BMC Pregnancy Childbirth* 1:8.
- Bassuk AG, Kibar Z. 2009. Genetic basis of neural tube defects. *Semin Pediatr Neurol* 16:101-110.
- Bosoi CM, Capra V, Allache R, Trinh VQ, De Marco P, Merello E, Drapeau P, Bassuk AG, Kibar Z. 2011. Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene *PRICKLE1* in human neural tube defects. *Hum Mutat* 32:1371-1375
- Chen WS, Antic D, Matis M, Logan CY, Povelones M, Anderson GA, Nusse R, Axelrod JD. 2008. Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell* 133:1093-1105.
- Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SD, Gray IC, Murdoch JN. 2003. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* 13:1129-1133.
- De Marco P, Merello E, Rossi A, Piatelli G, Cama A, Kibar Z, Capra V. 2011. *FZD6* is a novel gene for human neural tube defects. *Hum Mutat*. doi: 10.1002/humu.21643. [Epub ahead of print]
- Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. 2005. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol*. 27:515-524.
- Formstone CJ, Mason I. 2005. Combinatorial activity of Flamingo proteins directs convergence and extension within the early zebrafish embryo via the planar cell polarity pathway. *Dev Biol* 282:320-335.
- Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, Salem S, Finnell RH, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P. 2009. Novel mutations in *VANGL1* in neural tube defects. *Hum Mutat* 30:E706-715.
- Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, Pauwels E, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P. 2011. Contribution of *VANGL2* mutations to isolated neural tube defects. *Clin Genet*. 80:76-82.
- Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, Kirillova I, De Marco P, Merello E, Hayes JM, Wallingford JB, Drapeau P, Capra V, Gros P. 2007. Mutations in *VANGL1* associated with neural-tube defects. *N Engl J Med* 356:1432-1437.

- Robinson A, Escuin S, Doudney K, Vekemans M, Stevenson RE, Greene ND, Copp AJ, Stanier P. 2011. Mutations in the planar cell polarity genes *CELSRI* and *SCRIB* are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis. *Hum Mutat*. doi: 10.1002/humu.21662. [Epub ahead of print].
- Rossi A, Cama A, Piatelli G, Ravegnani M, Biancheri R, Tortori-donati P. 2004. Spinal dysraphism: MR imaging rationale. *J. Neuroradiol* 31: 3-24.
- Rossi A, Gandolfo C, Morana G, Piatelli G, Ravegnani M, Consales A, Pavanello M, Cama A, Tortori-Donati P. 2006. Current classification and imaging of congenital spinal abnormalities. *Semin Roentgenol* 41:250-273.
- Seo JH, Zilber Y, Babayeva S, Liu J, Kyriakopoulos P, De Marco P, Merello E, Capra V, Gros P, Torban E. 2011. Mutations in the planar cell polarity gene, *Fuzzy*, are associated with neural tube defects in humans. *Hum Mol Genet* 20: 4324-4333.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, 2009. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med* 1:13.
- Takeichi M. 2007. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci* 8:11-20.
- Tissir F, De-Backer O, Goffinet AM, Lambert de Rouvroit C. 2002. Developmental expression profiles of *Celsr* (Flamingo) genes in the mouse. *Mech Dev* 112:157-160.
- Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC. 2008. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* 29:413-420.
- Tortori-Donati P, Rossi A, Cama A. 2000. Spinal dysraphism: a review of neuroradiological features with embryological correlations and proposal for a new classification. *Neuroradiol* 42: 471-491.
- Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T. 1999. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled". *Cell* 98:585-595.
- Wen S, Zhu H, Lu W, Mitchell LE, Shaw GM, Lammer EJ, Finnell RH. 2010. Planar cell polarity pathway genes and risk for spina bifida. *Am J Med Genet A* 152:299-304.

# FIGURE LEGEND



**Figure 1.** Novel *CELSR1* mutations in neural tube defect (NTD) and caudal agenesis patients. **A.** Schematic representation of the *CELSR1* predicted protein structure (Accession number Q9NYQ6) with the domains (left) and approximate position of different NTDs mutations (right) indicated by arrows. Variants in *CELSR1* detected in NTDs patients and predicted to be potentially damaging are indicated in bold. Abbreviations: aa, amino acids; EGF, epidermal growth factor; GPS, G protein-coupled receptor proteolytic site; TM, transmembrane. **B.** Sequence trace of control (*top*) and mutant (*bottom*) DNA showing the heterozygous p.Gln834X mutation. **C.** Sequence trace of control (*top*) and mutant (*bottom*) DNA showing the heterozygous Ser2963\_Thr2966del mutation. **D.** A multiple partial sequence alignment was performed for three isoforms of human *CELSR1* against its closest orthologues from 9 other species, using Clustal W. The *CELSR1* Ser2963\_Thr2966del variant affects conserved residues (indicated by arrows). In red, residues predicted to be a putative PKC phosphorylation site. Accession numbers: human *CELSR1* (hu*CELSR1*), NP\_055061; human *CELSR2* (hu*CELSR2*), NP\_001399 ; human *CELSR3* (hu*CELSR3*), NP\_001398; white-cheeked gibbon *CELSR1* (gi*CELSR1*), XP\_003278631; rhesus monkey *CELSR1* (rh*CELSR1*), XP\_001111116; cow *CELSR1* (co*CELSR1*), XP\_600703; mouse *CELSR1* (mo*CELSR1*), NP\_034016; rat *CELSR1* (ra*CELSR1*), XP\_001070474; zebrafish *CELSR1* (ze*CELSR1*), XP\_002661517; frog *CELSR1* (fr*CELSR1*), XP\_002932249; chicken *CELSR1* (ch*CELSR1*), XP\_423746; and fruit fly *CELSR1* (ff*CELSR1*), NP\_001188903.

**Table I.** Novel rare mutations (< 1%) identified in *CELSR1* in human neural tube defects.

Mutation	AA change	Exon	Domain	Polyphen <sup>a</sup>	SIFT <sup>b</sup>	Patients
<i>Group 1: variants potentially damaging and absent in controls</i>						
c.1621C→T	p.Arg541Trp	1	Cadherin3	++	+	1 MMC
c.1651G→A	p.Val551Met	1	Cadherin3	-	+	1 LMC
c.2502C→T	p.Gln834X	1	Cadherin 6	++	N/A	1 MMC
c.2506C→T	p.Arg836Cys	1	Cadherin 6	+	-	1 Lipoma
c.3022G→C	p.Val1008Leu	1	Cadherin 8	-	+	1 TFT
c.4202A→G	p.Asp1401Gly	3	EC	+	-	1 MMC
c.4327A→C	p.Thr1443Pro	3	LamG-like1	+	-	1 LMMC <sup>c</sup>
c.4367G→A	p.Arg1456Gln	3	LamG-like1	+	-	1 CA
c.4576C→T	p.Arg1526Trp	5	LamG-like1	+	+	1 MMC
c.5503C→T	p.Arg1835Cys	11	LamG-like2	+	+	1 MMC
c.6361C→T	p.Arg2121Cys	18	EC	++	+	1 LMMC
c.6569C→T	p.Ser2190Leu	19	EC	-	+	1 Lipoma <sup>d</sup>
c.6683C→T	p.Ala2228Val	19	EC	-	+	1 Lipoma <sup>d</sup>
c.7075C→T	p.Arg2359Cys	21	EC	++	+	1 LMC
c.8887_8898del12	p.Ser2963_Thr2966del	34	Cytoplasmic	NA	NA	1 CA
<i>Group 2: variants absent in controls</i>						
c.2270A→G	p.Gln757Arg	1	Cadherin 5	-	-	1TFT, 1MMC
c.2800G→A	p.Gly934Arg	1	Cadherin 7	-	-	1 MMC
c.3730G→A	p.Val1244Ile	2	EC	-	-	1 CA
c.4093G→A	p.Asp1365Asn	2	EGF-like1	-	-	1 CA
c.4882G→C	p.Gly1628Arg	7	LamG-like1	-	-	1 CA
c.5657G→A	p.Arg1886His	12	EGF-like5	-	-	1 MMC
c.5665G→A	p.Asp1889Asn	12	EGF-like5	-	-	1 Lipoma
c.5926C→A	p.Pro1976Thr	14	EGF-like5	-	-	1 LMC
c.6224C→T	P.Ala2075Val	16	EC	-	-	1 CSD
c.6689A→G	p.Asn2230Ser	19	EC	-	-	2 MMC
c.7015G→A	p.Ala2339Thr	21	EC	-	-	1 CA
c.8846G→A	p.Arg2949Gln	34	Cytoplasmic	-	-	1 MMC
<i>Group 3: variants present in controls</i>						
c.5176A→G	p.Ser1726Gly <sup>e</sup>	9	LamG-like2	-	-	1MMC, 1 DM
c.7054 C→T	p.Pro2352Ser <sup>e</sup>	21	EC	++	+	1 MMC,1 CSD
c.8810C→T	p.Pro2937Leu <sup>e</sup>	34	Cytoplasmic	++	+	1 LMMC <sup>c</sup>

The DNA mutation and amino acid numbering systems are based on *CELSR1* cDNA sequence with the accession NM\_014246 and CELSR1 protein sequence with the accession NP\_055061.1 respectively.

<sup>a</sup> Polyphen predictions for amino acid changes: ++ for probably damaging ; + for possibly damaging; - for benign.

<sup>b</sup> SIFT predictions for amino acid changes: “+” predicted to affect protein function ; “-” predicted to be tolerated.

<sup>c</sup>The same patient carried both p.Thr1443Pro and p.Pro2937Leu variants; <sup>d</sup>The same patient carried p.Ser2190Leu and

p.Ala2228Val variants; <sup>e</sup>The variants p.Ser1726Gly, p.Pro2352Ser and p. Pro2937Leu were present in 1, 3 and 1

control(s) respectively. Abbreviations: CA, caudal agenesis; DM, diastematomyelia; EC, extracellular; EGF, epidermal

growth factor; LamG, LamininG; MMC: Myelomeningocele; LMC, lipomyelocele; LMMC: Lipomyelomeningocele;

CSD, closed spinal dysraphism; TFT, tight filum terminale.

**Supp. Table I. Characteristics of the 473 NTDs patients**

Ethnic origin	459 White Caucasian , 5 Hispanic, 3 Haitian, 4 North-African, 2 Middle Eastern Asiatic
Male sex (%)	44
Mean age (yr)	2.6
Cranial dysraphisms	11
Anencephaly	1
Cephalocele	10
Open spinal dysraphisms	215
Myelomeningocele	214
Myelocele	1
Closed spinal dysraphisms	186
Lipomyelomeningocele	37
Lipomyeloschisis	34
Terminal myelocystocele	1
Meningocele	12
Lipoma	48
Tight filum terminale	17
Dermal sinus	3
Diastematomyelia	17
Unknown type	17
Caudal agenesis	61

Supp. Table 2. Summary of all sequence variants of *FZD3* and *FZD6* genes identified in 1112 subjects

Variant type	Total	Common/Rare <sup>a</sup>	Never reported/Known <sup>b</sup>
Synonymous	11	4/7	6/5
Missense	14	3/ <b>11</b>	7/7
Insertion/Deletion	1	<b>0/1</b>	1/0
Intronic	12	4/8	7/5
Splice sites	0	0/0	0/0
3'UTR	2	1/ <b>1</b>	1/1
Total	40	12/28	22/18

<sup>a</sup>Common mutations are defined those having a minor allele frequency (MAF)> 1% and rare mutations include those having a MAF<1%.

<sup>b</sup>Never reported mutation group include all variants that were reported in any database; the known group contains all variants previously registered in databases.

Rare potentially deleterious variants are in bold



**Supp. Table 3. Common and known (rs ID) variants of *FZD3* and *FZD6* genes.**

<b>Variant</b>	<b>Location</b>	<b>Nucleotide change<sup>a</sup></b>	<b>Patients Frequency (N=473)</b>	<b>Controls Frequency (N=639)</b>
<i>FZD3</i>				
p.Leu145Leu (rs2241802)	Exon 3	c.435A>G	G=0.51	G=0.53
<i>FZD6</i>				
p.Glu2Glu (rs3736047)	Exon 1	c.6A>G	G=0.00	G=0.35
p.Met33Val (rs827528)	Exon 1	c.97A>G	G=0.00	G=0.30
rs3104026	Intron 2	c.374+74G>C	C=0.36	C=0.35
rs827550	Intron 2	c.375-37G>A	A=0.35	A=0.37
p.Gln152Glu (rs 61753730)	Exon 3	c.454C>G	G=0.03	G=0.03
p.Leu254Leu (rs3808554)	Exon 3	c.762A>G	G=0.45	G=0.41
p.Met345Leu (rs3808553)	Exon 3	c.1033A>C	C=0.46	C=0.36
rs12707777	Intron 3	c.1392+122A>T	T=0.08	T=0.07
rs2270525	Intron 4	c.1541+75T>C	C=0.20	C=0.15
p.Pro690Pro (rs1053917)	Exon 6	c.2070G>A	A=0.48	A=0.42
rs2934725	3'UTR	c.*85A>G	G=0.97	G=0.96

<sup>a</sup>The GenBank RefSeq numbers for the two genes are: *FZD3* NM\_017412.3 and NG\_029723.1 and *FZD6* NM\_001164615.1 and NG\_028909.1. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon 1 in the reference sequence.

**Supplementary Table II. Characteristics of neural tube defect patients carrying novel and rare mutations in *CELSRI*.**

Sex, age	Variant <sup>a</sup>	Family history	NTD Type	Clinical description
F, 15 yrs	<b>p.Arg541Trp</b>	Sporadic	Open	Myelomeningocele, Chiari II malformation, hydrocephalus, hydromyelia
F, 8 yrs	<b>p.Val551Met</b>	Sporadic	Closed	Lipomyelocele
F, 9 yrs	p.Gln757Arg	Sporadic	Open	Myelomeningocele, Chiari II malformation, hydromyelia, hydrocephalus
F, 18 yrs	p.Gln757Arg	Sporadic	Closed	Tight filum terminale
F, 25 yrs	<b>p.Gln834X</b>	Sporadic	Open	Myelomeningocele, Chiari II malformation, hydromyelia in D12-L1, hydrocephalus, vesical-ureteral unfunctionality
M, 12 yrs	<b>p.Arg836Cys</b>	Sporadic	Closed	lipoma, tethered cord
M, 17 yrs	p.Gly934Arg	Sporadic	Open	Myelomeningocele, Chiari II malformation, hydrocephalus
M, 14 yrs	<b>p.Val1008Leu</b>	Sporadic	Closed	tight filum terminale
F, 12 yrs	p.Val1244Ile	Sporadic	Closed	Caudal agenesis, Chiari I malformation, hypertelorism, bilateral clinodactyly of the fifth digit of the hands
M, 14 yrs	p.Asp1365Asn	Sporadic	Closed	Caudal agenesis, costal agenesis, single kidney, club feet
M, 27 yrs	<b>p.Asp1401Gly</b>	Sporadic	Open	Myelomeningocele, Chiari II malformation, hydrocephalus
M, 7 yrs	<b>p.Thr1443Pro, p.Pro2937Leu</b>	Sporadic	Closed	Lipomyelomeningocele, tethered cord, shorter left leg, equinus left foot, hypospadias, affected by alpha-thalassemia
M, 5 yrs	<b>p.Arg1456Gln</b>	Sporadic	Closed	Caudal agenesis type II, Tethered and low-lying cord, lipoma with calcifications, hydromyelia at L4-S2
F, 20 yrs	<b>p.Arg1526Trp</b>	Sporadic	Open	Myelomeningocele, Chiari II malformation, hydrocephalus
F, 13 yrs	p.Gly1628Arg	Sporadic	Closed	Caudal agenesis, anorectal malformation, single kidney
M, 26 yrs	p.Ser1726Gly	Familial <sup>b</sup>	Open	Myelomeningocele, hydrocephalus
F, 21 yrs	p.Ser1726Gly	Familial <sup>c</sup>	Closed	Diastematomyelia without septum, dermal sinus, schisis L4-S1

**Supplementary Table I cont.** Characteristics of neural tube defect patients carrying novel and rare mutations in *CELSRI*.

Sex, age	Variant <sup>a</sup>	Family history	NTD Type	Clinical description
M, 22 yrs	<b>p.Arg1835Cys</b>	Sporadic	Open	Myelomeningocele
F, 20 yrs	p.Arg1886His	Sporadic	Open	Myelomeningocele , Chiari II malformation , hydrocephalus, vesical-ureteral reflux
F, unknown	p.Asp1889Asn	Sporadic	Closed	Lipoma
M, 7 yrs	p.Pro1976Thr	Sporadic	Closed	Lipomyelocele
F, 15 yrs	P.Ala2075Val	Sporadic	Closed	Closed spinal dysraphism of unknown type
F, 17 yrs	<b>p.Arg2121Cys</b>	Sporadic	Open	Lipomyelomeningocele
F, 31 yrs	<b>p.Ser2190Leu, p.Ala2228Val</b>	Sporadic	Closed	Lipoma, tethered cord, G6PD deficiency
F, 18 yrs	p.Asn2230Ser	Familial <sup>d</sup>	Open	Myelomeningocele , Chiari II malformation, hydrocephalus.
F, 14 yrs	p.Asn2230Ser	Familial <sup>d</sup>	Open	Myelomeningocele , Chiari II malformation, hydrocephalus, labiopalatoschisis
F, 7 yrs	p.Ala2339Thr	Sporadic	Closed	Caudal agenesis: lipoma, Schisis at S1 and diastasis of posterior arch of S1-S2, Agioma at the thoracic region, Lymphatic edema of the left hand
F, 36 yrs	p. Pro2352Ser	Familial <sup>e</sup>	Closed	Closed spinal dysraphism of unknown type
M, 21 yrs	p. Pro2352Ser	Sporadic	Open	Myelomeningocele with hydrocephalus
F, 26 yrs	<b>p.Arg2359Cys</b>	Sporadic	Closed	Lipomyelocele
M, 9 yrs	p.Arg2949Gln	Sporadic	Open	Myelomeningocele , left club foot
M, 16 yrs	<b>p. Ser2963_Thr2966del</b>	Sporadic	Closed	Sacro-coccygeal agenesis type II, Tethered cord, hydromyelia, anorectal malformation, club feet, cardiac malformations

<sup>a</sup> Novel mutations predicted to be pathogenic are indicated in bold; <sup>b</sup>First degree cousin is affected with closed neural tube defect; <sup>c</sup> Paternal grandmother's sister is affected with schisis in S1 and congenital scoliosis; <sup>d</sup>These 2 patients are sisters with no neural tube defect reported in other family members; <sup>e</sup>This patient has a first degree cousin affected with meningocele and who has a child with myelomeningocele.

## 6. Discussion

### 6.1 Identification d'un nouvel allèle hypermorphe de *Lrp6* (*Skax*<sup>26m1Jus</sup>)

Nous avons identifié et caractérisé un nouvel et 5<sup>ème</sup> allèle de *Lrp6*, *Skax*<sup>26m1Jus</sup> dans le but d'identifier un nouveau gène prédisposant aux ATN. Cette souris est caractérisée par une queue en forme de crochet, qui est considérée comme le « minimum sign » des ATN. Ce phénotype est transmis d'une façon récessive. Afin d'identifier le gène muté chez cette souris, nous avons initialement adopté une approche de séquençage des régions codantes des principaux gènes de la voie de signalisation PCP. Cette approche a été utilisée à cause du rôle clef de ces gènes dans le phénomène de l'extension convergence pendant la fermeture de tube neural (242, 302, 308) ainsi que par leurs modèles animaux déjà bien établies en liaison avec les ATN (152, 156, 166, 328, 337). Cette démarche n'a pas permis de trouver une mutation codante qui ségrègue avec le phénotype observé chez la *Skax*<sup>26m1Jus</sup> et donc on pourrait conclure que, plus probablement, le gène causatif ne fait pas partie des gènes principaux de la voie PCP. Cependant, notre séquençage a ciblé seulement les régions codantes des gènes PCP et à ce stade du projet, on ne pourrait pas exclure la possibilité qu'une mutation régulatrice, par exemple dans les régions promotrices ou non traduites, soit responsable du phénotype observé chez la *Skax*<sup>26m1Jus</sup>.

Par la suite, nous avons utilisé une méthodologie différente qui a permis de réunir plusieurs évidences génétiques fortes qui supportent notre conclusion que *Lrp6* est le gène muté chez *Skax*<sup>26m1Jus</sup>. En effet, la cartographie par homozygoté suivie par la stratégie de clonage positionnel par gène candidat, a permis de délimiter une région candidate sur le chromosome 6 qui inclut plusieurs gènes, incluant *Lrp6*. Ce dernier présentait un meilleur candidat et donc, était priorisé pour une investigation plus profonde. L'analyse et le séquençage de la région codante et des jonctions exon-introns du gène *Lrp6* chez *Skax*<sup>26m1Jus</sup>, ont mené à l'identification d'une nouvelle mutation faux-sens, p.Ile681Arg, qui ségrègue avec la maladie. Cette mutation, qui affecte un acide aminé bien conservé à travers les vertébrés,

modifie la fonction de *Lrp6* de manière à augmenter l'activité de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine et à diminuer celle de la signalisation PCP chez les fibroblastes embryonnaires mutants et chez les cellules HEK.

Dans notre modèle *Skax*<sup>26m1Jus</sup>, nous n'avons détecté aucun défaut sévère chez les embryons hétérozygotes ou homozygotes, contrairement à ce qui a été répertorié chez d'autres souris mutantes pour le gène *Lrp6*. À ce propos, une souris mutante knockout et deux souris spontanément mutantes (*ringelschwanz* ou *rs* et *Crooked tail* ou *Ct*), souffrent de graves anomalies développementales au niveau de plusieurs organes, incluant les yeux, les bronches, le cœur, le tube neural et le cerveau. En effet, la souris mutante *knockout*, générée par capture de gènes, présente une exencéphalie ou un spina bifida aperta avec une pénétrance de 50 % et développe d'autres anomalies développementales, telles que des déformations du squelette axial, des défauts des membres et des malformations du système urogénital (221). La souris mutante *Ct* a une mutation qui cause une hyperactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en inhibant l'interaction de *Lrp6* avec *Dkk1*. Cette souris manifeste une queue en forme de crochet et une mortalité prématurée avant le jour embryonnaire 8, des déformations du squelette et une exencéphalie. En ce qui concerne la souris mutante hypomorphe *Rs*, elle développe diverses malformations des somites et des os (ostéoporose). Les hétérozygotes *rs/nul* présentent une queue rudimentaire et un spina bifida aperta. La mutation de *Lrp6* chez la souris *Rs* abolit l'activation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (219). Une dernière souris mutante de *Lrp6*, *Gwazi* (*Gz*), est une souris hypermorphe induite par l'agent ENU qui présentait différentes malformations au niveau de la tête qui ne sont pas associées aux ATN (222). La différence dans la gravité des phénotypes entre *Skax*<sup>26m1Jus</sup> et les autres mutants hypermorphes, *Ct* et *Gz*, pourrait être due à un effet atténué de la mutation sous-jacente dans *LRP6* ou à cause des fonds génétiques différentes. En effet, *Skax*<sup>26m1Jus</sup> est sur le fond génétique C57BL/6J:129S6/SvEvTac, alors que les mutants *Ct* et *Gz* sont respectivement sur DBA/2:A/J et C3H/HeH.

Les modèles animaux pour le gène *Lrp6* répertoriés à ce jour, incluant la souris *Skax*<sup>26m1Jus</sup>, démontrent le rôle de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine via *Lrp6* dans les ATN, mais les mécanismes moléculaires régulateurs de cette implication restent à déterminer.

Plusieurs évidences visent une implication directe de la voie canonique ou plutôt un effet indirecte via la voie de signalisation PCP. Il serait très intéressant d'investiguer, grâce à des études de complémentation entre la souris  $Skax^{26m1Jus}$  et d'autres modèles comme l'allèle knockout ou Ct, afin de trouver une éventuelle interaction génétique entre les allèles impliqués.

## **6.2 L'importance d'un dosage précis entre les deux voies de signalisation Wnt dans la neurulation**

### **6.2.1 Des études des animaux modèles incluant $Skax^{26m1Jus}$ montrent l'importance d'un dosage précis entre les deux voies de signalisation Wnt**

Nos études de complémentation entre les souris  $Lp$  et  $Skax^{26m1Jus}$  ont révélé l'existence d'une interaction génétique entre  $Vangl2$  et le gène  $Lrp6$ . Nous avons démontré que l'ATN développée chez les doubles hétérozygotes  $Skax^{26m1Jus}/+;Lp/+$  n'était pas causée par le gène muté de  $Lp$  ( $Vangl2$ ) (337), comme la prévalence de cas d'ATN (38%) chez les doubles hétérozygotes était beaucoup plus élevée que celle des hétérozygotes  $Lp/+$  (1,7%). De plus, l'ATN observée chez les souris  $Skax^{26m1Jus}/+;Lp/+$  n'était pas causée non plus par le gène muté chez  $Lp$  d'un autre fond génétique. Cela a été démontré par une étude de complémentation entre  $Lp/+$  et une autre souris mutante  $Skax^{23m1Jus}$ , possédant un même fond génétique que  $Skax^{26m1Jus}$  et qui n'ont affiché aucune forme d'ATN chez les doubles hétérozygotes  $Skax^{23m1Jus}/+;Lp/+$ . L'analyse des cils dans l'organe de Corti, un processus sous le contrôle de la signalisation PCP, a révélé des défauts dans l'orientation ciliaire significative comparativement au type sauvage chez la mutante homozygote  $Skax^{26m1Jus}$  ainsi que la double hétérozygote  $Skax^{26m1Jus}/+;Lp/+$ . Ces données soutiennent l'idée de l'existence d'une interaction entre le gène muté chez  $Skax^{26m1Jus}$  et la voie de signalisation PCP. Le phénotype de queue en forme de boucle chez les souris mutantes a été identifié dans 40% des simples hétérozygotes  $Lp/+$  et 0% chez ceux de  $Skax^{26m1Jus}/+$ . Cette fréquence a augmenté à 80% chez les doubles hétérozygotes. La spina bifida qui était absente chez les simples hétérozygotes a atteint 36% des cas chez les doubles hétérozygotes. Ces données montrent que, chez les mutants  $Lp$ , la queue en forme de crochet ainsi que la spina bifida, causée par une signalisation

PCP réduite, ont été nettement accentués par un allèle *Lrp6-Skax*<sup>26m1Jus</sup> hyperactif qui sur-inhibe cette voie.

L'ensemble de ces données suggèrent qu'une interaction génétique a lieu entre *Lrp6* et *Vangl2*, et que le gène muté chez *Skax*<sup>26m1Jus</sup> agit indirectement sur la voie PCP par l'intermédiaire d'une autre voie de signalisation cellulaire et ce, selon un dosage précis. Ces observations sont appuyées par une étude récente chez des souris modèles de gain (*Lrp6* Ct) et de perte (*Lrp6*<sup>-/-</sup>) de fonction. Ces travaux ont démontré que *Lrp6* est capable d'influencer la voie non-canonique impliquant des mécanismes dépendants de RhoA pendant la neurulation.

D'autres études ont suggéré la présence d'une communication, assurée par un dosage strict, entre les deux voies de signalisation Wnt. Chez la *Xenopus*, il a été établi que *Lrp6*, en plus de son rôle dans le processus de l'extension convergence, est essentiel pour l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et que sa présence permet l'inhibition de la voie Wnt/PCP. Chez *Xenopus*, la suppression (*knockdown*) des ligands PCP *XWnt5a* et *XWnt11* est capable de sauver les phénotypes provoqués par la suppression (*knockdown*) de *Lrp6/Lrp5*. Aussi, chez le poisson zèbre, la perte maternelle de *Wnt5b* (un ligand de la voie Wnt/PCP) entraîne une signalisation ectopique de Wnt/ $\beta$ -caténine et par conséquent, une augmentation dans le destin cellulaire des cellules dorsales (277, 278). Chez la souris, le *knockdown* de *Lrp6* induit des défauts liés au PCP, incluant l'exencéphalie et des malformations cardiaques. La perte de *Wnt5a* a sauvé ces défauts. Cela suggère que ces phénotypes peuvent être le résultat d'un gain de fonction de la signalisation Wnt/non-canonique.

Une étude pertinente chez la *Xenopus* a montré que la surexpression du ligand PCP *Wnt5a* bloque la formation d'un axe de corps secondaire en inhibant la capacité du ligand canonique *Wnt8* d'activer la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (272). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces mécanismes d'inhibition. *Wnt5a* pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine en induisant la phosphorylation de TCF-4 par la Nemo like kinase (NLK) (273). L'inhibition de la voie canonique par la voie non canonique pourrait aussi s'expliquer par la compétition touchant *Dvl*, qui est un partenaire impliqué dans les deux signalisations. À ce titre, il a récemment été démontré, que les protéines NFAT réprimaient la signalisation canonique en interagissant avec *Dvl*, participant ainsi à la régulation et à la

prolifération des progéniteurs neuronaux (274). Enfin, il a par ailleurs été démontré chez la souris que la  $\beta$ -caténine peut être dégradée par le facteur Siah 2 dont la transcription est augmentée par *Wnt5a* (275). Les frontières entre les voies canoniques et non canoniques sont perméables et dépendent précisément du contexte cellulaire. Ainsi, l'équipe de Roel Nusse a mis en évidence que selon le contexte de récepteurs membranaires présents à la surface cellulaire, *Wnt5a* pourrait soit inhiber ou activer la voie Wnt/  $\beta$ -caténine. Dans le cas où les récepteurs Fz4 et Lrp5 sont à la surface, *Wnt5a* peut activer la voie canonique. En revanche, si le co-récepteur Ror 2 est présent, *Wnt5a* induit une signalisation non canonique tout en inhibant la voie canonique (276).

La mutation p.Ile681Arg identifiée chez notre modèle animal *Skax*<sup>26m1Jus</sup> est localisée au niveau du troisième domaine YWTD  $\beta$ -propeller-EGF-like du gène *Lrp6*. Ce dernier semble permettre la liaison des ligands extracellulaires particulièrement Dickkopf (DKK1) (204, 209). Celui-ci, chez le *Xenopus* et le poisson zèbre, exerce un effet inhibiteur de la voie de signalisation wnt/ $\beta$ -caténine et un effet activateur de la voie PCP. En se basant sur ces fonctions, la mutation p.Ile681Arg pourrait alors affecter la liaison de DKK1 ou d'autres médiateurs inconnus. Ceci pourrait conduire à une hyperactivation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et parallèlement à l'inhibition de la voie PCP. Cette hypothèse est appuyée par notre validation fonctionnelle de la mutation qui a démontré que *Lrp6*<sup>Skax26m1Jus</sup> représente un nouvel allèle hypermorphique. En effet, cette mutation permet une sur-activation de la voie de signalisation wnt/ $\beta$ -caténine et une sur-inhibition de la voie de signalisation PCP. En utilisant des tests biochimiques supplémentaires, comme le yeast two hybrid (Y2H), cela permettra d'évaluer s'il y a un effet sur l'interaction avec des partenaires, comme DKK1 ainsi que *in silico*, qui sont nécessaires pour investiguer cet effet pathogène potentiel de cette variante.

Toutes ces études faites chez les animaux modèles suggèrent que le bon dosage de chacun des facteurs intervenants dans les deux voies de signalisations Wnt doit être optimal dans la neurulation. L'inhibition ou la surexpression des gènes essentiels de ces 2 voies pourrait entraîner une dérégulation dans la polarité cellulaire planaire ainsi que dans la CE et causer éventuellement des ATN.



## **6.2.2 Des études des « molecular switches » incluant *LRP6* et *ANKRD6* dans une cohorte ATN humaine montrent l'importance d'un dosage précis entre les deux voies de signalisation Wnt dans la neurulation**

Les études génétiques effectuées sur divers modèles animaux ont démontré l'existence d'un antagonisme de manière réciproque entre la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine et la voie non-canonique Wnt/PCP. Cet antagonisme est très sensible à un dosage précis et étroitement régulé par une combinaison précise des différents ligands, des récepteurs et des co-récepteurs d'une manière spécifique. Par ailleurs, la présence de certains gènes, y compris *Lrp6*, agissant aussi bien dans l'une ou l'autre des deux voies, suggère des pistes dans cette direction. En effet, les récepteurs Frizzled, de même que la protéine intracellulaire Dvl, sont impliqués dans la régulation et le fonctionnement des deux voies (60, 91, 104, 152, 312, 313, 333-336). Aussi, les gènes *ANKRD6* et *PTK7* détiennent des rôles bien spécifiques en tant qu'interrupteurs moléculaires entre la voie Wnt/PCP et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (146, 245, 332). *ANKRD6* recrute CK1 $\epsilon$  et AXIN au complexe de phosphorylation et de dégradation de la  $\beta$ -caténine et mène à l'inhibition de la voie Wnt/canonique. Cette voie contrôle la formation de l'axe embryonnaire qui peut être désorganisé chez le poisson zébré quand *ANKRD6* est inhibé. De plus, il a été démontré que ce gène est requis pour l'activation de JNK pendant les processus de gastrulation chez le poisson zébré (266). *Ptk7* est nécessaire au bon fonctionnement de la voie de signalisation Wnt/PCP chez les vertébrés et sa suppression entraîne des défauts dans l'orientation des cils de la cochlée, en plus des défauts du mécanisme de l'extension convergence (153).

Plusieurs gènes de la voie PCP incluant *VANGL1*, *VANGL2*, *PK2* et *CELSRI*, *DVL2* et *FZ6* ont été impliqués dans la pathologie des ATN chez l'humain (242, 302, 303, 305-310). Ces gènes jouent un rôle d'activateur au sein de cette voie de signalisation. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a démontré l'effet de ces gènes sur la voie canonique Wnt/ $\beta$  caténine. Dans nos études, nous avons pour la première fois associé des mutations dans 2 gènes, soit *LRP6* et *ANKRD6*, qui affectent simultanément les 2 voies propres aux ATN humaines. De plus,

notre étude sur *LRP6* a associé pour la première fois aux ATN humaines des mutations dans un gène inhibiteur de la voie PCP.

L'analyse du gène *LRP6* dans une cohorte de 268 patients, nous a permis d'identifier quatre nouvelles et rares mutations hétérozygotes faux-sens chez 4 patients présentant des ATN. Trois de ces mutations, *Lrp6*<sup>p.Tyr373Cys</sup>, *Lrp6*<sup>p.Val1386Leu</sup> et *Lrp6*<sup>p.Tyr1541Cys</sup>, ont été prédites comme étant potentiellement dommageables pour la protéine en utilisant les programmes Polyphen ou SIFT. Dans les cellules HEK, la validation fonctionnelle de ces 4 mutations, avec des essais de gènes rapporteurs de la voie canonique Wnt/ $\beta$  caténine (TCF/LEF) et la voie Wnt/PCP (AP-1), a démontré que les mutations *Lrp6*<sup>p.Tyr306His</sup>, *Lrp6*<sup>p.Tyr373Cys</sup> et *Lrp6*<sup>p.Val1386Leu</sup> activent la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et inhibent de la voie PCP d'une façon significativement réduite par rapport à la protéine sauvage. Ces données confirment la nature hypomorphique des trois variantes et montrent un effet qu'ont ces variants sur les 2 voies simultanément chez les patients présentant des ATN.

*ANKRD6* (*Ankyrin Repeat Domain 6*) agit comme un interrupteur moléculaire entre les deux voies de signalisation Wnt. Il active la voie Wnt/PCP non-canonique et, simultanément, il inhibe la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine (253). Dans notre étude, nous avons identifié quatre nouvelles et rares mutations faux-sens (*DIV*<sup>p.Pro548Leu</sup>, *DIV*<sup>p.Arg587Gln</sup>, *DIV*<sup>p.Val614Ile</sup> et *DIV*<sup>p.Arg632His</sup>) chez 4 patients présentant des ATN dans une cohorte de 473 patients.

Vu le double rôle régulateur de *ANKRD6* dans les 2 voies de Wnt, nous avons testé l'effet de ces quatre mutations sur l'activité des deux voies. Les essais des gènes rapporteurs des 2 voies de Wnt dans les cellules HEK ont démontré une inhibition plus faible de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et une activation plus basse de la voie PCP pour les mutations *DIV*<sup>p.Pro548Leu</sup> et *DIV*<sup>p.Arg632His</sup>, significativement par rapport à la protéine sauvage. Cela suggère une activité hypomorphique pour chacun de ces deux variantes qui affectent réciproquement les deux voies Wnt.

L'importance des multiples interactions avec les autres protéines membres de la signalisation PCP et Wnt/ $\beta$ -caténine ainsi que les protéines effectrices (comme la JNK), nous donnent un aperçu sur la complexité des mécanismes qui sont mis en place pour établir et

maintenir un équilibre très précis et délicat entre tous ces composantes. Étant donnée cette complexité, on devrait s'attendre à des défauts variés chez une protéine modulaire comme *LRP6* ou *ANKRD6* qui vont probablement engendrer des effets divergents à différents niveaux fonctionnelles. Les études génétiques effectués jusqu'à maintenant sur les organismes modèles ont démontré clairement la présence d'un antagonisme entre les deux voies Wnt qui est étroitement régulé par un groupe de gènes, dont *LRP6* ou *ANKRD6*. Le rôle de cet antagonisme dans les processus de développement normaux et anormaux reste largement indéterminé. Les variants que nous avons détectés dans *LRP6* ou *ANKRD6* affectent réciproquement les deux voies Wnt. Alors, un possible dosage précis entre ces différentes voies est nécessaire pour le bon développement. Un déséquilibre entre les deux voies pourra donc entraîner des défauts dans la formation du tube neural.

Une deuxième hypothèse pour analyser ces résultats est celle qu'alternativement, ces variantes pourraient avoir un effet direct sur la voie Wnt/B catenin (pour *LRP6*) ou la voie PCP (pour *ANKRD6*). Des variants hypomorphes de *LRP6*, menant à une sous-activation de la voie canonique, pourraient avoir un effet direct sur les gènes cibles de cette voie. Une étude récente chez une souris knock-out conditionnelle pour  $\beta$ -caténine dans les plis neuraux dorsaux, a démontré l'importance de la voie Wnt/canonique dans la fermeture et l'allongement du tube neural caudal. Chez ces souris knock-out, l'expression diminuée de Pax3 et de Cdx2 au niveau du neuropore postérieure dorsale ainsi que dans les gènes cibles de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, T, TBX6 et Fgf8 et au niveau du bourgeon de la queue, aboutit à une spina bifida aperta, à une flexion de l'axe caudale et à une troncation de la queue (339).

Des variants hypomorphes de *ANKRD6* pourraient affecter son interaction avec PK1, Vangl ou plus particulièrement avec DVL qui se lie sur DIVERSIN dans deux domaines différents (le domaine à répétitions ankyrines et le domaine central).

Des expériences complémentaires chez des modèles cellulaires ou animaux sont nécessaires pour valider davantage ces 2 hypothèses afin d'investiguer le mode d'action des variantes identifiées dans *LRP6* ou *ANKRD6* dans la pathogénèse des ATN.

### **6.3 La voie PCP joue un rôle important dans la prédisposition aux ATN**

De nombreuses études de gènes candidats effectuées sur des modèles animaux et des cohortes humaines soutiennent un rôle important de la voie PCP dans la pathologie des ATN. Notre étude a permis d'ajouter ANKRD6 et Celsr1 à la liste des gènes de la voie PCP qui sont impliqués dans la pathogenèse des ATN et soutient ainsi le rôle important de cette voie dans ce groupe de malformations. Tous les résultats liés à ANKRD6 ont été discutés dans la section précédente.

Concernant le gène CELSR1, nous l'avons analysé dans une large cohorte de 473 patients atteints de plusieurs types d'ATN humaines ouvertes et fermées. Nous avons identifié un total de 27 variants parmi lesquelles 13 nouveaux variants faux-sens ont été prédits comme étant pathogènes grâce à des programmes bioinformatiques (polyphen et SIFT) et une mutation non-sens, p.Gln834X, retrouvée pour la première fois, dans ce gène pour une ATN. Nous avons également détecté dans notre cohorte, une délétion de 12 bp qui ne change pas le cadre de lecture, p.Ser2963\_Thr2966del et qui supprime un motif putatif de phosphorylation PKC (SSR).

Notre cohorte utilisée dans cette étude a été déjà utilisée dans des études précédentes dirigées par notre laboratoire et qui ciblait d'autres gènes PCP comme *VANGLI*, *VANGL2*, *PRICKLE1*, *ANKRD6*, *DVLI*, *DVL3*, *FZ3* et *FZ6*. (286, 302, 303, 305, 307, 308, 340).

D'autres séquençages supplémentaires faits avec la même cohorte seront effectués ciblant ainsi d'autres gènes de la voie PCP afin de déterminer si d'autres patients pourront présenter des variantes dans plusieurs gènes. Cela permettra d'appuyer le modèle multifactoriel proposé pour l'étiologie des ATN dans lequel plusieurs gènes mutés pourraient interagir entre eux et avec d'autres facteurs environnementaux pour moduler l'incidence et la sévérité du phénotype. Il sera intéressant d'examiner si ces mutations dans les gènes PCP peuvent agir en combinaison de manière à augmenter le risque de développer des ATN, par exemple pour le modèle poisson zèbre. La totalité de ces études aidera à mieux définir la contribution de la voie PCP à la pathogenèse des ATN.

## 7. Plans Futurs

### 7.1. *LRP6*

En ce qui concerne les mutations identifiées, et pour bien comprendre leur effet, il faut déterminer quelles interactions en sont affectées et ce, par des expériences de co-immunoprécipitation ou de système double hybride. De plus, il faut déterminer la contribution de ces mutations dans la voie Wnt/PCP. Des expériences de validation dans le poisson zébré ou chez la grenouille pourraient être intéressantes, car ils représentent de bons modèles pour étudier le mécanisme de convergence et extension ainsi que les stades du développement.

Il est très important de déterminer le rôle que peut jouer le gène *LRP6* dans la voie PCP. Plusieurs hypothèses sont à évaluer :

- 1) Si l'inhibition de la voie PCP est causée par le recrutement de DVL par *LRP6*. Cela pourrait empêcher la liaison de DVL avec AXIN et par conséquent, le recrutement de ce dernier par DIV afin de former le complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine.
- 2) Si le *LRP6* régule la voie PCP à travers *DKK1*. En effet, *DKK1* active la voie PCP par son interaction avec Glypican4 (270). Donc, l'inhibition de la voie PCP pourrait être la conséquence de la destruction du complexe *DKK1*/Glypican4. Ceci est appuyé par une étude qui a démontré qu'un gain de fonction de la voie PCP est dû à l'absence de la partie extracellulaire qui lie *DKK1* (271)
- 3) Si *LRP6* peut réguler la voie PCP à travers la protéine Wise puisqu'une étude a démontré que Wise affecte la régulation de la voie PCP et lie le gène *LRP6* (272).
- 4) Si *LRP6* inhibe la voie PCP par son interaction avec AXIN. En effet, il a été démontré qu'AXIN lie directement Dsh (243). Il est possible que *LRP6* puisse diminuer l'activité de Dsh dans la voie PCP et l'augmenter dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Le scénario possible est que *LRP6* lie AXIN pour la médiation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine à travers le motif ppp(S/T)p qui serait différent de celui par lequel il inhibe la signalisation PCP.

5) Si LRP6 est capable d'activer la signalisation PCP par son interaction avec des gènes de cette voie en aval de Dsh.

6) Si la surexpression ainsi que l'inhibition de l'expression de Lrp6 peut affecter des effecteurs des deux voies particulièrement la voie PCP.

## **7.2. ANKRD6**

Étant donnée l'importance des modules fonctionnels de ANKRD6 et le haut degré de conservation de ces domaines à travers l'évolution, il serait nécessaire de poursuivre les études afin d'identifier le mécanisme par lequel ces mutations pourraient affecter les interactions de ce gène avec ses partenaires dans la voie PCP et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Une directive qui permettrait cela serait, par exemple d'investiguer, tout d'abord, la possibilité que la liaison d'AXIN avec DVL aurait un effet activateur de la voie PCP. En d'autres termes, si la liaison de DVL avec AXIN empêcherait le recrutement de ce dernier par DIV, par conséquence, cela bloquerait la formation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. De même, voir si la liaison d'AXIN avec DVL aura un effet inhibiteur de la voie PCP, puisqu'il est connu que la liaison de DIV avec DVL favorise la signalisation PCP. Ces étapes permettront ensuite d'évaluer et de comprendre si DIVERSIN exerce son effet régulateur de l'activité des deux voies de signalisation à travers DVL. Alternativement, on pourrait utiliser ces nouveaux modèles pour tester l'effet des mutations de ce gène.

La voie PCP représente un large champ d'étude très attrayant pour décortiquer les bases génétiques et moléculaires des défauts de la neurulation. La souris Lp, *Vangl2*, qui a permis la découverte du gène responsable du phénotype de craniorachischisis, n'a fait que marquer le début d'une série d'études sur des modèles murins des ATN. Il serait donc intéressant de générer des animaux modèles pour DIVERSIN afin de mieux étudier génétiquement les ATN et le rôle de ce gène dans cette pathologie humaine.

## **7.3. CELSRI**

D'autres investigations futures, y compris des validations fonctionnelles biochimiques comme l'essai JNKase, sont nécessaires pour établir si les mutations identifiées dans *CELSRI*

pourraient affecter la fonction de la protéine dans la signalisation PCP. Étudier l'interaction entre CELSR1 et les autres membres de la voie PCP et effectuer des expériences de validation chez le poisson zébré ou chez la grenouille pourraient aider à mieux comprendre le mode d'action de ces variants.

## 8. Perspectives générales

L'approche de gènes-candidats pour les études génétiques reste encore un outil très puissant pour bien comprendre les ATN et elle permet aussi de tirer profit de la richesse de données issues des études sur les animaux modèles. Avec le développement des nouvelles technologies, les approches génomiques telles que le séquençage de l'exome entier, possèdent la capacité de nous exposer sur une plus large échelle une image des gènes qui jouent un rôle important dans la pathologie des ATN. L'étude des variations du nombre de copies par hybridation génomique comparative sur puces à ADN (array-CGH) représente une approche puissante qui permettra la détection des variations non-balancées dans le nombre de copies d'un gène ainsi que de larges insertions et de délétions indétectables au niveau microscopique. Cette approche fournira la capacité d'identifier de nouveaux gènes en liaison avec la pathologie des ATN.

Les régions codantes et les jonctions intron-exon étaient nos seules cibles dans cette étude. Il est possible que des modifications non-codantes dans les régions régulatrices de ces gènes soient capables d'influencer leur niveau d'expression génique et pourraient être associées aux ATN. Leur investigation serait nécessaire dans une étude future avec l'identification et la caractérisation des éléments régulateurs toujours inconnus. Aussi, la méthylation de l'ADN a un effet déterminant sur la régulation de la transcription génétique et donc, un potentiel particulier dans la causalité des ATN. Ainsi, les modifications épigénétiques seront les cibles d'investigation des prochaines études en lien avec les ATN à l'échelle génomique. Cela pourrait être fait par l'utilisation de la technique d'RNA-seq ou le séquençage au bisulfite de l'ADN génomique. Il est aussi possible d'utiliser des souris modèles afin d'investiguer des altérations d'expression génique dans la pathogénèse des ATN.



## 9. Conclusion

Nous avons identifié dans ces études la nouvelle souris mutante *Skax*<sup>26m1Jus</sup> et un nouvel allèle hypermorphe pour étudier les anomalies du tube neural et ainsi comprendre d'avantage les mécanismes moléculaires à la base des ATN. Aussi, nous avons démontré une interaction génétique entre *Skax*<sup>26m1Jus</sup>(*Lrp6*) et *Lp* (*Vangl2*) qui suggèrent que *Lrp6* a un rôle dans la voie PCP. La validation fonctionnelle de la mutation p.Ile681Arg dans le gène *Lrp6* a prouvé son effet pathogénique. Dans la cohorte humaine, plusieurs nouvelles mutations hétérozygotes, spécifiques aux ATN, dans le gène de la polarité planaire cellulaire *CELSRI* et les gènes impliqués dans les deux voies des signalisations WNT (Wnt/PCP et Wnt/ $\beta$ -caténine), *LRP6* et *DIVERSIN* ont été identifiées avec un effet pathogénique. Cela implique la nécessité d'effectuer des études supplémentaires dans le but de déterminer l'implication directe de ces gènes et pour mieux décortiquer et comprendre les mécanismes par lesquels les mutations identifiées peuvent être prédisposantes aux anomalies du tube neural dans la population humaine. Nos résultats classent les gènes *DIVERSIN*, *CELSRI* et *LRP6* parmi les gènes humains de la voie PCP qui sont impliqués dans la pathologie des ATN et confirment ainsi notre hypothèse. Les mutations identifiées dans ces trois gènes pourraient justifier une bonne partie des anomalies du tube neural chez l'humain. En perspective, l'analyse génétique et moléculaire des autres membres de la voie PCP fournira un excellent outil afin de comprendre davantage la pathologie de ce spectre de malformations congénitales.

## 10. Bibliographie

1. Schoenwolf, G. C. Larsen's Human Embryology 4th edition US Elsevier Health Bookshop. (2009).
2. Pansky, B. Review of medical embryology. Macmillan (1982).
3. Rossi A, Biancheri R, Cama A, et al. Imaging in spine and spinal cord malformations. *European Journal of Radiology*. 2004;50(2):177-200.
4. Bassuk, A. G. & Kibar, Z. Genetic Basis of Neural Tube Defects. *Seminars in Pediatric Neurology* 16, 101–110 (2009).
5. Gilbert, S. F. *Developmental Biology*. 1–809 (Sinauer associate inc, 2009).
6. Prasad, M. S., Sauka-Spengler, T. & LaBonne, C. Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Developmental Biology* 366, 10–21 (2012).
7. Wallingford JB. Neural tube closure and neural tube defects: Studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2005;135C(1):59-68.
8. Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev. Dyn*. 1999;215(3):273-283.
9. Hildebrand JD. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J. Cell. Sci*. 2005;118(Pt 22):5191-5203.
10. Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, et al. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development*. 2007;134(17):3203 -3211.

11. Eom DS, Amarnath S, Fogel JL, Agarwala S. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development*. 2011;138(15):3179 -3188.
12. Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development*. 2002;129(10):2507 -2517.
13. Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. *J. Pathol*. 2009;n/a-n/a.
14. Greene NDE, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(4):303-311.
15. Camerer E, Barker A, Duong DN, et al. Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo. *Dev. Cell*. 2010;18(1):25-38.
16. Copp, A. J., Greene, N. D. E. & Murdoch, J. N. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4, 784–793 (2003).
17. Sakai, Y. Neurulation in the mouse: manner and timing of neural tube closure. *Anat. Rec.* 223, 194–203 (1989).
18. Deraut, E. R. et al. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol* 27, 515–524 (2005).
19. Van Allen, M. I. et al. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am. J. Med. Genet.* 47, 723–743 (1993).
20. Seller, M. J. Further evidence for an intermittent pattern of neural tube closure in humans. *J. Med. Genet.* 32, 205–207 (1995).
21. Catala M. Genetic control of caudal development. *Clinical Genetics*. 2002;61(2):89-9
22. Golden, J. A. & Harding, B. N. *Developmental Neuropathology*. (Wiley-Blackwell, 2006).

23. Rasmussen, S. A. et al. Guidelines for case classification for the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 67, 193–201 (2003).
24. De Marco, P., Merello, E., Cama, A., Kibar, Z. & Capra, V. Human neural tube defects: genetic causes and prevention. *Biofactors* 37, 261–268 (2011).
25. Menkes, J. H., Sarnat, H. B. & Maria, B. L. *Textbook of child neurology*. Lea & Febiger (2005).
26. Botto, L. D., Moore, C. A., Khoury, M. J. & Erickson, J. D. Neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 341, 1509–1519 (1999).
27. Wyszynski, D. F. *Neural Tube Defects: From Origin to Treatment*. Oxford University Press (2005).
28. Lynch SA. Non- multifactorial neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2005;135C(1):69-76.29. Rufener SL, Ibrahim M, Raybaud CA, Parmar HA. Congenital Spine and Spinal Cord Malformations--Pictorial Review. *Am. J. Roentgenol.*
30. Rossi, A. et al. Spinal dysraphism: MR imaging rationale. *J Neuroradiol* 31, 3–24 (2004).
31. Naidich TP, McLone DG, Mutluer S. A new understanding of dorsal dysraphism with lipoma (lipomyeloschisis): radiologic evaluation and surgical correction. *AJR Am J Roentgenol.* 1983;140(6):1065-1078.
32. Tortori-Donati P, Rossi A, Biancheri R, Cama A. Magnetic resonance imaging of spinal dysraphism. *Top Magn Reson Imaging.* 2001;12(6):375-409.
33. Finn, M. A. & Walker, M. L. Spinal lipomas: clinical spectrum, embryology, and treatment. *Neurosurg Focus* 23, E10 (2007).
34. Barkovich, A. J., Edwards, M. S. & Cogen, P. H. MR evaluation of spinal dermal sinus tracts in children. *AJNR Am J Neuroradiol* 12, 123–129 (1991).

35. Conti P, Tenenbaum R, Capozza M, Mouchaty H, Conti R. Diastematomyelia and Tumor in Adults. *Spine*. 2010;35(24):E1438-E1443.
36. Guilloton L, Allary M, Jacquin O, Billaud Y, Drouet A, Felten D, Volckmann P. Split-cord malformation (diastematomyelia) presenting in two adults: case report and a review of the literature. *Rev Neurol (Paris)*. 2004; 160(12):1180-6.
37. Duhamel, B. From the Mermaid to Anal Imperforation: The Syndrome of Caudal Regression. *Arch. Dis. Child*. 36, 152–155 (1961).
38. Tortori-Donati, P. et al. Segmental spinal dysgenesis: neuroradiologic findings with clinical and embryologic correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 20, 445–456 (1999).
39. Cameron, M. & Moran, P. Prenatal screening and diagnosis of neural tube defects. *Prenat. Diagn*. 29, 402–411 (2009).
40. Ellenbogen, R. G., Springer, S. C., Windle, M. L., Carter, B. S. & Wagner, C. L. Neural Tube Defects in the Neonatal Period. *Medscape reference* 1–13 (2012).
41. Jee, S. H. et al. Major gene evidence after MTHFR-segregation analysis of serum homocysteine in families of patients undergoing coronary arteriography. *Hum. Genet*. 111, 128–135 (2002).
42. Mitchell, L. E. Epidemiology of neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C, 88–94 (2005).
43. Blom HJ, Shaw GM, Heijer M den, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(9):724-731.
44. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N. Engl. J. Med*. 2007;357(2):135-142.
45. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, et al. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N. Engl. J. Med*. 2004;350(2):134-142.

46. Molloy AM, Quadros EV, Sequeira JM, et al. Lack of association between folatereceptor autoantibodies and neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(2):152-160.
47. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R2):R113-R129.
48. Steegers-Theunissen, R. P., Boers, G. H., Trijbels, F. J. & Eskes, T. K. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N. Engl. J. Med.* 324, 199- 200 (1991).
49. Cogram P, Hynes A, Dunlevy LPE, Greene NDE, Copp AJ. Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol. *Human Molecular Genetics.* 2004;13(1):7 -14.
50. Chen, W. H., Morriss-Kay, G. M. & Copp, A. J. Prevention of spinal neural tube defects in the curly tail mouse mutant by a specific effect of retinoic acid. *Dev. Dyn.* 199, 93–102 (1994).
51. Seller, M. J., Embury, S., Polani, P. E. & Adinolfi, M. Neural tube defects in curlytail mice. II. Effect of maternal administration of vitamin A. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 206, 95–107 (1979).
52. Umur, A. S. et al. Simultaneous folate intake may prevent adverse effect of valproic acid on neurulating nervous system. *Childs Nerv Syst* 28, 729–737 (2012).
53. Waller, D. K. et al. Are obese women at higher risk for producing malformed offspring? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170, 541–548 (1994).
54. Suarez, L., Felkner, M., Brender, J. D., Canfield, M. & Hendricks, K. Maternal exposures to cigarette smoke, alcohol, and street drugs and neural tube defect occurrence in offspring. *Matern Child Health J* 12, 394–401 (2008).
55. Grewal, J., Carmichael, S. L., Ma, C., Lammer, E. J. & Shaw, G. M. Maternal periconceptional smoking and alcohol consumption and risk for select congenital anomalies. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 82, 519–526 (2008).

56. Khoury MJ, Beaty TH, Liang KY. Can familial aggregation of disease be explained by familial aggregation of environmental risk factors? *Am. J. Epidemiol.* 1988;127(3):674-683.
57. Manning SM, Jennings R, Madsen JR. Pathophysiology, prevention, and potential treatment of neural tube defects. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2000;6(1):6-14.
58. van der Put NMJ, Trijbels FJM, van den Heuvel LP. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *The Lancet.* 1995;346(8982):1070-1071.
59. van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ. Is the common 677C>T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A metaanalysis. *QJM.* 1997;90(2):111-115.
60. Wharton, K. A., Jr Runnin' with the Dvl: Proteins That Associate with Dsh/Dvl and Their Significance to Wnt Signal Transduction. *Developmental Biology* (2003).
61. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998;62(5):1044-1051.
62. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(5):433-443.
63. van der Put, N. M. et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 90, 511–517 (1997).
64. Wilson, A. et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol. Genet. Metab.* 67, 317–323 (1999).

65. Franke, B. et al. An association study of 45 folate-related genes in spina bifida: Involvement of cubilin (CUBN) and tRNA aspartic acid methyltransferase 1 (TRDMT1). *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 85, 216–226 (2009).
66. Swanson, D. A. et al. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1058–1065 (2001).
67. Elmore, C. L. et al. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol. Genet. Metab.* 91, 85–97 (2007).
68. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2010;88(8):653-669.
69. Kim T-H, Goodman J, Anderson KV, Niswander L. Phactr4 regulates neural tube and optic fissure closure by controlling PP1-, Rb-, and E2F1-regulated cell-cycle progression. *Dev. Cell*. 2007;13(1):87-102.
70. Ruland J, Duncan GS, Elia A, et al. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell*. 2001;104(1):33-42.
71. Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Verma IM. Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev*. 2000;14(14):1729-1733.
72. Miner JH, Cunningham J, Sanes JR. Roles for Laminin in Embryogenesis: Exencephaly, Syndactyly, and Placentopathy in Mice Lacking the Laminin  $\alpha$ 5 Chain. *J Cell Biol*. 1998;143(6):1713-1723.
73. De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E. Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development*. 1999;126(17):3957-3968.



74. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, et al. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes & Development*. 1995;9(24):3136-3148.
75. Hirata H, Tomita K, Bessho Y, Kageyama R. Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J*. 2001; 20(16):4454-4466.
76. van Amerongen R1, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 2009; 136(19):3205-14.
77. CADIGAN KM, LIU YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, 2006; 119: 395-402.
78. CROSNIER C, STAMATAKI D, LEWIS J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, 2006; 7: 349-359.
79. WATT FM, CELSO CL, SILVA-VARGAS V. Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev*, 2006; 16: 518-524.
80. LOGAN CY, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2004; 20 : 781-810.
81. Kusserow, A. et al. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nat Cell Biol* 433, 156–160 (2005).
82. Tanaka, K. Drosophila Segment Polarity Gene Product Porcupine Stimulates the Posttranslational N-Glycosylation of Wingless in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 277, 12816–12823 (2002).
83. Kikuchi, A., H. Yamamoto, and A. Sato. 2009. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*. 19:119-29.
84. Van Amerongen, R., and R. Nusse. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 136:3205-14.

85. Bänziger, C. et al. Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells. *Cell* 125, 509–522 (2006).
86. Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D. & Boutros, M. Secretion of Wnt Ligands Requires Evi, a Conserved Transmembrane Protein. *Cell* 125, 523–533 (2006).
87. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810 (2004).
88. Miller, J.R. 2002. The Wnts. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3001.
89. Van Amerongen, R., and A. Berns. 2006. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet.* 22:678-89.
90. Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature.* 1997 Oct 30;389(6654):966-70.
91. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480 (2006).
92. Bhanot, P. et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225–230 (1996).
93. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt,  $\beta$ -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science.* 2004;303(5663):1483 -1487.
94. Gordon, M.D., and R. Nusse. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281:22429-33.
95. Grigoryan, T., P. Wend, A. Klaus, and W. Birchmeier. 2008. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* 22:2308-41.
96. Kikuchi, A., H. Yamamoto, and S. Kishida. 2007. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal.* 19:659-71.

97. Bienz M, Clevers H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell*. 2000;103(2):311-320.
98. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170 (1996).
99. Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. & Fuchs, E. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95, 605–614 (1998).
100. Jamieson, C. H. M. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351, 657–667 (2004).
101. Kato, M. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* 157, 303–314 (2002).
102. Korinek, V., Barker, N., Moerer, P. & Van Donselaar, E. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature* (1998).
103. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850 (2005).
104. Huang, H.-C. & Klein, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 5, 234 (2004).
105. Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115 (2006).
106. Nam, J.-S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S. & Yoon, J. K. Mouse cristin/Rspondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 13247–13257 (2006).
107. Kikuchi, A., Yamamoto, H. & Kishida, S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell. Signal.* 19, 659–671 (2007).

108. Mao, B. et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/betacatenin signalling. *Nature* 417, 664–667 (2002).
109. Glinka, A. et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362 (1998).
110. Xu, Q. et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116, 883–895 (2004).
111. Hoang, B., Moos, M., Vukicevic, S. & Luyten, F. P. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 26131–26137 (1996).
112. van Amerongen R, Berns A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet.* 22(12):678-89 (2006).
113. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 131(8):1663-77 (2004).
114. Slusarski DC1, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature.* 27;390(6658):410-3 (1997).
115. Aris JP1, Basta PV, Holmes WD, Ballas LM, Moomaw C, Rankl NB, Blobel G, Loomis CR, Burns DJ. Molecular and biochemical characterization of a recombinant human PKC-delta family member. *Biochim Biophys Acta.* 19;1174(2):171-81 (1993).
116. Ekinci FJ, Shea TB. Free PKC catalytic subunits (PKM) phosphorylate tau via a pathway distinct from that utilized by intact PKC. *Brain Res.* 11;850(1-2):207-16 (1999).
117. Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem.* 28;275(17):12701-11 (2000).
118. Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16(7):279-83 (2000).

119. Sheldahl LC1, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* 26;161(4):769-77 (2003).
120. Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature.* 16;417(6886):295-9 (2002).
121. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15:707-47 (1997).
122. Veeman MT1, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* 2003 Sep;5(3):367-77.
123. Habas R1, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell.* 28;107(7):843-54 (2001).
124. Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci.* 30(6):342-53 (2005).
125. Liu W, Sato A, Khadka D, Bharti R, Diaz H, Runnels LW, Habas R. Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8;105(1):210-5(2008).
126. Hall A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science.* 26;280(5372):2074-5 (1998).
127. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):509-14.
128. Maekawa M1, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 6;285(5429):895-8 (1999).

129. Li L1, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, McMahon A, Sussman DJ, Wu D. Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1;274(1):129-34 (1999).
130. Habas R, Dawid IB, He X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* 15;17(2):295-309 (2003).
131. Minden A1, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta.* 24;1333(2):F85-104 (1997).
132. Ciani L1, Salinas PC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3beta to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability. *BMC Cell Biol.* 3;8:27 (2007).
133. Nishita M1, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, Qiao S, Takada S, Kikuchi A, Minami Y. Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol.* 30(14):3610-9 (2010).
134. Weeraratna AT1, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* 1(3):279-88 (2002).
135. Kurayoshi M1, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res.* 1;66(21):10439-48 (2006).
136. Pukrop T1, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trümper L, Binder C. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4;103(14):5454-9 (2006).
137. Cirone P1, Lin S, Griesbach HL, Zhang Y, Slusarski DC, Crews CM. A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis. *Angiogenesis.* 11(4):347-60 (2008).

138. Liang H1, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*. 4(5):349-60 (2003).
139. Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene*. 24;24(13):2144-54 (2005).
140. Olson DJ1, Gibo DM. Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation. *Exp Cell Res*. 25;241(1):134-41 (1998).
141. Kibar, Z. Identification of a New Chemically Induced Allele (Lpm1Jus) at the Loop-Tail Locus: Morphology, Histology, and Genetic Mapping. *Genomics* 72, 331–337 (2001).
142. Guyot, M.-C. et al. A novel hypomorphic Looptail allele at the planar cell polarity Vangl2 gene. *Dev. Dyn*. 240, 839–849 (2011).
143. Ybot-Gonzalez P, Savery D, Gerrelli D, et al. Convergent extension, planar cell polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development*. 2007;134(4):789-799.
144. Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev. Dyn*. 2011;240(3):616-626.
145. Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, et al. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev. Cell*. 2008;15(1):23-36.
146. Lu X, Borchers AGM, Jolicoeur C, et al. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 2004;430(6995):93-98.
147. Simons M, Mlodzik M. Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu Rev Genet*. 2008;42:517.
148. McNeill H. Planar Cell Polarity: Keeping Hairs Straight Is Not So Simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(2).

149. Etheridge SL, Ray S, Li S, Hamblet NS, Lijam N, Tsang M, Greer J, Kardos N, Wang J, Sussman DJ, Chen P, Wynshaw-Boris A. Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet.* 2008;4(11):e1000259.
150. Wang J, Mark S, Zhang X, Qian D, Yoo SJ, Radde-Gallwitz K, Zhang Y, Lin X, Collazo A, Wynshaw-Boris A, Chen P. Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet.* 2005;37(9):980-5.
151. Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, Segil N, Fraser SE, Chen P, Wallingford JB, Wynshaw-Boris A. Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development.* 2006;133(9):1767-78.
152. Wang Y, Guo N, Nathans J. The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neurosci.* 2006;26(8):2147-2156.
153. Montcouquiol M, Sans N, Huss D, et al. Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J. Neurosci.* 2006;26(19):5265-5275.
154. Wang Y, Huso D, Cahill H, Ryugo D, Nathans J. Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene. *JNeurosci.* 2001;21(13):4761-71.
155. Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature.* 2003 8;423(6936):173-7.
156. Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, Arkell R, Stanier P, Copp AJ. Disruption of scribble (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum Mol Genet.* 2003 Jan 15;12(2):87-98.



157. Torban E1, Patenaude AM, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G, Epstein DJ, Gros P. Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 ;105(9):3449-54.
158. Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, Petit C, Yoder BK, Chen P. Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet*. 2008 ;40(1):69-77.
159. Jenny A, Reynolds-Kenneally J, Das G, Burnett M, Mlodzik M. Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat Cell Biol*. 2005 ;7(7):691-7.
160. Mlodzik M. Spiny legs and prickled bodies: new insights and complexities in planar polarity establishment. *Bioessays*. 2000 ;22(4):311-5.
161. Mlodzik M. Planar polarity in the *Drosophila* eye: a multifaceted view of signaling specificity and cross-talk. *EMBO J*. 1999 ;18(24):6873-9.
162. Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell*. 1999 ;98(5):585-95.
163. Shimada Y, Usui T, Yanagawa S, Takeichi M, Uemura T. Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. *Curr Biol*. 2001 ;11(11):859-63.
164. Shima Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Chisaka O, Takeichi M, Uemura T. Differential expression of the seven-pass transmembrane cadherin genes *Celsr1-3* and distribution of the *Celsr2* protein during mouse development. *Dev Dyn*. 2002 ;223(3):321-32.
165. Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SD, Gray IC, Murdoch JN. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol*. 2003 ;13(13):1129-33.

166. Paudyal A, Damrau C, Patterson VL, Ermakov A, Formstone C, Lalanne Z, Wells S, Lu X, Norris DP, Dean CH, Henderson DJ, Murdoch JN. The novel mouse mutant, *chuzhoi*, has disruption of *Ptk7* protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Dev Biol.* 2010 ;10:87.
167. Wansleebe C, van Gurp L, Feitsma H, Kroon C, Rieter E, Verberne M, Guryev V, Cuppen E, Meijlink F. An ENU-mutagenesis screen in the mouse: identification of novel developmental gene functions. *PLoS One.* 2011 ;6(4):e19357.
168. Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel KP, Dai X, Chen P. *Wnt5a* functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol.* 2007; 306(1):121-33.
169. Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, Wolf V, Montcouquiol M, Sassoon DA, Hseih JC, Rubin JS, Salinas PC, Kelley MW. Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development.* 2003; 130(11):2375-84.
170. Dabdoub A1, Kelley MW. Planar cell polarity and a potential role for a Wnt morphogen gradient in stereociliary bundle orientation in the mammalian inner ear. *JNeurobiol.* 2005; 64(4):446-57.
171. Narimatsu M, Bose R, Pye M, Zhang L, Miller B, Ching P, Sakuma R, Luga V, Roncari L, Attisano L, Wrana JL. Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell.* 2009; 137(2):295-307.
172. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, Quaggin SE, Harrison R, Mount R, McNeill H. Loss of *Fat4* disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet.* 2008; 40(8):1010-5.
173. Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, Schekman R, Ginty DD. *Sec24b* selectively sorts *Vangl2* to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nat Cell Biol.* 2010 ;12(1):41-6; sup pp 1-8.

174. Wansleeben C, Feitsma H, Montcouquiol M, Kroon C, Cuppen E, Meijlink F. Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development*. 2010; 137(7):1067-73.
175. Gong Y, Mo C, Fraser SE. Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature*. 2004; 430(7000):689-693.
176. Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, Hildebrandt F. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet*. 2003; 34(4):413-20.
177. Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL. Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet*. 2005; 37(10):1135-40.
178. Park TJ, Haigo SL, Wallingford JB. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat Genet*. 2006; 38(3):303-11.
179. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Krönig C, Schermer B, Benzing T, Cabello OA, Jenny A, Mlodzik M, Polok B, Driever W, Obara T, Walz G. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*. 2005; 37(5):537-43.
180. Habas R1, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*. 2001; 107(7):843-54.
181. Zigmond SH. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 2004; 16(1):99-105.

182. Boisvieux-Ulrich E, Laine MC, Sandoz D. The orientation of ciliary basal bodies in quail oviduct is related to the ciliary beating cycle commencement. *Biol Cell*. 1985;55(1-2):147-50.
183. Boisvieux-Ulrich E, Sandoz D. Determination of ciliary polarity precedes differentiation in the epithelial cells of quail oviduct. *Biol Cell*. 1991;72(1-2):3-14.
184. Hagiwara H1, Ohwada N, Aoki T, Suzuki T, Takata K. Immunohistochemical and electron microscopic observations of stromal cells in the human oviduct mucosa. *Med Mol Morphol*. 2008 ;41(4):221-6.
185. Turner CM, Adler PN. Distinct roles for the actin and microtubule cytoskeletons in the morphogenesis of epidermal hairs during wing development in *Drosophila*. *Mech Dev*. 1998 ;70(1-2):181-92.
186. Hannus M1, Feiguin F, Heisenberg CP, Eaton S. Planar cell polarization requires *Widerborst*, a B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *Development*. 2002;129(14):3493-503.
187. Shimada Y, Yonemura S, Ohkura H, Strutt D, Uemura T. Polarized transport of *Frizzled* along the planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. *Dev Cell*. 2006;10(2):209-22.
188. Krylova O, Messenger MJ, Salinas PC. *Dishevelled-1* regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta. *J Cell Biol*. 2000 ;151(1):83-94.
189. Ciani L, Krylova O, Smalley MJ, Dale TC, Salinas PC. A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: *dishevelled* signals locally to stabilize microtubules. *J Cell Biol*. 2004 ;164(2):243-53.
190. Lee OK, Frese KK, James JS, Chadda D, Chen ZH, Javier RT, Cho KO (*Discs-Large* and *Strabismus* are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat Cell Biol* 5:987-993.2003).

191. Djiane A, Yogev S, Mlodzik M. The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Cell*. 2005 May 20;121(4):621-31.
192. Dollar GL, Weber U, Mlodzik M, Sokol SY. Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled. *Nature*. 2005 ;437(7063):1376-80.
193. Bellaïche Y, Beaudoin-Massiani O, Stuttem I, Schweisguth F. The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *Drosophila*. *Development*. 2004 ;131(2):469-78.
194. Courbard JR, Djiane A, Wu J, Mlodzik M. The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors. *Dev Biol*. 2009 ;333(1):67-77.
195. Wada H, Iwasaki M, Sato T, et al. Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. *Development*. 2005;132(10):2273 -2285.
196. Brown, S. D. et al. Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248, 879–888 (1998).
197. Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Russell, D. W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228, 815–822 (1985).
198. Springer TA. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol*. 1998 ;283(4):837-62.
199. Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol*. 2001 ;8(6):499-504.

200. Bersch, B., Hernandez, J.-F., Marion, D. & Arlaud, G. J. Solution Structure of the Epidermal Growth Factor (EGF)-like Module of Human Complement Protease C1r, an Atypical Member of the EGF Family †. *Biochemistry* 37, 1204–1214 (1998).
201. KB, U. Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 precursor Homo sapiens (Human). UniProt EMBL-EBI at <http://www.uniprot.org/uniprot/O75581>
202. Go, G.-W. & Mani, A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* 85, 19–28 (2012).
203. Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H. & Kikuchi, A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 29, 41–54 (2010).
204. Semënov, M. V. et al. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* 11, 951–961 (2001).
205. Bourhis, E. et al. Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *Journal of Biological Chemistry* 285, 9172–9179 (2010).
206. Goel S, Chin EN, Fakhraldeen SA, Berry SM, Beebe DJ, Alexander CM. Both LRP5 and LRP6 receptors are required to respond to physiological Wnt ligands in mammary epithelial cells and fibroblasts. *J Biol Chem.* 2012 ;287(20):16454-66.
207. Niehrs, C. & Shen, J. Regulation of Lrp6 phosphorylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2551–2562 (2010).
208. Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W. & Wu, D. Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of 102 dishevelled. *J. Biol. Chem.* 277, 5977–5981 (2002).
209. Ahn, V. E. et al. Structural Basis of Wnt Signaling Inhibition by Dickkopf Binding to LRP5/6. *Developmental Cell* 21, 862–873 (2011).

210. Wei, Q. et al. R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 15903–15911 (2007).
211. Andersson, E. R. et al. Genetic interaction between Lrp6 and Wnt5a during mouse development. *Dev. Dyn.* NA–NA (2009).doi:10.1002/dvdy.22101
212. Semenov, M. SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26770–26775 (2005).
213. Lu, W., Liu, C.-C., Thottassery, J. V., Bu, G. & Li, Y. Mesd is a universal inhibitor of Wnt coreceptors LRP5 and LRP6 and blocks Wnt/beta-catenin signaling in cancer cells. *Biochemistry* 49, 4635–4643 (2010).
214. Zeng, X. et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877 (2005).
215. Davidson, G. et al. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872 (2005).
216. Chen, M. et al. G Protein-coupled Receptor Kinases Phosphorylate LRP6 in the Wnt Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 284, 35040–35048 (2009).
217. Sue Ng, S. et al. MAP3K1 functionally interacts with Axin1 in the canonical Wnt signalling pathway. *Biological Chemistry* 391, 171–180 (2010).
218. Tezuka, N., Brown, A. M. C. & Yanagawa, S.-I. GRB10 binds to LRP6, the Wnt co-receptor and inhibits canonical Wnt signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 648–654 (2007).
219. Kokubu, C. & Ima, K. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development* 131, 5469–5480 (2004).
220. Carter, M. et al. Crooked tail (Cd) model of human folate-responsive neural tube defects is mutated in Wnt coreceptor lipoprotein receptor-related protein 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12843–12848 (2005).

221. Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. & Skarnes, W. C. An LDLreceptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535–538 (2000).
222. Fossat, N. et al. Stringent requirement of a proper level of canonical WNT signalling activity for head formation in mouse embryo. *Development* 138, 667–676 (2011).
223. Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. & Skarnes, W. C. An LDLreceptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535–538 (2000).
224. Takeichi M. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2007 ;8(1):11-20.
225. Chae J, Kim MJ, Goo JH, Collier S, Gubb D, Charlton J, Adler PN, Park WJ. The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development.* 1999 ;126(23):5421-9.
226. Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell.* 1999 ;98(5):585-95.
227. Bellaïche Y, Gho M, Kaltschmidt JA, Brand AH, Schweisguth F. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol.* 2001 ;3(1):50-7.
228. Segalen M, Bellaïche Y. Cell division orientation and planar cell polarity pathways. *Semin Cell Dev Biol.* 2009 ;20(8):972-7.
229. Adler PN. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2002 ;2(5):525-35.
230. Lee H, Adler PN. The function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing is dependent on *inturned* and *fuzzy*. *Genetics.* 2002 ;160(4):1535-47.
231. Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S. The ankyrin repeat protein *Diego* mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell.* 2001 ;1(1):93-101.



232. Gubb D, Green C, Huen D, Coulson D, Johnson G, Tree D, Collier S, Roote J. The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev.* 1999 ;13(17):2315-27.
233. Strutt D, Johnson R, Cooper K, Bray S. Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the *Drosophila* eye. *Curr Biol.* 2002 ;12(10):813-24.
234. Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN. Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics.* 1998; 150(1):199-210.
235. Wolff T, Rubin GM. Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development.* 1998; 125(6):1149-59.
236. Bastock R, Strutt H, Strutt D. Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development.* 2003; 130(13):3007-14.
237. Jenny A1, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M. Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J.* 2003; 22(17):4409-20.
238. Tissir F, De-Backer O, Goffinet AM, Lambert de Rouvroit C. Developmental expression profiles of Celsr (Flamingo) genes in the mouse. *Mech Dev.* 2002; 112(1-2):157-60.
239. Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SD, Gray IC, Murdoch JN. Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol.* 2003; 13(13):1129-33.
240. Formstone CJ, Mason I. Combinatorial activity of Flamingo proteins directs convergence and extension within the early zebrafish embryo via the planar cell polarity pathway. *Dev Biol.* 2005; 282(2):320-35.

241. Qu Y, Glasco DM, Zhou L, Sawant A, Ravni A, Fritzsche B, Damrau C, Murdoch JN, Evans S, Pfaff SL, Formstone C, Goffinet AM, Chandrasekhar A, Tissir F. Atypical cadherins *Celsr1-3* differentially regulate migration of facial branchiomotor neurons in mice. *JNeurosci*. 2010; 30(28):9392-401.
242. Robinson A, Escuin S, Doudney K, Vekemans M, Stevenson RE, Greene ND, Copp AJ, Stanier P. Mutations in the planar cell polarity genes *CELSR1* and *SCRIB* are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis. *Hum Mutat*. 2012; 33(2):440-7.
243. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, Fujimori T, Labeau J, Tyteca D, Courtoy P, Poumay Y, Uemura T, Goffinet AM. Lack of cadherins *Celsr2* and *Celsr3* impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci*. 2010; 13(6):700-7. doi: 10.1038/nn.2555. Epub 2010 May 16.
244. Doudney K, Stanier P. Epithelial cell polarity genes are required for neural tube closure. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005; 135C (1):42-7.
245. Zhou L, Bar I, Achouri Y, Campbell K, De Backer O, Hebert JM, Jones K, Kessar N, de Rouvroit CL, O'Leary D, Richardson WD, Goffinet AM, Tissir F. Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional *Celsr3* mutant mice. *Science*. 2008; 320(5878):946-9.
245. Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer HJ, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W. The ankyrin repeat protein *Diversin* recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev*. 2002 ;16(16):2073-84.
246. Mosavi LK, Minor DL Jr, Peng ZY. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ;99(25):16029-34.
247. Mosavi LK, Williams S, Peng Zy ZY. Equilibrium folding and stability of myotrophin: a model ankyrin repeat protein. *J Mol Biol*. 2002 ;320(2):165-70.

248. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 2004 ;13(6):1435-48.
249. Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development.* 2004 ;131(18):4467-76.
250. Moeller H, Jenny A, Schaeffer HJ, Schwarz-Romond T, Mlodzik M, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 24;103(43):15900-5. Epub 2006 Oct 10.
251. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 2002 ;16(9):1066-76.F
252. Tissir F, Bar I, Goffinet AM, Lambert De Rouvroit C. Expression of the ankyrin repeat domain 6 gene (*Ankrd6*) during mouse brain development. *Dev Dyn.* 2002 ;224(4):465-9.
253. Wu J, Jenny A, Mirkovic I, Mlodzik M. Frizzled-Dishevelled signaling specificity outcome can be modulated by Diego in *Drosophila*. *Mech Dev.* 2008 ;125(1-2):30-42.
254. Heinz Moeller, Andreas Jenny, Hans-Joerg Schaeffer, Thomas Schwarz-Romond, Marek Mlodzik, Matthias Hammerschmidt, Walter Birchmeier. Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 ; 103(43): 15900–15905.
255. Takaaki Matsui, Ángel Raya, Yasuhiko Kawakami, Carles Callol-Massot, Javier Capdevila, Concepción Rodríguez-Esteban, Juan Carlos Izpisua Belmonte. Noncanonical Wnt signaling regulates midline convergence of organ primordia during zebrafish development. *Genes Dev.* 2005 ; 19(1): 164–175.
256. Stainier DY. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev Genet.* 2001 ;2(1):39-48.

257. Thisse C1, Zon LI. Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science*. 2002 ;295(5554):457-62
258. Takayuki Yasunaga, Keiji Itoh, Sergei Y. Sokol. Regulation of basal body and ciliary functions by Diversin. *Mech Dev*. 2011 ; 128(7-10): 376–386.
259. Ikeda M1, Hirota Y, Sakaguchi M, Yamada O, Kida YS, Ogura T, Otsuka T, Okano H, Sawamoto K. Expression and proliferation-promoting role of Diversin in the neuronally committed precursor cells migrating in the adult mouse brain. *Stem Cells*. 2010 ;28(11):2017-26.
260. Gouvernement du Canada, S. C. D. G. D. A. P. de L. C. E. D. C. Votre santé et vous - L'acide folique et les anomalies congénitales. hc-scgccca (2004).
261. Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clinical Genetics*. 2007;71(4):295-310.
262. Holmes LB. Current concepts in genetics: congenital malformations. *N Engl J Med* 1976;295(4):204-7.
263. Lynberg MC, Khoury M. Contribution of birth defects to infant mortality among racial/ethnic minority groups, United States, 1983. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990;39(SS-3):1-12.
264. Elwood JM, Little J, Elwood JM. *Epidemiology and control of neural tube defects*. Oxford: Oxford University Press, 1992.
265. Van Allen MI, Fraser FC, Dallaire L, Allanson J, McLeod DR, Andermann F, et al. Recommendations on the use of folic acid supplementation to prevent the recurrence of neural tube defects. *Can Med Assoc J* 1993; 149(9): 1239-43.
266. Murphy PA. Periconceptional supplementation with folic acid: does it prevent neural defects? *J Nurse-Midwifery* 1992;37(1):25-32.

267. Wilson RD, Van Allen ML. Recommendations on the use of folic acid for the prevention of neural tube defects. *J Soc Obstet Gynecol* 1993; 15 Suppl:41-4
268. Sadovnick AD, Baird PA. A cost-benefit analysis of prenatal diagnosis of neural tube defects selectively offered to relatives of index cases. *Am J Med Genet* 1982;12(1):63-73.
269. Tosi LL, Detsky AS, Roye DP, Morden ML. When does mass screening for open neural tube defects in low-risk pregnancies result in cost savings? *Can Med Assoc J* 1987;136(3):255-65.
270. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2007;13(3):225-38.
271. Schlessinger K1, McManus EJ, Hall A. Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol*. 2007;178(3):355-61.
272. Torres MA1, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol*. 1996; 133(5): 1123-37.
273. Ishitani T1, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;23(1):131-9.
274. Huang T1, Xie Z, Wang J, Li M, Jing N, Li L. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins repress canonical Wnt signaling via its interaction with Dishevelled (Dvl) protein and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(43):37399-405.

275. Topol L1, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol.* 2003;162(5):899-908.
276. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006;4(4):e115.
277. Weidinger G1, Moon RT. When Wnts antagonize Wnts. *J Cell Biol.* 2003;162(5):753-5.
278. Westfall TA1, Brimeyer R, Twedt J, Gladon J, Olberding A, Furutani-Seiki M, Slusarski DC. Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol.* 2003 Sep 1;162(5):889-98.
279. Rida PC1, Chen P. Line up and listen: Planar cell polarity regulation in the mammalian inner ear. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(8):978-85.
280. Kelly MC1, Chen P. Development of form and function in the mammalian cochlea. *Curr Opin Neurobiol.* 2009;19(4):395-401.
281. Jonathan Ashmore. Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Physiological Reviews* Published 1 January 2008 Vol. 88 no. 173-210 DOI: 10.1152/physrev.00044.2006.
282. Lorenzo D. Botto, Cynthia A. Moore, Muin J. Khoury, and J. David Erickson. Neural-Tube Defects. *N Engl J Med* 1999; 341:1509-1519.
283. Kucera J. Rate and type of congenital anomalies among offspring of diabetic women. *J Reprod Med.* 1971;7(2):73-82.
284. Chappell JH Jr1, Wang XD, Loeken MR. Diabetes and apoptosis: neural crest cells and neural tube. *Apoptosis.* 2009;14(12):1472-83.
285. Betlejewski S. [Science and life--the history of Marquis Alfonso Corti]. *Otolaryngol Pol.* 2008;62(3):344-7.

286. Allache R1, Lachance S, Guyot MC, De Marco P, Merello E, Justice MJ, Capra V, Kibar Z. Novel mutations in Lrp6 orthologs in mouse and human neural tube defects affect a highly dosage-sensitive Wnt non-canonical planar cell polarity pathway. *Hum Mol Genet.* 2014;23(7):1687-99.
287. Deak KL, Dickerson ME, Linney E, et al: Analysis of ALDH1A2, CYP26A1, CYP26B1, CRABP1, and CRABP2 in human neural tube defects suggests a possible association with alleles in ALDH1A2. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:868-875, 2005
288. Rat E, Billaut-Laden I, Allorge D, et al: Evidence for a functional genetic polymorphism of the human retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1, an enzyme that may be involved in spinal bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:491-498, 2006
289. Stegmann K, Boecker J, Richter B, et al: A screen for mutations in human homologues of mice exencephaly genes Tfp2alpha and Msx2 in patients with neural tube defects. *Teratology* 63:167-175, 2001
290. Deak KL, Boyles AL, Etchevers HC, et al: SNPs in the neural cell adhesion molecule 1 gene (NCAM1) may be associated with human neural tube defects. *Hum Genet* 117:133-142, 2005
291. Hol FA, Geurds MP, Chatkupt S, et al: PAX genes and human neural tube defects: An amino acid substitution in Pax1 in a patient with spinal bifida. *J Med Genet* 33:655-660, 1996
292. Volcik KA, Blanton SH, Kruzel MC, et al: Testing for genetic associations with the PAX gene family in a spinal bifida population. *Am J Med Genet* 110:195-202, 2002
293. Hol FA, Hamel BC, Geurds MP, et al: A frameshift mutation in the gene for Pax3 in a girl with spinal bifida and mild signs of Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 32:52-56, 1995
294. Lu W, Zhu H, Wen S, et al: Screening for novel Pax3 polymorphisms and risks of spinal bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:45-49, 2007

295. Zhu H, Wicker NJ, Volcik K, et al: Promoter haplotype combinations for the human PDGFRA gene are associated with risk of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 81:127-132, 2004
296. Au KS, Northrup H, Kirkpatrick TJ, et al: Promoter genotype of the platelet-derived growth factor receptor-alpha gene shows population stratification but not association with spinal bifida meningocele. *Am J Med Genet A* 139:194-198, 2005
297. Joosten PH, Toepoel M, Mariman EC, et al: Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene predispose to human neural tube defects. *Nat Genet* 27:215-217, 2001
298. Zhu H, Lu W, Laurent C, et al: Genes encoding catalytic subunits of protein kinase A and risk of spinal bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:591-596, 2005
299. Stegmann K, Boecker J, Kosan C, et al: Human transcription factor SLUG: Mutation analysis in patients with neural tube defects and identification of a missense mutation (D119E) in the slug subfamily-defining region. *Mutat Res* 406:63-69, 1999
300. Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, et al: Susceptibility to spinal bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 62:379-396, 1998
301. Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, et al: Analysis of select folate pathway genes, Pax3, and human T in a midwestern neural tube defect population. *Teratology* 59:331-341, 1999
302. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, et al: Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N Engl J Med* 356:1432-1437, 2007
303. Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, et al: Novel mutations in VANGL1 in Neural Tube Defects. *Hum Mutat* 30:E706-E715, 2009



304. Klootwijk R, Groenen P, Schijvenaars M, et al: Genetic variants in ZIC1, ZIC2, and ZIC3 are not major risk factors for neural tube defects in humans. *Am J Med Genet A* 124A:40-47, 2004
305. Kibar, Z. et al. Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clinical Genetics* 80, 76–82 (2010).
306. Reynolds, A. et al. VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish. *Mech. Dev.* 127, 385–392 (2010).
307. Allache, R., De Marco, P., Merello, E., Capra, V. & Kibar, Z. Role of the planar cell polarity gene CELSR1 in neural tube defects and caudal agenesis. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 94, 176–181 (2012).
308. Bosoi, C. M. et al. Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene PRICKLE1 in human neural tube defects. *Hum. Mutat.* 00, 1–5 (2011).
309. De Marco, P. et al. FZD6 is a novel gene for human neural tube defects. *Hum. Mutat.* 33, 384–390 (2012).
310. Seo, J. H. et al. Mutations in the planar cell polarity gene, Fuzzy, are associated with neural tube defects in humans. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4324–4333 (2011).
311. Krauss, R. S. *Mouse Models of Developmental Genetic Disease.* (Elsevier Inc, 2008).
312. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 1998;12(16):2610-2622.
313. Axelrod JD. Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev.* 2001;15(10):1182-1187.
314. Usui T, Shima Y, Shimada Y, et al. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell.* 1999;98(5):585-595.

315. Bastock R, Strutt H, Strutt D. Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development*. 2003;130(13):3007-3014.
316. Tree DRP, Shulman JM, Rousset R, et al. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell*. 2002;109(3):371-381.
317. Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development*. 2004;131(18):4467-4476.
318. Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S. The Ankyrin Repeat Protein Diego Mediates Frizzled-Dependent Planar Polarization. *Developmental Cell*. 2001;1(1):93-101.
319. Goodrich LV. The Plane Facts of PCP in the CNS. *Neuron*. 2008;60(1):9-16.
320. Wu J, Mlodzik M. The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev. Cell*. 2008;15(3):462-469.
321. Chen W-S, Antic D, Matis M, et al. Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin Flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell*. 2008;133(6):1093-1105.
322. Pitaval A1, Tseng Q, Bornens M, Théry M. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J Cell Biol*. 2010 Oct 18;191(2):303-12.
323. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778:614-630.2008).
324. Bilder D, Li M, Perrimon N (Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289:113-116.2000b).
325. Bilder D, Perrimon N (Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403:676-680.2000).

326. Ishikawa H1, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Apr;12(4):222-34. doi: 10.1038/nrm3085.

327. Brandler WM1, Morris AP, Evans DM, Scerri TS, Kemp JP, Timpson NJ, St Pourcain B, Smith GD, Ring SM, Stein J, Monaco AP, Talcott JB, Fisher SE, Webber C, Paracchini S.

Common variants in left/right asymmetry genes and pathways are associated with relative hand skill. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003751. doi: 10.1371/journal.pgen.1003751. Epub 2013 Sep 12.

328. Murdoch, J. N. et al. Circletail, a new mouse mutant with severe neural tube defects: chromosomal localization and interaction with the loop-tail mutation. *Genomics* 78, 55–63 (2001).

329. Jenny A, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt. Sinai J. Med.* 2006;73(5):738-750.

330. Wang, Yanshu, et Jeremy Nathans. « Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions ». *Development (Cambridge, England)* 134, no. 4 (février 2007): 647-658.

331. Ivanov AI1, Young C, Den Beste K, Capaldo CT, Humbert PO, Brennwald P, Parkos CA, Nusrat A0. Tumor suppressor scribble regulates assembly of tight junctions in the intestinal epithelium. *Am J Pathol.* 2010 Jan;176(1):134-45. doi: 10.2353/ajpath.2010.090220. Epub 2009 Dec 3.

332. Puppo, F. et al. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/ $\beta$ -catenin canonical signalling. *EMBO Rep.* 12, 43–49 (2011).

333. Chan DW, Chan C-Y, Yam JWP, Ching Y-P, Ng IOL. Prickle-1 Negatively Regulates Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway by Promoting Dishevelled Ubiquitination/Degradation in Liver Cancer. *Gastroenterology.* 2006; 131(4):1218-1227.

334. Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT (1996) A frizzled homolog Functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6:1302–1306.
335. Rothbacher U, et al. (2000) Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBO J* 19:1010–1022.
336. Umbhauer M, et al. (2000) The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J* 19:4944–4954.
337. Hamblet, N. S. et al. Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Development* 129, 5827–5838 (2002).
338. Kibar, Z. et al. Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nature* 28, 251-255 (2001).
339. Zhao T1, Gan Q, Stokes A, Lassiter RN, Wang Y, Chan J, Han JX, Pleasure DE, Epstein JA, Zhou CJ.  $\beta$ -catenin regulates Pax3 and Cdx2 for caudal neural tube closure and elongation. *Development*. 2014; 141(1):148-57.
340. Kibar Z1, Salem S, Bosoi CM, Pauwels E, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P. Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clin Genet*.2011; 80(1):76-82.
341. Lyuksyutova AI1, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science*. 2003; 302(5652):1984-8.
342. Yoshikawa S1, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB. Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. *Nature*. 2003; 422(6932):583-8.
343. Tissir F, Bar I, Jossin Y, De Backer O, Goffinet AM. Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nat Neurosci*. 2005; 8(4):451-7.

344. Wolf AM, Lyuksyutova AI, Fenstermaker AG, Shafer B, Lo CG, Zou Y. Phosphatidylinositol-3-kinase-atypical protein kinase C signaling is required for Wnt attraction and anterior-posterior axon guidance. *J Neurosci.* 2008; 28(13):3456-67.
345. Fenstermaker AG1, Prasad AA, Bechara A, Adolfs Y, Tissir F, Goffinet A, Zou Y, Pasterkamp RJ. Wnt/planar cell polarity signaling controls the anterior-posterior organization of monoaminergic axons in the brainstem. *J Neurosci.* 2010; 30(47):16053-64.
346. Shafer B1, Onishi K, Lo C, Colakoglu G, Zou Y. Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance. *Dev Cell.* 2011; 20(2):177-91.
347. Shimizu K1, Sato M, Tabata T. The Wnt5/planar cell polarity pathway regulates axonal development of the *Drosophila* mushroom body neuron. *J Neurosci.* 2011; 31(13):4944-54.
348. Mrkusich EM1, Flanagan DJ, Whittington PM. The core planar cell polarity gene *prickle* interacts with *flamingo* to promote sensory axon advance in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.* 2011; 358(1):224-30.
349. Zou Y. Does planar cell polarity signaling steer growth cones? *Curr Top Dev Biol.* 2012; 101:141-60.