

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'un nouvel
allèle du gène de la polarité cellulaire planaire (PCP)**

Vangl2

par Abdul-Rahman El-Hassan

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de M. Sc. en Neurosciences

Option générale

Septembre, 2017

Résumé

Les anomalies du tube neural (ATN) comme spina bifida, craniorachischisis et anencéphalie, constituent les malformations congénitales les plus communes qui touchent le système nerveux central. Malgré l'effet protecteur de l'acide folique dans 50-70% des cas, ces anomalies font toujours leur apparition dans 1 à 2 nouveau-nés par 1000 naissances. Plusieurs études montrent que les gènes de la voie de polarité cellulaire planaire (PCP) sont impliqués dans le développement embryonnaire comme la migration cellulaire et la convergence et extension. La souris Looptail (*Lp*) était la première mutante à impliquer un gène de la voie PCP, appelé *Vangl2*, dans la pathogenèse des ATN chez les mammifères. Dans la présente étude, nous avons investigué une souris mutante de *Vangl2* appelée *Curly Bob* induite par mutagenèse chimique à l'Ethyl-Nitroso-Urée (ENU). La mutation faux-sens induit un changement de l'acide aminé à la position I268 de la protéine *Vangl2*. Cette mutation est de nature héréditaire semi dominante chez les souris hétérozygotes ayant comme caractéristiques phénotypiques, une queue bouclée, un secouement de tête et un 'comportement de tours en ronds'. Nous avons aussi remarqué qu'un faible pourcentage de femelles hétérozygotes ne développe pas d'ouverture vaginale. Les embryons homozygotes développent une forme sévère d'ATN et des défauts de PCP sévères dans les cellules ciliées de la cochlée et du système vestibulaire. Cette mutation interagit génétiquement avec l'allèle *Lp* (*Vangl2*^{S464N}) dans le développement du tube neural et la polarité des cellules ciliées de l'oreille interne. Le niveau d'expression de la variante de *Vangl2*^{I268N} mutée chez les homozygotes est bas dans les tissus du système nerveux analysés. Cette mutation affecte aussi l'interaction de *Vangl2* avec *Dishevelled3*.

La nouvelle mutante décrite dans cette étude, constitue un modèle important afin de disséquer plus précisément le rapport structure-fonction de *Vangl2* dans le développement du tube neural et l'établissement de la polarité dans les cellules sensorielles de l'oreille interne.

Mots-clés : anomalies du tube neural, *Vangl2*, polarité cellulaire planaire, cellules sensorielles de l'oreille interne.

Abstract

Neural tube defects (NTDs) including spina bifida, craniorachischisis as well as anencephaly are the most common group of congenital malformations of the central nervous system (CNS). Folic acid recommendations for pregnant women as well as fortification of several foods with folic acid have significantly reduced the incidence of NTDs. Still at least 1 to 2 newborns per 1000 births have NTDs. Several studies have searched for possible genetic factors that could predispose for NTDs. Planar cell polarity (PCP) genes are known to be implicated in important developmental processes, like cell migration and convergent extension. The Looptail (*Lp*) mutant mouse was the first mutant to link a PCP core member, called *Vangl2*, to the pathogenesis of NTDs in mammals. In this report, we have studied a novel *Vangl2* mouse mutant induced by Ethyl-Nitrosourea (ENU). This mouse called *Curly Bob* harbors a missense mutation in *Vangl2* and causes a change of the amino acid residue I268 in Vangl2 protein. This autosomal mutation segregates in a semi-dominant fashion with heterozygous mice displaying a looped tail appearance, bobbing head and a circling behavior. We also noticed that a small portion of affected females have an imperforate vagina. Homozygote mutant embryos suffer from a severe form of NTD called craniorachischisis and do not survive after birth. They also display severe PCP defects in the inner hair cells of the cochlea and posterior cristae. This mutant genetically interacts with the *Lp* allele (*Vangl2*^{S464N}) in neural tube development and inner ear hair cell polarity. The Vangl2^{I268N} protein variant is expressed at very low levels in affected neural tissues of mutant homozygous embryos. This mutant protein no longer physically interacts with another PCP core protein DVL3.

Keywords: neural tube defects, planar cell polarity, *Vangl2*, inner ear hair cells

Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS.....	XIV
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. DÉFINITION DES ANOMALIES DU TUBE NEURAL (ATN).....	1
1.2. EMBRYOGÉNÈSE	1
1.2.1 CLIVAGE	1
1.2.2 GASTRULATION	3
1.2.2 ORGANOGÉNÈSE : FORMATION DU TUBE NEURAL.....	6
1.2.2.1 Neurulation primaire:	6
1.2.2.2 Neurulation secondaire:	12
1.2.2.3 Points d’initiation de fermeture du tube neural :.....	14
1.2.2.4 Anatomie du Système nerveux central (SNC):.....	15
1.3. ANOMALIES DU TUBE NEURAL (ATN)	16
1.3.1 LES ATN CRÂNIALES:.....	17
1.3.2 LES ATN CRÂNIO-SPINALES:	17
1.3.3 LES ATN SPINALES :	18

1.4. DIAGNOSTIC ET MÉTHODES DE DÉPISTAGE ANTÉNATAL DES ATN.....	20
1.4.1 DOSAGE DE L'ALPHA-FOETO-PROTÉINE SÉRIQUE MATERNELLE (AFPSM)	20
1.4.2 EXAMENS ÉCHOGRAPHIQUES	21
1.4.3 AMNIOCENTÈSE.....	21
1.4.4 DOSAGE DU TAUX DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE (ACHE)	22
1.5. ÉTIOLOGIE DES ATN	22
1.5.1 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	22
1.5.1.1 Carence en micronutriments:.....	22
1.5.1.2 Prise de médicaments: <i>Anticonvulsivants</i>	25
1.5.1.3 Conditions métaboliques:.....	26
1.5.2 FACTEURS GÉNÉTIQUES.....	27
1.5.2.1 Mutations des gènes reliés au métabolisme et transport du folate:.....	28
1.5.2.2 Mutations dans les gènes de la voie PCP :.....	29
1.6. LA SIGNALISATION WNT	31
1.6.1 VOIE DE SIGNALISATION CANONIQUE (B-CATÉNIQUE DÉPENDANTE)	31
1.6.2 VOIE DE SIGNALISATION WNT NON CANONIQUE (INDÉPENDANTE DE B-CATÉNIQUE)	33
1.6.2.1 Voie de signalisation Wnt/polarité cellulaire planaire (PCP):.....	33
1.6.2.2 Voie de signalisation Wnt/Ca ²⁺	37
1.7. LA SOURIS COMME MODÈLE DANS L'INVESTIGATION DE LA GÉNÉTIQUE COMPLEXE DES ATN HUMAINS.	38
1.8. <i>LOOPTAIL</i>.....	39
<u>2. PROBLÉMATIQUE ET PERTINENCE:.....</u>	41
2.1. PROBLÉMATIQUE	41
2.2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	41
2.3. PERTINENCE ET RETOMBÉS SCIENTIFIQUES	42
<u>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES:.....</u>	43
3.1. MAINTIEN DES SOURIS:	43
3.2. IDENTIFICATION DE LA MUTATION CHEZ LA SOURIS <i>CURLY BOB</i>:.....	43
3.3. GÉNOTYPAGE DES SOURIS:	44

3.3.1 SOURIS <i>CURLY BOB</i>	45
3.3.2 SOURIS <i>LOOPTAIL</i>	45
3.4. PHÉNOTYPAGE ET COMPLÉMENTATION DE <i>CURLY BOB</i> AVEC <i>LOOPTAIL</i>:	46
3.5. IMMUNO- BUVARDAGE DE TYPE WESTERN:	46
3.6. SYSTÈME DOUBLE-HYBRIDE CHEZ LA LEVURE	48
3.7. IMMUNOHISTOCHEMIE SUR DES SECTIONS DU TUBE NEURAL:	49
3.8. IMMUNOHISTOCHEMIE SUR LES CELLULES CILIÉES DE LA COCHLÉE ET DE L'AMPOULE POSTÉRIEURE:	50
<u>4. RÉSULTATS:.....</u>	<u>52</u>
4.1. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU MUTANT <i>CURLY BOB</i>:.....	52
4.2. ÉTUDES PHÉNOTYPIQUES DU MUTANT <i>CURLY BOB</i> :	54
4.3. EFFET DE LA NOUVELLE MUTATION SUR L'EXPRESSION DE <i>VANGL2</i> DANS LE TISSU EMBRYONNAIRE :	55
4.4. ÉTUDES D'INTERACTION PHYSIQUE ENTRE <i>VANGL2</i>^{1268N} ET DES PROTÉINES DE LA VOIE PCP :	58
4.5. ÉTUDES D'INTERACTION GÉNÉTIQUE ENTRE <i>CURLY BOB</i> ET <i>LOOPTAIL</i> :	58
<u>5. DISCUSSION:</u>	<u>64</u>
5.1. <i>CURLY BOB</i> REPRÉSENTE UN NOUVEL ALLÈLE DE <i>VANGL2</i>	64
5.2. <i>VANGL2</i>^{1268N} NE SE REND PAS À LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	66
5.3. <i>VANGL2</i>^{1268N} AFFECTE L'INTERACTION DE <i>VANGL2</i> AVEC <i>DVL3</i>	67
<u>6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :.....</u>	<u>69</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>I</u>

Liste des tableaux

Tableau I. Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de <i>mVangl2</i>	44
Tableau II. Étude de génotype-phénotype des croisements <i>Curly Bob</i> et <i>Curly Bob X Looptail</i>	55

Liste des figures

Figure 1. Origine du développement des structures extra-embryonnaires chez la souris.....	1
Figure 2. Étapes de migration et de différenciation du zygote	3
Figure 3. Embryon tri-blastique vue du haut avec les cellules de l'épiblaste en train de migrer vers la ligne primitive et le nœud de Hensen.....	5
Figure 4. Une section longitudinale du disque tri-blastique en gastrulation.....	5
Figure 5. Shh sécrété par la notochorde avec un effet ventralisant du tube neural.....	8
Figure 6. Fermeture du tube neural et formation des points d'articulation médian (MHP) et dorsolatéraux (DLHP).....	9
Figure 7. Convergence et extension.....	11
Figure 8. Neurulation primaire et secondaire.....	13
Figure 9. Sites d'initiation de fermeture du tube neural	15
Figure 10. Développement de l'encéphale et de la moelle épinière à partir du tube neural chez les vertébrés	16
Figure 11. Un schéma qui représente divers types d'ATN crânielles et spinales	20
Figure 12. Voie de signalisation canonique de Wnt	33
Figure 13. Plusieurs voies de signalisation non canonique de polarité cellulaire planaire (PCP) présentées dans un schéma simplifié	36
Figure 14. Schéma illustrant la méthode de mesure des angles des cellules ciliées de l'Organe de Corti et du système vestibulaire.	51
Figure 15. Identification de la mutation p. Ile268Asn dans Vangl2 chez la souris Curly Bob.	53
Figure 16. Études de phénotype et morphologie du développement du tube neural chez les hétérozygotes Vangl2^{+/I268N} et hétérozygotes composites Vangl2^{I268N/S464N}.	56
Figure 17. La mutation p. Ile268Asn affecte le niveau d'expression de Vangl2 et son interaction physique avec DVL3.	57
Figure 18. Une analyse de l'orientation des cellules ciliées de la cochlée chez les mutants de Vangl2^{I268N} et les hétérozygotes composites Vangl2^{I268N/S464N}.	61

Figure 19. Analyse de l'orientation des cellules ciliées de l'ampoule postérieure chez les mutants de *Vangl2*^{I268N} et les hétérozygotes composites *Vangl2*^{I268N/S464N}..... 64

Liste des abréviations

AChE	Acétyl-choline estérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFPSM	α -foeto-protéine sérique maternelle
ARN	Acide ribonucléique
BMP	Bone morphogenetic proteins
CE	Convergence et extension
DAG	Diacylglycérol
DD	Domaine dorsal (dorsal domain)
DDO	Double dropout
DLHP	Points d'articulation dorso-latéraux (dorso-lateral hinge points)
Dvl	Dishevelled
ENU	Ethyl-nitroso-urée
Fmi	Flamingo
Fgf	Facteur de croissance des fibroblastes
Fz	Frizzled
GSK3 β	Glycogène synthase kinase-3 beta
IP ₃	Inositol-triphosphate
Lp	Looptail (Vangl2 ^{S464N})

LRP6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
MCI	Masse cellulaire interne
MDCK	Cellules Madin-Darby Canine kidney cells
MHP	Points d'articulation de la charnière médiane (medio-lateral hinge point)
pb	Paires de bases
PCP	Polarité cellulaire planaire
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDE	Phosphodiesterase
Pk	Prickle
PLC	Phospholipase C
PP	Plaque du Plancher (floor plate)
PT	Plaque du toit (roof plate)
PVDF	Membrane de difluorure de polyvinylidène
QDO	Quadruple dropout
RA	Acide rétinoïque
Shh	Sonic-Hedgehog
Stn	Starry night
TCF	Facteurs de lymphocytes T
TDO	Triple dropout

*Ce travail est dédié à toutes les familles
affectées par cette maladie*

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir facilité tout dans ma vie afin que je puisse finir ce projet. Puis ma directrice de recherche Zoha Kibar, qui m'a accepté dans son laboratoire. J'apprécie son soutien moral au début du projet et par la suite ses encouragements pendant toutes les périodes difficiles de la maîtrise.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire pour la gentillesse qu'ils ont eu envers moi lorsqu'on m'apprenait une technique ou autre. Baptiste Coutaud qui m'a appris les techniques de bases utilisées dans le laboratoire. Je remercie aussi Fares Kharfallah pour m'avoir appris à faire des IF et son énorme contribution dans l'essai de Y2H. Je remercie Marie-Claude Guyot pour toute sa contribution dans le séquençage de *Vangl2*. Aussi je n'oublie pas Samir Bouasker pour toutes les discussions qu'on a eus et les conseils qu'il m'a donnés. Je remercie Frédéric Ancot aussi pour m'avoir appris les bases du "Western Blot".

Je remercie ma mère Barea Derbas et ma sœur Reem El-Hassan pour leur support et encouragements continuels. Je les remercie aussi pour avoir pu me supporter pendant tout ce temps. Je remercie mon père Ali El-Hassan pour son amour et encouragements même si j'étais loin de lui pendant toute cette période.

Je tiens à remercier mes amis précieux Mustapha Benaissa, Raefat El-Jammal et Omar Mogharbel, qui ont rendu ma vie joyeuse à cause de leur amitié.

Finalement, je remercie les organismes subventionnaires; CIHR et NSERC qui ont financé le projet.

1. Introduction

1.1. Définition des anomalies du tube neural (ATN)

Les anomalies du tube neural (ATN) sont des maladies congénitales qui surviennent lors d'un défaut de fermeture de celui-ci entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire. La prévalence de ces anomalies peut varier énormément touchant entre 1 et 14 personnes sur 1000 naissance, et ce dépendamment du pays¹⁻⁵. La prévalence au Canada entre 1998 et 2000 après la fortification en acide folique était de 1,29 alors qu'en 1997 elle était 1,89 par 1000 naissances⁶. Les types d'ATN les plus communs sont l'anencéphalie, la spina bifida et l'encéphalocèle.

1.2. Embryogénèse

1.2.1 Clivage

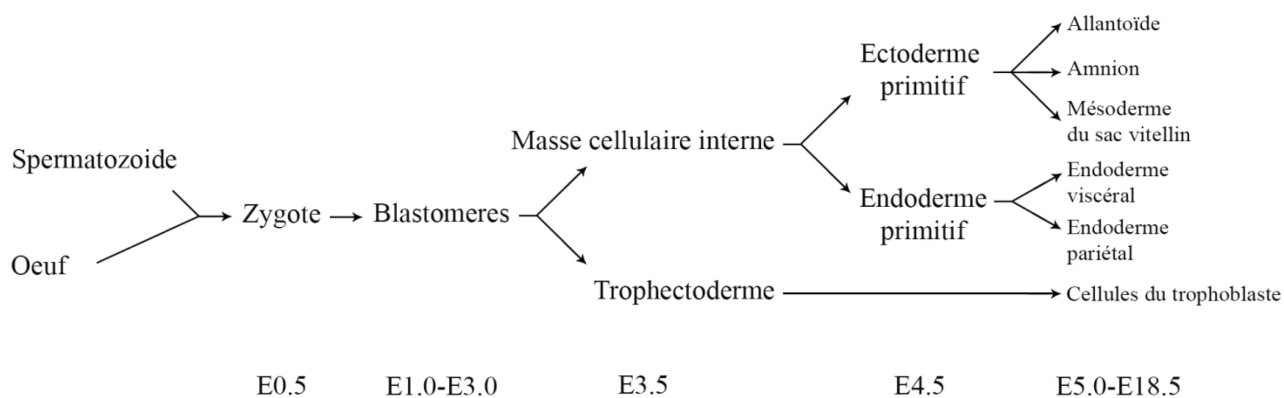


Figure 1. Origine du développement des structures extra-embryonnaires chez la souris. Adapté de Lanza R et al. (2009)⁷.

La segmentation ou clivage, représente la première étape dans l'embryogénèse et suit la fécondation de l'œuf et la formation du zygote (Figure 1; page 1). C'est un processus de mitoses successives qui augmentent le nombre de cellules (ou blastomères) dans l'œuf fécondé sans changer le volume de ce dernier⁸. Arrivé au stade de 16 cellules on appelle celui-ci une morula, cela correspond au quatrième jour après la fécondation⁹. La zone pellucide couvre l'œuf fécondé durant les premiers jours suivant la fécondation pendant qu'elle est dans la trompe utérine afin de prévenir une implantation prématurée¹⁰ (Figure 2; page 3).

Au cinquième et sixième jour, on assiste à la formation du blastocyste où les cellules périphériques commencent à se polariser. Au milieu, il se creuse une cavité qu'on appelle blastocèle et se remplit d'un fluide¹¹. Les cellules périphériques vont former le trophoblaste primitif (ou trophoctoderme), qui servira lors de l'implantation (nidation) de l'œuf fécondé⁷ (Figure 2; page 3). Les cellules les plus internes forment une petite masse qui adhère au pôle apical de l'œuf sur le trophoctoderme¹². Ces dernières auront le nom de Masse Cellulaire Interne (MCI). La MCI forme la cavité amniotique au cours du 8^{ième} jour post-fécondation, peu après l'implantation dans l'endomètre¹³. En même temps l'épiblaste et l'hypoblaste apparaissent comme deux couches de cellules non stratifiées (disque bilaminaire) en dessous de la cavité amniotique. C'est là que la gastrulation aura lieu.

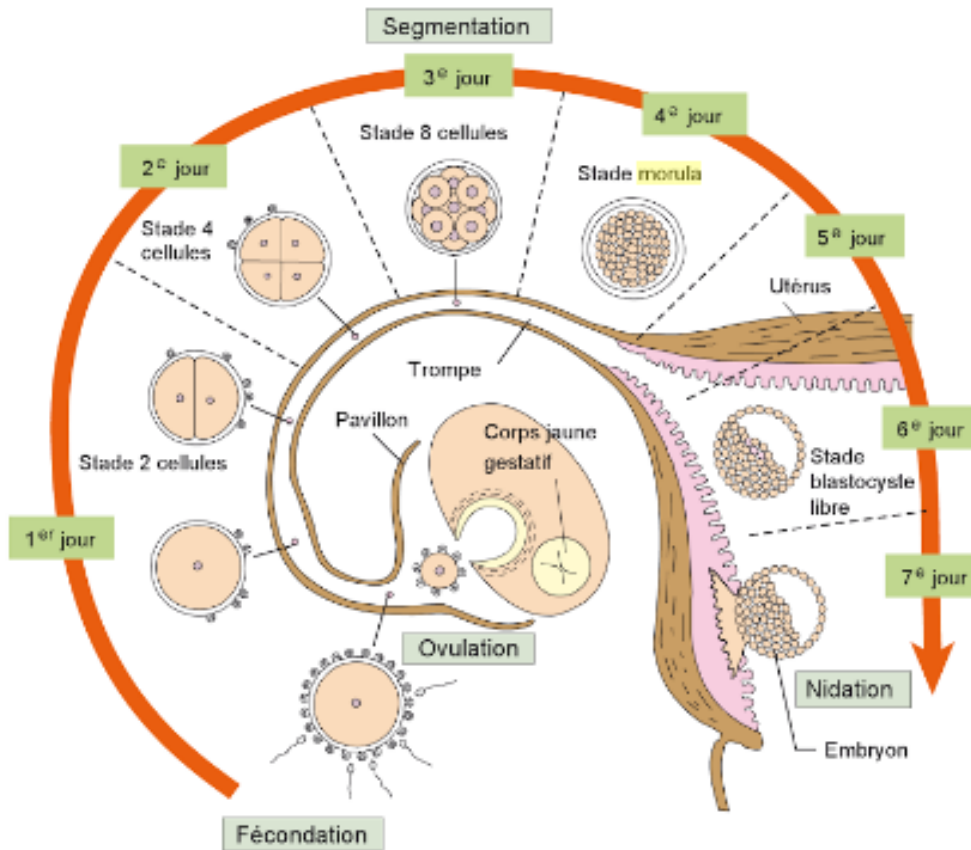


Figure 2. Étapes de migration et de différenciation du zygote. Tirée de *Richard D et al.* (2015)¹⁴.

1.2.2 Gastrulation

La gastrulation est l'étape où l'embryon subit des changements profonds et des mouvements morphogénétiques¹⁵. Elle sert à former l'embryon et les structures essentielles qui le soutiennent pendant la grossesse, par des mouvements, réarrangements et différenciations cellulaires⁸. C'est la période de développement pendant laquelle se mettent en place les trois feuilletts fondamentaux de l'embryon à partir de l'épiblaste (Figure 3; page 5):

Ectoblaste : Couche la plus externe et qui est à l'origine de plusieurs types de cellules et tissus, comme par exemple, mélanocytes qui dérivent des cellules de la crête neurale, épiderme et système nerveux.

Mésoblaste : Couche intermédiaire qui donne naissance aux os, cartilage du squelette, muscles (lisse et squelettique strié), système cardiovasculaire et lymphatique et structures d'origine mésodermique.

Endoblaste : Couche la plus interne qui est à l'origine du tube gastro-intestinal et du système respiratoire. Les glandes et cellules glandulaires des organes associés au système gastro-intestinal, comme foie et pancréas, se développent à partir de l'endoderme aussi¹⁵.

Les cellules épiblastiques vont commencer à converger et migrer pour former un épaissement au bout postérieur du disque qui produira le nœud primitif (Nœud de Hensen), la ligne primitive. Ces derniers se creuseront en gouttière primitive et sillon primitif¹⁶. Le sillon primitif consistera en une population de cellules en continuel changement. Il sert de passage et de transition pour les cellules épiblastiques en migration pour devenir des futures cellules endodermiques et mésodermiques¹⁷. Le nœud, sillon et gouttière apparaissent au début dans le côté postérieur de l'embryon et continueront à migrer en direction caudo-rostrale¹⁸. Au 19^{ième} jour, le Nœud de Hensen induit la formation de la plaque chordale par invagination des cellules épiblastiques (Figure 3, 4; page 5). La plaque chordale se transformera plus tard en notochorde et induira la formation de la plaque pré-chordale au niveau rostral¹⁸.

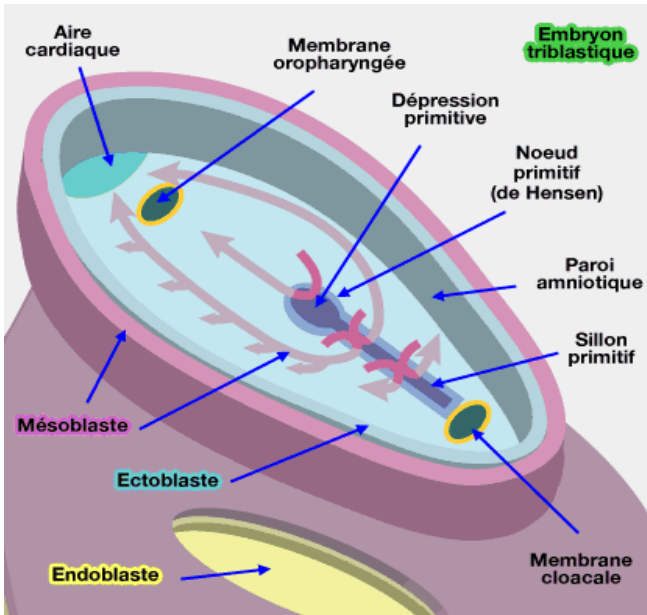


Figure 3. Embryon tri-blastique vue du haut avec les cellules de l'épiblaste en train de migrer vers la ligne primitive et le nœud de Hensen. Tiré de Mauriès JP (2017)¹⁹.

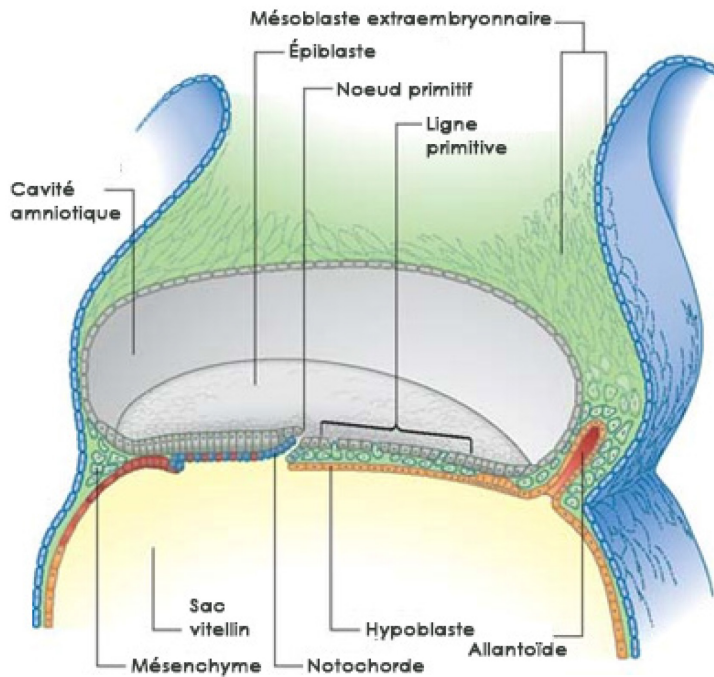


Figure 4. Une section longitudinale du disque tri-blastique en gastrulation. Les cellules de l'épiblaste passent par la ligne primitive et forment le mésoblaste, la notochorde se forme de la même façon mais au niveau du Nœud de Hensen. Adapté de *Standring S.* (2015)²⁰.

1.2.2 Organogénèse : formation du tube neural.

1.2.2.1 Neurulation primaire:

Cette étape arrive à la fin de la 3^{ème} semaine de grossesse (post-fécondation) chez les humains, ce qui correspond à 8.5 jours embryonnaires chez les souris²¹. Au 18^{ème} jour, le mésoderme chordal, la notochorde et la plaque pré-chordale, envoient des signaux qui vont induire la transformation de l'ectoderme sus-jacent, transformant un épithélium simple pavimenteux, en une plaque neurale avec un épithélium simple cylindrique (ou prismatique) pseudo-stratifié^{8, 22, 23}. Cette plaque neurale est large du côté antérieur où se formera la partie crâniale alors qu'elle est serrée du côté postérieur pour former la future moelle épinière de l'embryon. La notochorde et le mésoderme envoient des signaux qui induisent la formation de la plaque neurale. Des molécules antagonistes aux BMPs comme Noggin (pour BMP4), Follistatine (pour BMP4, BMP6 et BMP7)^{24, 25} et Chordin (qui se lie directement aux BMP pour prévenir leur liaison aux récepteurs)²⁶ secrétées par le mésoblaste axial sous-jacent inhiberont l'action des BMP sur l'épiderme pour assurer sa différenciation en plaque neurale^{27, 28}. *Noggin* n'est pas essentielle dans cette induction alors qu'elle est indispensable pour le développement normal et l'établissement du tube neural et des somites chez la souris²⁷.

Le tube neural est maintenant prêt pour la fermeture (Figure 6; page 9).

Deux types de processus morphogénétiques sont nécessaires pour la fermeture du tube neural :

La convergence-extension et la constriction apicale.

A. *Constriction apicale* :

Au niveau cellulaire, la formation des points d'articulation médian et dorsolatéraux est dépendante de la constriction apicale. Le neuro-épithélium étant initialement pseudostratifié,

les cellules qui formeront les futurs points d'articulation commencent à se rétrécir au niveau apical (Figure 6; page 9). Ce rétrécissement est causé par un réarrangement des molécules du cytosquelette, surtout l'actine. Shroom3 est capable de se lier à l'actine et causer cette constriction. Des souris avec un shroom3 défectueux (null) développent une exencéphalie (ATN sévère). La constriction apicale est accompagnée par un changement du côté basal de ces cellules où l'on voit que ce dernier devient plus large, aidé par un changement de la position du noyau vers le côté basolatéral. Cet allongement des cellules de l'MHP, accompagné d'une constriction apicale, est induit même si tous les tissus qui entourent ces cellules sont enlevés, tant que la notochorde est présente. Ceci démontre que la formation des MHP est dépendante seulement des signaux envoyés par la notochorde et ne dépend aucunement d'une pression mécanique générée par l'élévation des replis neuraux.

Signalisation “ventralisante” :

Les molécules morphogénétiques Shh induisent la formation du point d'articulation médian (MHP) de façon parallèle à la formation de la gouttière neurale et l'élévation des bourrelets neuraux appelés ensuite, replis neuraux. Ces molécules provenant de la notochorde induisent la formation de la plaque du plancher (PP, floor plate) du tube neural.

Shh est exprimé au début par la notochorde, qui se trouve dans le côté ventral du futur tube neural (Figure 5; page 8). Ce gène induit l'expression de Foxa2 en dessus de la notochorde. Cette molécule est capable d'induire à son tour l'expression de Shh dans la plaque du plancher prospective. Les cellules de la PP commencent à sécréter Shh à leur tour²⁸. Étant une molécule morphogénétique, une haute concentration en Shh stimule la formation de domaines ventraux avec des marqueurs spécifiques comme Nkx2.2 dans les cellules du V3. Alors qu'une diminution du signal Shh en s'éloignant de la PP vers le côté dorsal, combinée avec une

concentration élevée de molécules BMP sécrétées par la plaque du toit (PT, roof plate) et l'ectoderme, stimule le développement des domaines dorsaux (DD).

D'autres molécules comme les facteurs de croissance des fibroblastes (Fgf) et l'acide rétinoïque (RA) sont sécrétées par la notochorde et auraient un effet similaire à Shh (ventralisation du tube neural)²⁹. En même temps, l'élévation des extrémités latérales de la plaque neurale va former la gouttière neurale et les replis neuraux³⁰. Les replis neuraux (ou bourrelets) commencent à s'approcher l'un de l'autre mais ne seront pas capables de se rejoindre sans la formation des DLHP (Figure 6; page 9). La formation des DLHP est surtout essentielle dans la partie médiane et caudale de la plaque neurale³¹. Elle n'est pas formée dans la partie antérieure (les BMP et Shh inhibent la formation de DLHP dans cette partie et cette inhibition est surtout dûe au fait que Noggin n'est pas exprimé pour antagoniser l'effet des BMP). Le point d'articulation de la charnière médiane (MHP) ne se forme pas dans la partie caudale puisque Shh n'est pas exprimé dans cette région³².

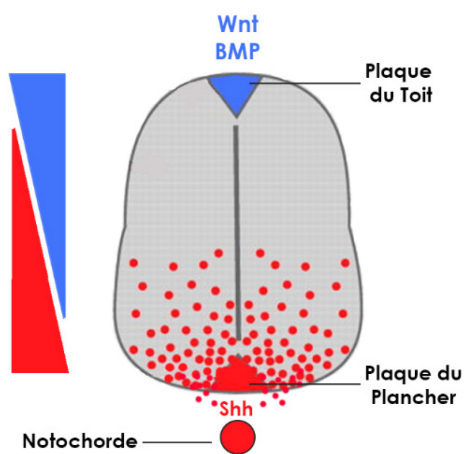


Figure 5. Shh sécrété par la notochorde avec un effet ventralisant du tube neural.

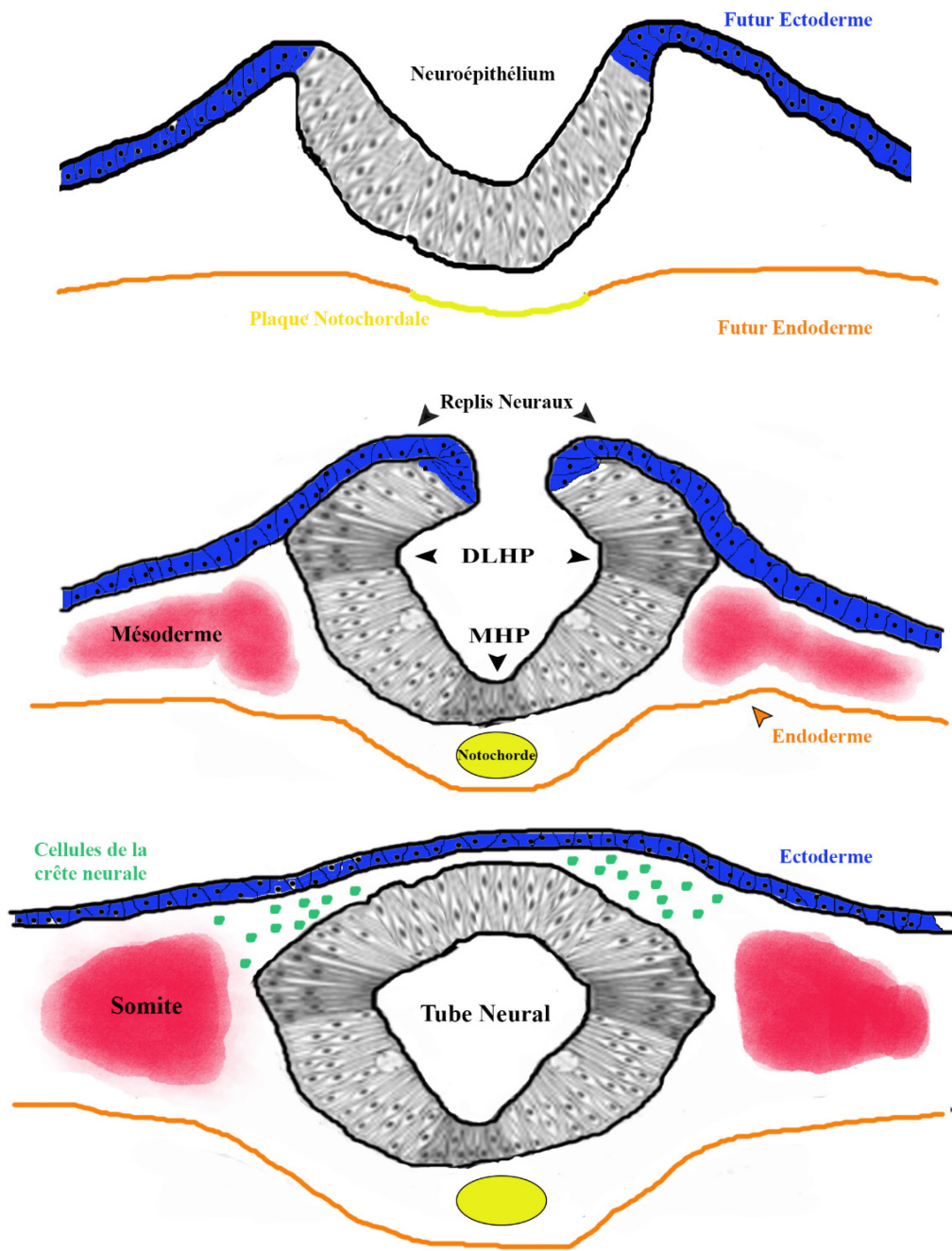


Figure 6. Fermeture du tube neural et formation des points d'articulation médian (MHP) et dorsolatéraux (DLHP).

B. *Convergence et extension* : Ce mécanisme est l'un des phénomènes les plus importants afin d'accomplir la fermeture du tube neural suite à l'élévation des replis neuraux et la constriction apicale. Les cellules neuro-épithéliales d'un bord de la plaque neurale commencent à s'intercaler avec les cellules de l'autre bord de façon perpendiculaire à l'axe d'extension antéro-postérieur⁸. Ce processus implique un rétrécissement de l'axe médio-latéral et un allongement (extension) de l'axe antéro-postérieur²⁸ (Figure 7; page 11). La CE est régulée par la voie de signalisation Wnt non canonique appelée aussi la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) (discuté en détails dans la section **1.6.2**).

Une fois qu'il y a un contact, le côté ectodermique du premier repli neural se dissociera du côté neuro-ectodermique et s'unira avec la partie ectodermique du deuxième repli neural. Cette dissociation fait en sorte que les extrémités latérales de la plaque neurale se touchent et les cellules s'intercaleront pour former un tube primitif unicellulaire (Figure 6; page 9).

Signalisation “dorsalisante” :

La dorsalisation du tube neural requiert aussi des protéines de signalisation comme les BMPs et Wnt (*wnt-7a*)³³. Les BMP sont sécrétées par l'ectoderme dorsal nouvellement formé et sont capable d'induire la formation des cellules de la crête neurale et la PT^{29, 34}. Les cellules de la PT aussi secréteront à leur tour des BMPs qui induiront la différenciation de plusieurs types d'interneurones selon le gradient de BMP²⁸.

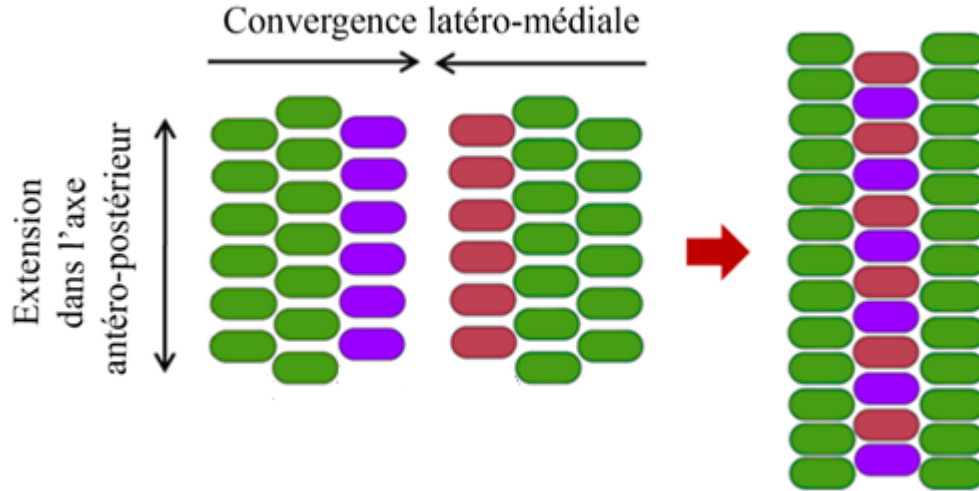


Figure 7. Convergence et extension, un mécanisme qui permet l'extension de l'axe antéro-postérieur suite à l'intercalation des cellules des deux replis neuraux par convergence latéro-médiale.

À part la tête, les cellules de la crête neurale se délaminent de la bordure neurale seulement après ou pendant la fusion des deux replis neuraux³⁵. Beaucoup de marqueurs de futures cellules de la crête neurale (comme *snail1*, *snail2* et *msx1*) ont été identifiés dans la région dorsale où s'accomplit la fusion des replis neuraux. Ces cellules entreprennent une migration à travers le corps de l'embryon et produisent de façon remarquable diverse types de tissus avec différentes propriétés. Les cellules de la crête neurale peuvent se transformer en neurones, cellules gliales des ganglions, cellules de Schwann qui entourent les nerfs périphériques, cellules pigmentaires, chromatophores et cellules musculaires (lisse)³⁶.

1.2.2.2 Neurulation secondaire:

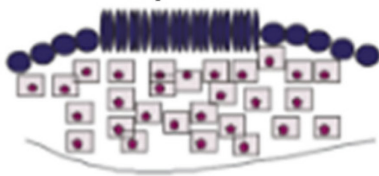
La neurulation secondaire, qui commence autour du 26^{ième} jour représente la différenciation de la partie caudale du tube neural, à partir de l'éminence caudale. L'étape s'accomplit sans passer par une étape intermédiaire qui est la plaque neurale³⁷ (Figure 8; page 13). Chez l'embryon du poulet, les cellules qui formeront l'éminence caudale et qui seront à l'origine de la neurulation secondaire se trouvent, près du nœud de Hensen de façon caudo-médiale³⁸ tôt dans le développement. Cette éminence caudale se forme autour du 20^{ième} jour dans l'embryon humain et apparaît comme une élévation. Elle sera à l'origine de plusieurs paires de somites (à partir des paires de somites 32 et 35 chez l'humain et la souris respectivement), de la partie caudale de la moelle épinière, la notochorde, des vaisseaux sanguins et cœlome.

Neurulation Primaire

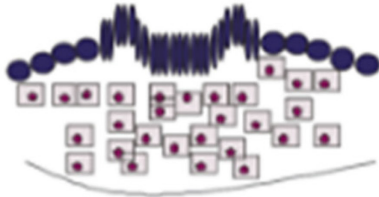
1. Épithélium simple



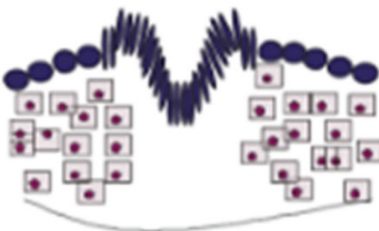
2. Épithélium simple cylindrique
Plaque neurale



3. Formation des replis neuraux



4. Fermeture de la gouttière neurale



5. Tube neural formé

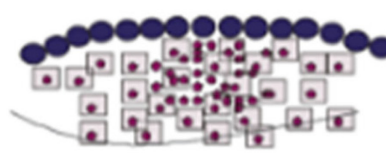


Neurulation Secondaire

1. Population de cellules du mésenchyme



2. Concentration des cellules



3. Formation du cylindre de mésenchyme



4. Transition épithéliale



5. Tube neural formé



Figure 8. Neurulation primaire et secondaire. Adapté de *Janigro. D* (2009)³⁹.

1.2.2.3 Points d'initiation de fermeture du tube neural :

La neurulation primaire chez les humains a été étudiée en utilisant des embryons humains post mortem^{37, 40, 41}. À vingt jours, on est capable de distinguer les 3 principales divisions du cerveau et la gouttière neurale est entièrement ouverte, deux jours plus tard on peut voir les replis neuraux qui commencent à se fusionner à la jonction entre le futur tronc cérébral et la future moelle épinière. Généralement, on décrit cette fermeture du tube neural chez les humains par un processus qui commence à la région du futur cou entre les 3^{ième} et 6^{ième} somites et puis procède de façon bidirectionnelle caudalement et rostralement comme une fermeture éclair. C'est le "modèle de fermeture continue". Ce processus finira lorsque les neuropores antérieur et postérieur seront complètement fermés. Ce modèle et le modèle de cinq sites proposés par Van Allen et al en 1993 (Figure 9b; page 15) ont été réfutés par plusieurs études comme celle de Nakatsu et al en 2000 où ils ont examiné des embryons humains (Centre de recherche sur les anomalies congénitales de Kyoto University) et ont proposé par la suite un modèle à trois sites d'initiation (Figure 9c; page 15).

Chez la souris, le premier point de contact et fusion entre les replis neuraux arrive à la jonction entre rhombencéphale et la moelle épinière (Figure 9a; page 15). Comme chez les humains, la fermeture continue dans deux directions, une rostralement et l'autre caudalement. Le deuxième site de fermeture commence à la bordure entre le prosencéphale et le mésencéphale, de la même façon elle poursuit dans les deux directions (Figure 9a). Un troisième site d'initiation se trouve plus rostralement sur la plaque neurale (Figure 9a).

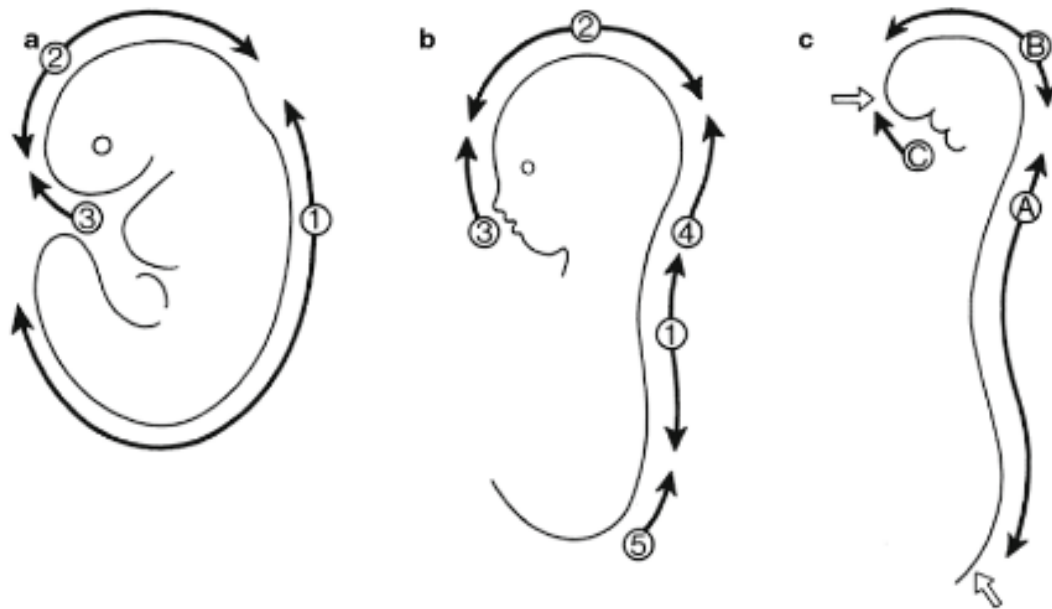


Figure 9. Sites d'initiation de fermeture du tube neural représentés de façon successive dans le temps chez la souris⁴¹, (b) le modèle de multi-fermeture chez l'humain⁴², (c) comme observé chez les humains⁴⁰. Les flèches vides dans (c) indiquent les neuropores antérieurs et postérieurs. Tirée de *Hans J et al (2014)*³⁷.

1.2.2.4 Anatomie du Système nerveux central (SNC):

Directement après la formation du tube neural, le système nerveux central commence à se subdiviser. La partie rostrale s'élargit alors que le reste du tube neural se différencie en moelle épinière. Cette partie rostrale se subdivise pour former les trois vésicules primaires, le prosencéphale (forebrain), le mésencéphale (midbrain) et le rhombencéphale (hindbrain) (Figure 10A, C; page 16). Ces trois vésicules vont se développer pour donner cinq autres⁴². Le prosencéphale va se subdiviser en télencéphale (qui formera les deux hémisphères cérébraux) et diencéphale (à partir duquel se formeront le thalamus et hypothalamus, de plus il formera les vésicules optiques par évagination, qui donneront naissance aux couches, neurale et pigmentaire de la rétine). Le mésencéphale ne se subdivise pas. Le rhombencéphale se

transformera en métencéphale et myélocéphale, des vésicules qui se différencient en cervelet et bulbe rachidien, respectivement (Figure 10B)⁴².

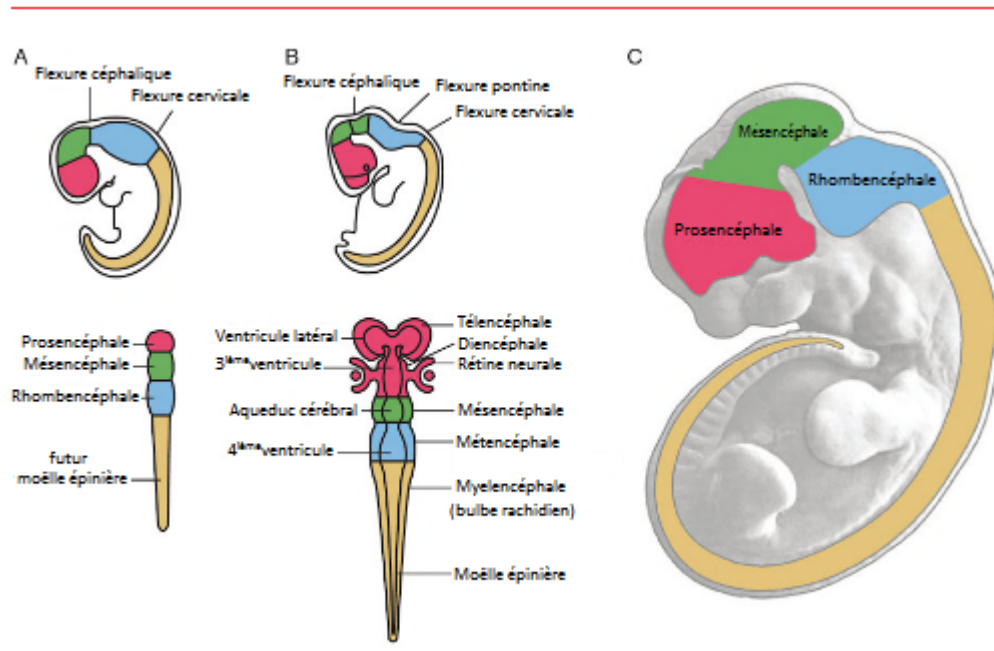


Figure 10. Développement de l'encéphale et de la moelle épinière à partir du tube neural chez les vertébrés. Adaptée de *Dan H. Sanes et al* (2011)⁴³.

1.3. Anomalies du tube neural (ATN)

La classification présentée ici se base sur la nature anatomique de l'anomalie. D'autres classifications peuvent prendre en considération l'origine embryologique de l'anomalie. Dans ce cas, les anomalies spinales peuvent se diviser en 3 catégories : 1-Anomalies de gastrulation; 2-Anomalies de neurulation primaire; 3-Anomalies de neurulation secondaire et de différenciation. Afin d'inclure cette information, l'origine connue de chaque anomalie listée sera citée dans la description.

1.3.1 Les ATN crânielles:

L'encéphalocèle est une ATN rare représentée par une masse de tissu cérébral en boule qui fait une protubérance dans le crâne, généralement du côté occipital du crâne (75% des cas; coté frontal: 25% des cas) (Figure 11; page 20). Le délai intellectuel et moteur est associé beaucoup plus aux cas d'encéphalocèle postérieurs. La quantité de tissu cérébral incluse dans la protubérance détermine le degré de dysfonctionnement cérébral. Si la déformation inclut un ventricule, l'hydrocéphalie est inévitable. L'augmentation de la pression peut des fois causer la rupture de la peau couvrant les tissus et une infection peut se développer.

L'anencéphalie est une ATN plutôt rare appelée aussi "cranioschisis", où les deux hémisphères cérébraux sont absents (Figure 11; page 20). Ces enfants ne survivent pas et meurent lors ou peu après leur naissance. Cette ATN survient quand le neuropore antérieur n'arrive pas à fermer au 26^{ième} jour post-fécondatoire.

1.3.2 Les ATN crânio-spinales:

La craniorachischisis est une forme rare d'anomalie mais la plus sévère des ATN, dans laquelle tout le tube neural reste ouvert (Figure 11; page 20). Le défaut de fermeture arrive au 22^{ième} jour post-fécondatoire pendant la neurulation primaire. Les enfants atteints naissent morts ou meurent peu après.

L'iniencéphalie est une des rares ATN retrouvées avec une incidence globale estimée entre 1/1000 et 1/100 000 naissances. Elle peut ressembler à un craniorachischisis. Elle est caractérisée par une ouverture à la jonction cervico-occipitale et l'absence totale ou partielle de vertèbres crânielles et thoraciques, l'absence du cou et une rétroflexion de la colonne

cervicale (Figure 11; page 20). Le pronostic est sévère et la survie est impossible dans la majorité des cas.

1.3.3 Les ATN spinales :

Le syndrome de régression caudale est le résultat d'un défaut de développement lors de la gastrulation. Même si cette anomalie est rare, elle est associée fréquemment au diabète maternel. Comme le nom l'indique, elle touche la partie inférieure de la colonne vertébrale et généralement associée à des degrés variables d'agénésie des vertèbres sacrées et coccygiennes.

La lipomyloméningocèle originaire d'un défaut de neurulation primaire, cette anomalie est semblable au lipoméningocèle, mais les cellules venant du mésoderme sont capables de migrer à partir des replis neuraux et se retrouvent dans la gouttière neurale. Ces cellules vont se différencier en une masse de cellules adipeuses couvertes par l'épiderme. Cette masse se déposera dans et par-dessus le tube neural et par conséquent, la dure mère ne se formera pas.

La lipoméningocèle est caractérisée par la présence d'une masse sous-cutanée de graisse, avec une hernie des méninges. Cette anomalie arrive lors de la neurulation primaire. Des cellules du mésoderme vont se situer entre les méninges et le tube neural nouvellement formé. Ces cellules vont se différencier en une masse de cellules adipeuse, couverte par l'épiderme et les méninges et vont appliquer une pression sur la moelle épinière. La dure mère ne se formera pas (Figure 11; page 20).

La myeloméningocèle ou spina bifida, originaire d'un défaut de neurulation primaire, elle est l'une des plus complexes anomalies du tube neural. Elle est aussi la forme la plus commune. L'anomalie inclut la peau, les muscles, les méninges, la moelle épinière, les ganglions nerveux et corps vertébraux, et touchant dans la majorité des cas la région lombaire-sacrée (Figure 11;

page 20). Elle peut aussi se trouver dans la région thoracique et plus rarement au niveau cervical. La mortalité qui peut être causée par une hydrocéphalie, une méningite et/ou un dysfonctionnement rénal, s'élève à 50% si la maladie reste non traitée. Une intervention est obligatoire pour assurer la survie de l'enfant. L'hydrocéphalie serait causée par une malformation Chiari de type II.

La méningocèle est une saillie des membranes (méninges) qui recouvrent la colonne vertébrale et une partie de la moelle épinière sans le tissu nerveux, qui résulte d'un défaut osseux dans la colonne vertébrale (Figure 11; page 20). Cette anomalie est causée initialement par un défaut durant la neurulation primaire. Par contre elle ne cause généralement pas de problèmes neurologiques. On peut la voir sous forme de sac rempli de fluide couvert par la peau.

Spina bifida occulta est une condition dans laquelle une ou plusieurs vertèbres sont malformées (Figure 11; page 20). Quelques signes sur le dos peuvent l'accompagner, comme une hyperpigmentation de la peau, une touffe de poils, une fossette ou même un lipome (petite masse de graisse). Dix à 15% de la population générale peut être affectée par cette malformation. Elle est généralement asymptomatique.

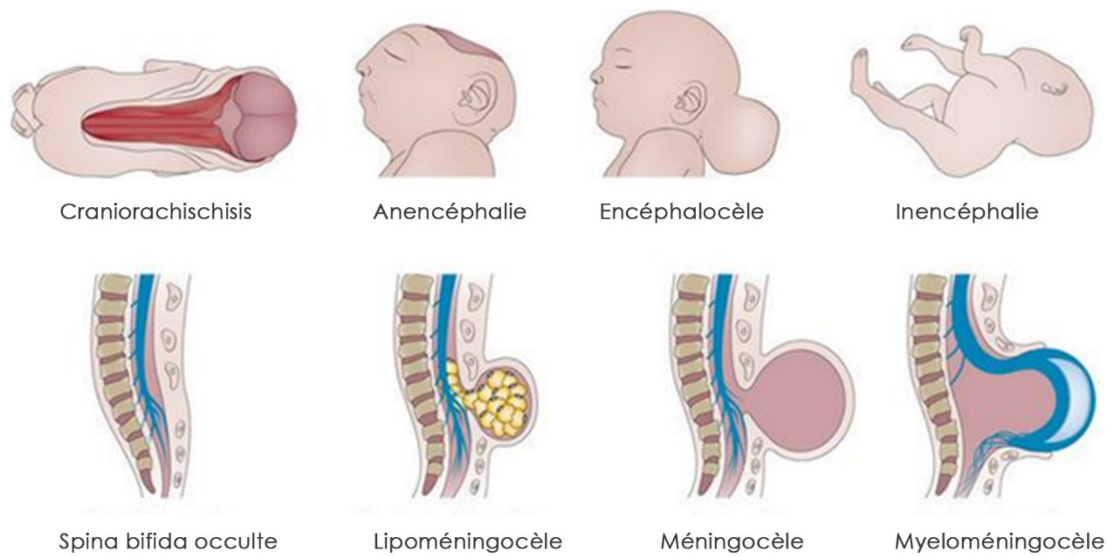


Figure 11. Un schéma qui représente divers types d'ATN crânielles et spinales. Adapté de Egan P. (2011)⁴⁴.

1.4. Diagnostic et méthodes de dépistage anténatal des ATN

Il est généralement recommandé pour les femmes enceintes de faire un dépistage (screening) prénatal entre les 15 et 22^{ième} semaines de gestation, pour maximiser la précision du test, minimiser le taux de faux-positifs et permettre un traitement optimal pour les grossesses affectées.

1.4.1 Dosage de l' α -Foeto-Protéine Sérique Maternelle (AFPSM)

Cette protéine est produite par le foie et le sac vitellin du fœtus en développement. Cette protéine peut être relâchée dans le fluide amniotique si l'embryon souffre d'une ATN ouverte. L'AFP peut maintenant passer dans le système sanguin maternel. Ce qui signifie que

si l'ATN est fermée il y aura beaucoup moins de chance de la détecter par cette méthode. Le résultat est considéré positif si le taux mesuré de la protéine, pendant le deuxième trimestre de la grossesse, est supérieur d'au moins deux fois et demi le taux normal d'AFPSM pour l'âge gestationnel auquel le prélèvement était fait⁴⁵.

1.4.2 Examens échographiques

Le diagnostic des ATN via ultrasons vient généralement après un test positif du DAFP sur le sérum sanguin maternel pendant le deuxième trimestre de grossesse. Les ultrasons sont capables de déterminer avec certitude, ou presque, si l'embryon est atteint d'une ATN⁴⁶. À moins qu'il y ait une incertitude via l'échographie, et qu'il y ait un risque que l'ATN soit cachée et difficile à voir, il n'est pas recommandé de faire une amniocentèse.

1.4.3 Amniocentèse

Cette procédure invasive ne doit pas être utilisée à moins qu'il ait eu un antécédent d'anencéphalie, de spina bifida, myeloméningocèle ou d'encéphalocèle ou que le taux d'AFPSM testé soit élevé. Le liquide amniotique est recueilli (20ml) par ponction à l'aiguille fine, à travers la paroi de l'abdomen et de l'utérus. Cela permettra de doser le taux d'AFP du liquide amniotique (AFPLA) qui sera anormalement élevé dans le cas où une ATN est présente⁴⁷. Le risque sur l'enfant à naître est élevé, raison pour laquelle il faudrait évaluer les risques et les avantages. Généralement on utilise cette méthode comme dernier recours (si par exemple les résultats par ultrasons sont négatifs).

1.4.4 Dosage du taux de l'acétylcholinestérase (AChE)

Ce test se fait sur le liquide amniotique chez les femmes à 14-23 semaines de grossesse. Si le taux d'AChE est plus élevé que 4,5munités/ml, le test est considéré positif. Il prédit la présence d'une ATN ouverte de façon meilleure que le test du taux d'AFP du liquide amniotique⁴⁸.

1.5. Étiologie des ATN

L'étiologie exacte des ATN n'est pas encore connue. Par contre, il existe des preuves qui impliqueraient plusieurs facteurs environnementaux et génétiques qui conduisent à l'apparition d'une ATN. La carence en acide folique, en myo-inositol et d'autres micronutriments, prise de médicaments, l'état de santé de la mère et des variantes génétiques, seraient des facteurs qui contribuent à un risque plus élevé.

1.5.1 Facteurs environnementaux

1.5.1.1 Carence en micronutriments:

Acide folique:

L'acide folique, aussi connu sous le nom de vitamine B₉, agit comme coenzyme dans la biosynthèse des précurseurs de purines et pyrimidines des acides nucléiques qui sont importants dans la synthèse de l'ADN chez le fœtus durant la grossesse⁴⁹. Il est considéré important pour le développement des globules rouges et blanches, pour le développement du SNC et pour la production de la méthionine, une acide aminée essentielle pour la méthylation. Le folate est important pour la biosynthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine et du 5-

CH₃-THF, une réaction catalysée par la méthionine synthase. Une déficience en acide folique peut causer des défauts dans la voie de signalisation métabolique du 1 carbone, ce qui peut engendrer une homocystéinémie⁵⁰.

La relation entre l'acide folique et les ATN est maintenant bien établie. Un grand nombre de recherches cliniques impliquent l'acide folique dans la prévalence des ATN. Surtout le fait qu'une supplémentation en acide folique dans la période périnatale diminue le risque d'ATN dans 50% à 70% des cas étudiés, rendant la maladie congénitale, évitable. L'étude de Milunsky A et al en 1989, a prouvé une réduction du risque d'ATN après supplémentation quotidienne en acide folique. Dans cette étude, 10 grossesses avaient une ATN parmi 10 713 femmes qui ont pris de l'acide folique avec des multivitamines alors qu'il y a eu 39 grossesses avec ATN sur 11 944 femmes qui ont pris des multivitamines sans acide folique. La réduction du risque était de 72%⁵¹. Une étude en particulier qui s'est penchée sur la récurrence des ATN et non l'occurrence (pas d'historique d'ATN) publiée en 1991,⁵² a joué un grand rôle sur la décision du CDC (Centre du contrôle et prévention des maladies) aux États-Unis, d'émettre des recommandations aux femmes concernant l'ingestion d'acide folique quotidienne (un minimum de 0,4 mg/jour pendant le premier trimestre de grossesse). D'autres études ont prouvé qu'un bas niveau-de-base en acide folique chez la femme la rendait plus susceptible de bénéficier de la supplémentation. Alors que, des femmes avec un haut niveau-de-base en acide folique en bénéficieraient moins⁵³.

Oman était le premier pays à avoir implémenté une fortification obligatoire en acide folique de 5mg par kg de farine blanche au niveau national en 1996 afin de réduire le risque des ATN⁵⁴. Les États-Unis l'ont suivi en implémentant la fortification en 1998 sur beaucoup de

produits à base de farine et de graines de céréales à 140µg/100g. Le Canada et Costa Rica ont aussi implémenté la fortification en 1998 de 150µg et 180µg/100g de farine respectivement⁵⁵. Jusqu'en 2013, il y avait 64 autres pays qui ont adopté la recommandation de la fortification obligatoire en acide folique. En Europe quelques pays ont adopté les recommandations mais ne les ont pas implémentés (Irlande et Royaume Uni)⁵⁴.

Myo-Inositol :

Le myo-inositol ou inositol est un facteur de croissance. Ce composé a été isolé à partir des muscles en 1850. Il s'agit d'un nutriment essentiel qui est membre du complexe des vitamines B. L'inositol joue un rôle clé dans le transport des lipides, métabolisme des lipides hépatiques, fonction de la membrane cellulaire, transmission nerveuse et l'activité des neurotransmetteurs. L'inositol lié au phosphate joue un rôle très important dans la signalisation cellulaire.

Des études chez les humains qui ont testé le niveau de myo-inositol maternel ont démontré un rôle pour ce dernier dans le développement d'un ATN chez l'embryon. Groenen PM et al, ont investigué le rôle de myo-inositol maternel sur l'apparition d'une spina bifida chez l'enfant. Ils ont trouvé que le niveau de myo-inositol maternel était 5% plus élevé chez les mères sans enfants avec spina bifida que chez les mères ayant un enfant atteint. Cette étude a aussi mesuré le taux de glucose et de zinc sur la même cohorte de mères ayant un enfant atteint et mères contrôles. Ils trouvent que les concentrations de glucose et de zinc étaient significativement plus élevées (7%) et significativement plus basses (5%) respectivement chez les mamans ayant un enfant atteint que chez les mamans contrôles⁵⁶.

Des études chez une souris modèle des ATN appelée *curly tail* ont démontré que ces souris sont sensibles à l'inositol mais résistantes à l'acide folique⁵⁷. Donc le myo-inositol pourrait être

un bon choix pour prévenir le développement d'ATN chez les individus résistants à l'acide folique. L'observation faite par l'équipe de Copp que la thérapie à l'inositol était bien tolérée chez les femmes en grossesse avec un grand risque de récurrence⁵⁸ encourage l'utilisation de cette molécule dans les programmes de prévention d'ATN.

Vitamine B12:

Quelques études chez les humains affirment qu'un bas niveau en holotranscobalamine (holoTC) (un indicateur sensible de la vitamine B12) dans le sérum maternel serait associé aux ATN résistants à la supplémentation en acide folique^{59, 60}.

1.5.1.2 Prise de médicaments: *Anticonvulsivants*

Ces médicaments peuvent être utilisés dans des applications autres que pour traiter l'épilepsie. Ils peuvent être utilisés pour des maux d'origine neuropathique, des désordres psychiatriques et même des migraines. Comme ces médicaments sont répandus et fréquemment utilisés, beaucoup de femmes souffrant d'une épilepsie ou non, ont été exposées à ces drogues. Déjà la grande majorité des femmes épileptiques en période de grossesse et qui doivent subir une thérapie aux anticonvulsivants, auront un enfant avec une malformation congénitale (risque d'avoir un enfant avec une malformation peut tripler chez ces femmes).

Acide Valproïque: Des études sur ce composé ont démontré que le risque d'avoir un enfant avec une ATN s'élève à 1 ou 2%. Le risque dans une population en général étant autour de 1 à 2 par 1000 naissance, le risque avec la prise de l'acide valproïque se multiplierait par 10⁶¹⁻⁶³.

Carbamazépine, ou CBZ, est aussi utilisée dans le traitement de l'épilepsie. Elle est considérée comme une drogue qui peut antagoniser l'effet de l'acide folique (inhibiteur de dihydrofolate réductase). La prise de la carbamazépine pendant la grossesse a été associée

avec l'apparition d'une ATN chez les enfants dans une étude de 1242 cas d'ATN et un groupe témoin avec ATN ayant eu une supplémentation en vitamines ⁶⁴ (incluant l'acide folique).

Phenobarbital, primidone et phénytoïne: Utilisés premièrement comme médicament antiépileptiques, toutes ces drogues avec l'acide valproïque sont des composés qui peuvent déréguler le métabolisme de l'acide folique (antagonistes). Une étude faite par Hernandez Diaz et al., trouve que même une supplémentation quotidienne en acide folique de 0.4mg n'a pas d'effet dans la diminution du risque de développer une ATN chez des mères qui utilisent ces drogues (valproate, phénobarbital, primidone et phénytoïne), par comparaison avec les mères qui ont eu la même supplémentation mais ont utilisé d'autres antagonistes de l'acide folique (comme aminoptérine, méthotrexate, sulfasalazine, pyriméthamine, triamterene, et trimethoprim)⁶⁴.

1.5.1.3 Conditions métaboliques:

Diabète: Même si le mécanisme par lequel une hyperglycémie chez la mère peut affecter la fermeture du tube neural n'est pas connue, un lien fort entre ces deux conditions est présent. Des études ont trouvé que le diabète affecte le développement du plexus choroïdien, le tube neural au niveau de la moelle épinière dans l'embryon de la souris. D'autres études proposent un modèle qui lie le sous-développement du plexus choroïdien avec une diminution dans la production de liquide céphalorachidien (LCR) ⁶⁵. Le LCR étant important dans la survie des cellules du neuro-épithélium et la prolifération de ces cellules, il peut affecter l'expression des gènes de la partie mésencéphalique du tube neural^{66, 67}. Le diabète maternel peut aussi induire une hypoxie et par la suite un stress oxydatif. Une étude sur ce stress oxydatif trouve qu'il est capable d'induire des défauts dans l'expression de beaucoup de gènes. Par exemple,

l'expression de *Pax3* chez la souris se trouve inhibée lors d'un stress oxydatif induit par une augmentation du taux de glucose dans le sang ⁶⁸. *Pax3* étant un stabilisateur (inhibiteur) des niveaux d'expression de p53 (gène de suppression tumorale), la diminution de son expression se traduit par une augmentation de l'expression de p53, induisant une augmentation de l'apoptose neuroépithéliale ⁶⁸. Cette apoptose non régulée peut causer une ATN.

1.5.2 Facteurs génétiques.

Les preuves sur la présence d'une partie génétique qui contribue à l'apparition des ATN peuvent inclure : a) la présence d'une association avec des anomalies chromosomique (i.e. trisomie 13) ou des syndromes génétiques (i.e. syndrome de Meckel), b) un risque plus élevé d'avoir un deuxième enfant affecté par un couple qui a déjà eu un enfant affecté d'une ATN (3 à 5 fois) et c) l'occurrence de cas dans des familles, qui ne suivent pas une hérédité de type mendélienne^{69, 70}. Ces modèles de transmission héréditaire et les risques de récurrence pour ces anomalies congénitales dans la famille ont été suggérés à suivre un modèle de seuil multifactoriel avec une variable continue dans la population qui peut dépasser un niveau critique durant le développement et causer une anomalie chez l'individu. L'héritabilité des ATN est estimée à 60% avec plusieurs gènes de susceptibilité; par contre le nombre, l'identité et la contribution relative de ces gènes dans l'apparition d'une ATN spécifique demeure inconnue⁷¹.

L'identification de gènes prédisposants à l'apparition d'une ATN chez l'homme par la méthode de clonage positionnel est difficile à cause de l'étiologie complexe et la rareté de grandes familles avec plusieurs individus affectés. Une étude de liaison pangénomique des ATN (Genome wide linkage screen) a identifié quelques régions candidates sur les

chromosome 2, 7 et 10; par contre, les résultats d'études de ce genre doivent être interprétés prudemment puisque plusieurs facteurs peuvent les rendre compliqués comme l'hétérogénéité génétique et la pénétrance variable⁷²⁻⁷⁴. Les études d'identification de gènes se sont concentrées généralement sur les gènes impliqués dans la voie de l'acide folique et sur des gènes candidats chez des modèles d'animaux⁷⁵.

Malgré qu'au-delà de 200 gènes jusqu'à présent ont été reliés à l'apparition d'une ATN, un bon nombre de facteurs génétiques étudiés jusqu'à présent peuvent être regroupés dans: 1) des mutations qui affectent le métabolisme et le transport du folate et 2) des mutations qui affectent la voie de signalisation PCP.

1.5.2.1 Mutations des gènes reliés au métabolisme et transport du folate:

L'enzyme *5,10-méthylène tétrahydrofolate reductase* (MTHFR) est importante dans la génération de 5-MTHF pour la méthylation de l'homocystéine en méthionine. Cette dernière peut être réutilisée dans la méthylation de substrats (ADN, ARN, protéines et lipides) suite à l'ajout d'une AMP par la méthionine adénosyl-transférase.

La mutation 677C>T (A222V; rs1801133) a été associée avec une augmentation du risque d'ATN dans les populations néerlandaise⁷⁶ et irlandaise⁷⁷. Mais l'effet de ce polymorphisme est dépendant d'autres facteurs qui pourraient être génétiques ou autre. Puisque chez les italiens, cette mutation se trouve à être associée avec un effet protecteur⁷⁸.

Dans le transport de l'acide folique, plusieurs mutations ont été associées avec le risque d'apparition d'une ATN, comme les récepteurs *FR α* , *FR β* et *FR γ* . Des mutations qui affectent d'autres récepteurs ont été investiguées mais les résultats d'augmentation du risque n'ont pas été reproduits^{79, 80}. Ceci prouve que beaucoup de facteurs génétiques inconnus peuvent

influencer le métabolisme de l'acide folique et que des études de plus grande envergure auront besoin d'être entreprises.

Dans le modèle murin, la souris *curly tail (ct)* a été étudiée extensivement pour la présence d'ATN spinales (ATN craniales dans ~5%) chez les embryons *ct/ct*. La mutation se trouve dans le gène *Grhl3*. Une déficience en inositol chez cette souris cause une augmentation de la pénétrance d'ATN craniales (~70%) et une augmentation de la concentration d'inositol peut corriger ces ATN. Cette mutante est par contre résistante à la supplémentation en acide folique⁸¹. Elle serait probablement utilisable dans des études qui visent à comprendre la raison pour laquelle des femmes peuvent toujours avoir un enfant atteint malgré la supplémentation en acide folique avant et pendant la grossesse.

1.5.2.2 Mutations dans les gènes de la voie PCP :

Chez la souris, des mutants de plusieurs gènes de la voie PCP, comme *Vangl2 (Looptail)*, *Celsr1 (crash)* et *Scrb1 (circletail)*, *Dishevelled1^{-/-}*, *Dishevelled2^{-/-}*, développent généralement une craniorachischisis chez les homozygotes et moins fréquemment une spina bifida chez les hétérozygotes.

Des études chez la grenouille trouvent que les embryons sont anormalement petits dans l'axe antéro-postérieur et que la plaque neurale est plus large dans l'axe médio-latéral lorsque l'expression de *dishevelled* est dérégulée⁸². Les mêmes observations ont été faites avec une dérégulation de *strabismus* chez la grenouille⁸³. Ces observations indiquent que ces gènes (de la voie PCP) sont cruciaux dans le processus de CE.

Mutations dans Vangl2:

Van Gogh (*Strabismus* ou *vangl*) est un gène principal de la voie PCP. Il code pour une protéine avec quatre domaines transmembranaires. *Strabismus* a été étudié au début chez la drosophile comme un gène important dans la polarité cellulaire planaire dans les cellules épithéliales des ailes.

Chez les vertébrés, deux orthologues de ce gène existent : *Vangl1* et *Vangl2*. Chez la souris Looptail (Lp), des mutations dans *Vangl2* ont été associées avec l'apparition d'ATN. Une mutation faux-sens (S464N) dans *Vangl2* est responsable du développement de craniorachischisis chez les homozygotes⁸⁴. D'autres mutations dans *Vangl2* ont été répertoriées grâce à la mutagenèse par ENU. La mutation *Vangl2*^{D255E} chez la souris Lp^{m1jus} a aussi le même effet que *Vangl2*^{S464N} chez les embryons homozygotes. De plus les souris hétérozygotes pour ces mutations peuvent avoir des complications comme l'infertilité chez les mâles et l'absence d'une ouverture vaginale chez les femelles (jusqu'à 50%). Chez les humains des mutations dans *VANGL1* et *VANGL2* ont été trouvées dans plusieurs cohortes de patients atteints d'une anomalie du tube neural⁸⁵⁻⁸⁷. Plusieurs de ces mutations ont été validées par la suite dans des essais fonctionnels (*VANGL2* : R177H, R270H, R353C et F437S et *VANGL1* : R181Q, R274Q), et ont montré un effet pathogénique sur l'interaction avec les protéines de la famille *Dishevelled*⁸⁵ et sur le transport de la protéine vers la membrane plasmique dans des cellules MDCK^{88, 89}.

Le rôle de la voie PCP dans la pathogénèse des ATN a été largement étudié. Des mutations rares et nouvelles ont été associées à l'apparition des ATN dans plusieurs gènes de PCP incluant *FZ3*, *FZ6*, *DVL2*, *DVL3*, *VANGL2*, *PK1*, *PK2*, *DIVERSIN* (orthologue de *Dgo*), *CELSRI* (orthologue de *Fmi*), *PTK7* et *SCRIB1*. Ces mutations ont été génétiquement et

fonctionnellement validées et l'effet pathogène a été démontré pour plusieurs locus PCP comme *VANGL1*, *PK2*, *DIVERSIN* et *SCRIBBLE1* en utilisant divers essais fonctionnels. D'autres patients avaient des mutations dans différents gènes ou locus de la voie PCP suggérant une interaction génétique entre ces loci dans la modulation de l'incidence des ATN. Ceci démontre l'importance du rôle de la voie PCP dans la pathogénèse des ATN pour une fraction des patients.

1.6. La signalisation Wnt

Cette voie de signalisation est très importante dans le développement embryonnaire. À peu près 19 ligands wnt ont été répertoriés. Ces ligands peuvent lier plusieurs types de récepteurs et co-récepteurs comme Frizzled (1-10), LRP5/6^{90, 91}, ROR 1/2⁹², RYK⁹³, MUSK⁹⁴, PTK7⁹⁵ et R-spondin^{91, 96}.

1.6.1 Voie de signalisation canonique (β -caténine dépendante)

Cette voie est essentielle pour réguler la transcription des gènes dépendamment de la présence d'un signal wnt. Sans un ligand wnt qui active la voie, un complexe de destruction est en continuel travail pour détruire β -caténine. Ce complexe de destruction se compose de plusieurs protéines chaperonnes comme Axin, APC, GSK3 et CK1 α . Les co-récepteurs LRP5/6 aussi sont importants dans cette voie et vont s'associer avec Axin sur la membrane (Figure 12; page 33).

L'arrivée d'un ligand wnt sur le récepteur FZD induirait le recrutement de LRP5/6 ce qui forme un complexe tertiaire. GSK3 qui inhibe "en temps normal" l'activation de la voie promouvoir le recrutement de Dvl-axin vers la membrane lors de la réception d'un ligand par

les récepteurs mentionnés. Il a été proposé que Dvl, par son domaine DIX pourrait inactiver la fonction des complexes formés par Axin (qui possède un domaine DIX aussi) dans le cytoplasme⁹⁷ en se liant à cette dernière. Dès que le complexe de destruction se désassemble, la β -caténine rentre dans le noyau par les pores nucléaires à l'aide des répétitions « Armadillo » qui ressemblent à ceux de β -importin^{98, 99}. Dans le noyau elle est capable d'activer des gènes cibles propres à wnt par son association avec des facteurs de transcription spécifiques. Les facteurs de lymphocytes T (TCF) sont les plus connus^{100, 101}. Ils ressemblent à des interrupteurs de transcription en réprimant celle-ci dans le cas où la voie est inactive. Beaucoup de co-régulateurs des TCF et β -caténine se trouvent dans le noyau mais leurs mécanismes de fonctionnement sont moins connus. La partie N-terminale des TCF peut se lier avec β -caténine. Ces TCF contiennent un groupe de haute mobilité (HMG) qui l'aide à établir la liaison avec l'ADN¹⁰²⁻¹⁰⁴ et l'importation nucléaire. Chez les vertébrés il existe 4 gènes de TCF, notamment *TCF1*, *LEF1*, *TCF3* et *TCF4*. TCF3 serait un répresseur de la transcription alors que LEF1 serait un activateur¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. TCF1 et TCF4 auraient la fonction d'activateurs ou répresseurs dépendamment du contexte cellulaire. Par exemple, en cas de sur-activation, TCF1 pourrait agir comme répresseur de la voie¹⁰⁹.

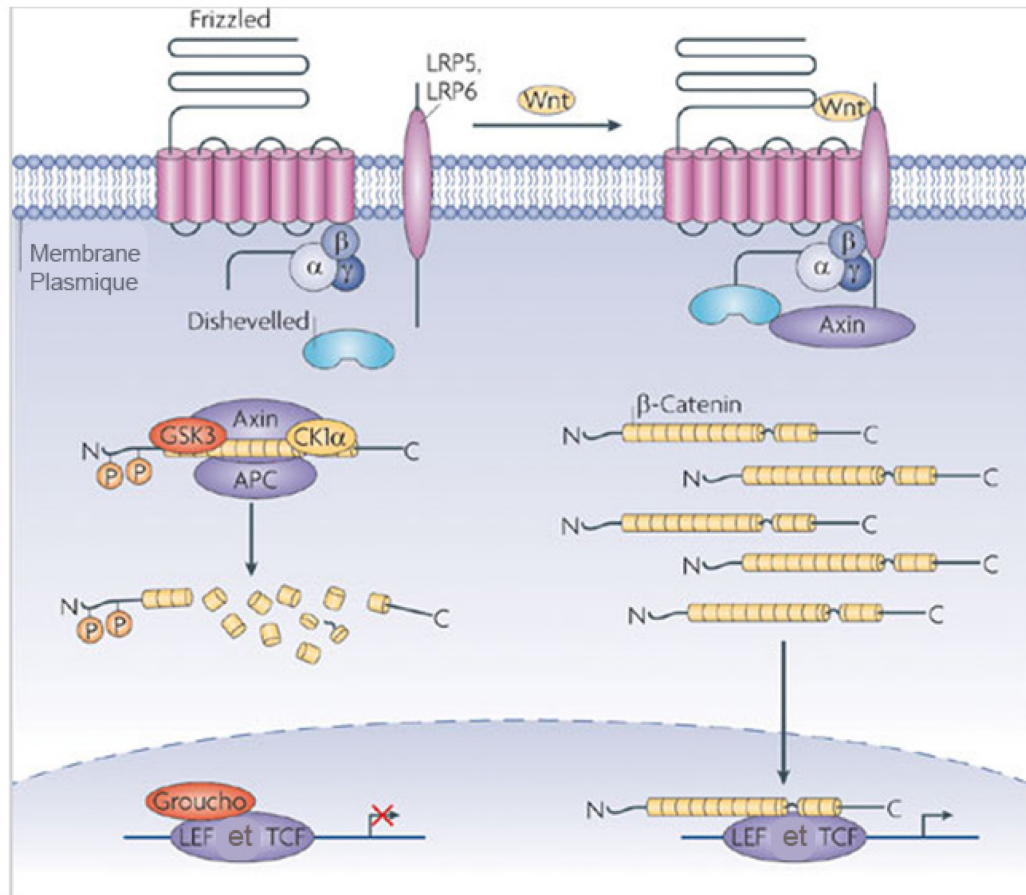


Figure 12. Voie de signalisation canonique de Wnt. Une activation de la voie par un ligand lié au récepteur frizzled engendre une dissociation du complexe de destruction de β -caténine. Adapté de Angers S, Moon RT (2009)¹¹¹.

1.6.2 Voie de signalisation Wnt non canonique (Indépendante de β -caténine)

1.6.2.1 Voie de signalisation Wnt/polarité cellulaire planaire (PCP):

Les gènes de la PCP ont été premièrement découverts chez les embryons de *Drosophile*, où ils étaient identifiés comme étant importants dans les tissus épithéliaux pour la polarisation cellulaire^{110, 111}. Les études génétiques des mutants chez la drosophile ont identifié les gènes essentiels de cette voie qui sont : *Strabismus/Van Gogh-like (Stbm/Vang)*,

Flamingo/Starry-night (Fmi/Stn), *Dishevelled (Dsh)*, *Frizzled (Fz)*, *Prickle (Pk)*, and *Diego (Dgo)*. Cette polarité présente un phénomène biologique qui décrit la polarité des cellules dans le plan d'un épithélium, perpendiculaire à l'axe apico-basal. Un des exemples les plus connus qui décrivent cette voie est la polarité des cellules de l'aile chez la Drosophile. Chacune de ces cellules possède une soie sensorielle, et sont orientées de façon à pointer dans la même direction¹¹¹. L'établissement de cette polarité n'est pas tout à fait compris, mais la polarisation commence lors d'une distribution non symétrique et un enrichissement sélectif de protéines vers la membrane. Chez la drosophile, deux complexes se forment suite au recrutement de Prickle et Dishevelled par Frizzled vers la membrane. Du côté distal se forme le complexe Fz/Dsh et du côté proximal celui de Vang/Pk dans les cellules épithéliales des ailes. Flamingo (Fmi) une protéine avec un domaine extracellulaire devient enrichie sur les côtés proximal et distal et se lie aux complexes Fz/Dsh et Vang/Pk déjà formés. D'autres éléments vont jouer un rôle de stabilisation de cette asymétrie. Pk inhibe l'accumulation de Dsh du côté proximal et Dgo (Diego) qui inhibe à son tour l'accumulation de Pk du côté distal¹¹². La perte d'un seul des gènes de la voie PCP peut affecter la localisation de tous les autres membres, ce qui veut dire que cette localisation intracellulaire mutuellement exclusive serait le résultat de boucles de rétroaction positives induites par leurs interactions fonctionnelles¹¹²⁻¹¹⁵. Par contre, il n'est pas clair comment la direction de l'asymétrie est établie¹¹⁶. D'autres processus qui incluent l'arrangement des ommatidies des yeux de la drosophile¹¹⁷ seraient aussi régulés par la voie de signalisation PCP.

Cette voie de signalisation est conservée chez les vertébrés où elle contrôle plusieurs processus incluant la convergence et extension pendant la gastrulation et formation du tube neural, l'orientation des cellules ciliées dans l'oreille interne et l'orientation des poils de la

peau des vertébrés¹¹⁸⁻¹²¹. La distribution asymétrique des complexes protéiques se retrouve aussi conservée chez les vertébrés¹²¹⁻¹²³ (Figure 13; page 36). Des études chez les vertébrés prouvent que la voie Wnt contrôle la voie PCP. Effectivement, Wnt5a, une protéine ligand qui se lie avec Frizzled pour induire la voie, serait importante pour la polarité planaire des cellules de l'oreille interne¹²⁴. Des études chez le *Xenopus* ont montré que la PCP contrôle aussi des événements morphogénétiques tôt dans le développement. De plus, la déstabilisation de l'un des gènes principaux de la voie PCP produit des défauts de développement similaires aux défauts vus lorsque l'expression de *wnt11* ou *Dvl* est dérégulée¹²⁵⁻¹²⁷. D'un autre côté, le récepteur *Celsr* peut antagoniser la voie de signalisation Wnt/ β -caténine chez le Xénope¹²⁸, alors que la protéine de *Celsr* avec la partie C-terminale tronquée peut affecter le processus d'épibolie chez le poisson zèbre¹²⁹.

Aussi, des études sur la perte de fonction de Vang et Pk chez la souris produisent des embryons avec un axe antéro-postérieur raccourci, un phénotype qui est lié à la CE. La déplétion de Vang et Pk en utilisant des morpholinos sur le poissons zèbre et le Xénope donne des résultats similaires^{84, 129-134}. La relation entre la voie PCP et la signalisation wnt n'est pas toujours claire. Par contre on remarque qu'au début de la gastrulation dans le Nœud de Hensen Vangl1 et Prickle2 se trouvent du côté antérieur de la membrane plasmique^{123, 135} et les protéines Dishevelled se trouvent du côté postérieur dans la membrane plasmique des cellules¹³⁶. Cependant, le gradient des ligands de la PCP, wnt3a et wnt5a, diminue dans la direction caudo-rostrale^{123, 136}.

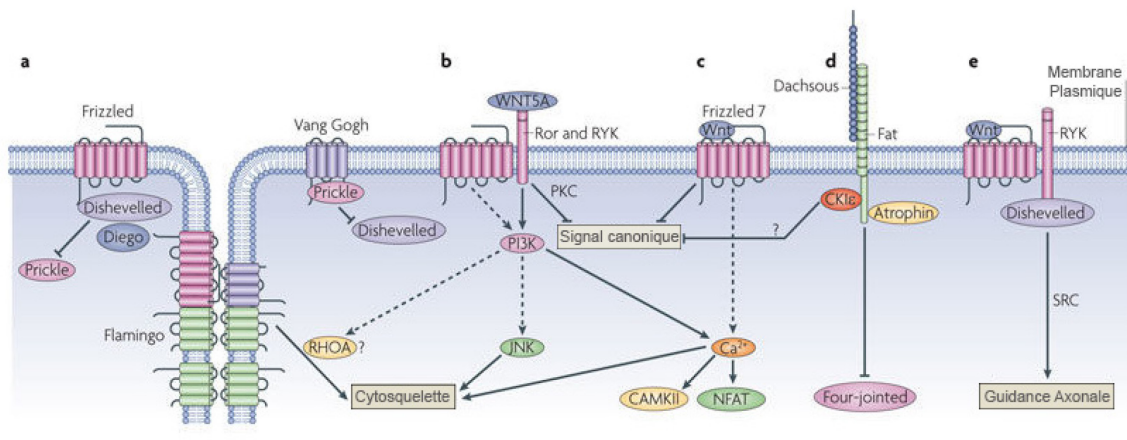


Figure 13. Plusieurs voies de signalisation non canonique de polarité cellulaire planaire (PCP) présentées dans un schéma simplifié. a) les complexes de la voie de PCP sont enrichis de façon non-symétrique, une polarité maintenue par des interactions mutuellement répressives. b) montre le ligand wnt5a qui agit généralement dans la voie non-canonique de wnt et s'associe avec des tyrosine kinases (Ror et Ryk). c) Le type de récepteur frizzled peut aussi affecter la voie de signalisation, comme fzd7 qui agit généralement dans la voie non-canonique. d) Fat et Dashous aussi agissent dans la voie PCP probablement par le recrutement de caséine-kinase 1ε. Fat peut recruter atrophine (corépresseur de transcription) pour inhiber

l'expression de gènes (*four-jointed*). e) La tyrosine kinase Ryk peut aussi affecter la guidance axonale par l'intermédiaire de SRC. Adapté de *McNeill H, Woodgett JR (2010)*¹³⁹.

1.6.2.2 Voie de signalisation Wnt/Ca²⁺

Plusieurs modèles de signalisation ont été proposés pour cette voie de wnt. Quelques wnt sont maintenant reconnus comme étant capable d'activer cette voie dépendamment du contexte cellulaire. Dépendamment du type de récepteurs et corécepteurs qui se trouve sur la surface de la cellule, la réponse va être différente. Wnt5a¹³⁷ et Wnt11¹³⁸ avec le wnt3a¹³⁹ se trouvent sur la liste de ligands qui induisent l'activation de cette voie. Ces trois molécules peuvent dans quelques cas, selon le contexte cellulaire en récepteurs¹³⁷, activer la voie canonique (β -caténine dépendante). Quelques études proposent que la concentration du ligand pourrait avoir un effet sur le type de réponse¹³⁹. D'autres études ont prouvé que le contexte en récepteur peut aussi affecter l'action d'un ligand spécifique. Par contre, beaucoup de recherche reste à être faite dans ce sujet. Selon les premières études, les protéines suivantes principales de cette voie seraient: la phospholipase C (PLC), l'inositol-triphosphate (IP₃), et le diacylglycérol (DAG). Frizzled2 était l'un des premiers récepteurs à être lié avec cette voie. Dans une étude faite chez l'embryon du poisson zèbre, la surexpression des récepteurs frizzled comme Fzd2^{140, 141} induisait un relâchement du calcium intracellulaire. D'autre études suggèrent l'implication de récepteurs couplés aux protéines G et la phosphodiesterase (PDE)¹⁴². Cette dernière est capable de diminuer les niveaux de GMPC dans les cellules et induire une augmentation du niveau de calcium intracellulaire¹⁴².

1.7. La souris comme modèle dans l'investigation de la génétique complexe des ATN humains.

Plusieurs points communs se trouvent entre la souris et l'homme dans la formation du tube neural. La souris a servi à identifier plus de 300 gènes associés au développement d'une ATN¹⁴³. Une bonne partie de ces gènes sont des membres de la voie PCP dont plusieurs ont été validés dans des cohortes d'individus atteints d'ATN^{32, 85-87, 144-146}. De plus plusieurs études ont combinés plusieurs effets génétiques (deux allèles de gènes différents) et aussi des effets environnementaux chez les mutants^{147, 148}. De même quelques études ont utilisé la souris GDM (souffrant de diabète) pour investiguer l'effet de facteurs environnementaux, comme la supplémentation en myo-inositol¹⁴⁹.

Par contre aucune mutation causative d'ATN n'a été identifiée chez les humains. La plupart des mutations chez les patients étudiés jusqu'aujourd'hui ne se trouve que dans l'état hétérozygote, montrant que les ATN ont une étiologie complexe. La cause d'une ATN humaine serait probablement le résultat de plusieurs mutations hétérozygotes combinées soit, dans le même gène ou dans la même voie de signalisation ou aussi des protéines qui interagissent physiquement ensemble¹⁴³. Malheureusement, la seule façon de tester cette hypothèse c'était d'étudier deux gènes spécifiques et tester l'interaction génétique entre eux dans la production d'un phénotype. Malgré le fait que cette approche, relativement simple, est capable d'identifier des gènes associés, elle ne représente pas la réalité. Le fait que beaucoup de gènes participent dans la gastrulation, la neurulation primaire et secondaire, signifierait qu'il y aurait une infinité de possibilité pour produire une ATN.

Afin de mieux comprendre l'étiologie de la maladie, il est important d'essayer d'introduire tous les gènes étudiés dans un catalogue, dans le but de construire une image globale sur la progression de la fermeture du tube neural dépendamment du profil de mutations ou SNPs. Pour accomplir une étude de ce genre, il faudrait avoir une approche de gènes candidats multiple dans un large groupe d'individus extensivement génotypés.

1.8. *Looptail*

Cette souris a été décrite depuis 1949 par Strong qui a remarqué la présence d'une queue courbée dans l'une de ses lignées de souris. Le croisement de souris entre eux avec ce phénotype produisait des embryons avec une craniorachischisis. Ce phénotype a été éventuellement lié à une mutation dans le gène de la voie PCP, *Ltap* ou *Vangl2* en 2001⁸⁴ chez la souris *Looptail* (*Lp*). La mutation consiste en un changement d'un seul acide aminé, p. Ser464Asn. D'autres allèles ont été découverts par la même équipe dans des souris produites par mutagenèse à l'ethyl-nitroso-urée, qui sont *Lp^{m1jus}* (*Vangl2^{D255E}*) en 2001¹⁵⁰ et *Lp^{m2jus}* (*Vangl2^{R259L}*) en 2011¹⁵¹. Par comparaison aux mutations S464N et D255E qui se transmettent de façon semi dominante, l'allèle de *Vangl2*, R259L est hypomorphe. Il produit une spina bifida et une queue courbée dans 12% et 77% des souris homozygotes respectivement¹⁵¹.

Des études fonctionnelles ont utilisé les cellules "Madin-Darby canine kidney" (MDCK) afin de visualiser la localisation de la variante mutée de *Vangl1* (S464N; numérotage *Vangl2*) et *Vangl1* (D255E, numérotage *Vangl2*). Il s'est avéré que ces protéines ne sont plus capables de se rendre et s'incruster dans la membrane plasmique. Avec un anticorps contre la calréticuline, un marqueur de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ils ont été capables d'établir que la variante mutée de la protéine se trouve majoritairement dans le RE¹⁵².

Puisque la protéine Vangl2 est exprimée dans plusieurs tissus chez l'embryon en développement, et que celui-ci est indispensable dans l'établissement de la PCP, beaucoup d'autres systèmes sont affectés par la présence d'un allèle muté de *Vangl2*. Des exemples de cela se trouvent dans les autres phénotypes découverts chez les mutants *Lp*, comme la désorientation des follicules pileux de la peau chez les embryons homozygotes *Lp/Lp* (aussi chez *Crsh/Crsh* mutants du gène *Celsr*)¹⁵³. De même des changements ont été détectés dans la forme des cellules épithéliales (de cylindriques en cuboïdes) dans l'utérus chez les mutants *Lp* avec une perte de la polarité apico-basale de ces cellules¹⁵⁴. Les embryons homozygotes pour cette mutation démontrent aussi un défaut de fermeture des paupières (eyelid closure)¹⁵⁵, une diminution du diamètre du nerf optique et une augmentation de l'épaisseur de la rétine¹⁵⁶. L'étude faite par Greene et al en 1998, montre que la plaque du sol (FP ou floor plate) est plus large chez les homozygotes *Lp*¹⁵⁷. Ils utilisent l'expression de gènes marqueurs de la FP et de la notochorde (*Shh* et *Netrin1*) chez les embryons E9,5.

Ces données avec les études d'interaction génétique entre *Vangl2* et les autres membres de la voie PCP, montrent que les copies de la protéine Vangl2 constituent un facteur limitant pour l'établissement correct de la PCP dans plusieurs tissus (surtout épithéliaux). Cela est confirmé par le fait que l'hétérozygotie de cet allèle *Lp/+* rend la signalisation non-canonique plus sensible à des mutations de gènes PCP. Ces mutations ne produiraient pas de phénotype à l'état hétérozygote en temps normal (*Vangl1*^{123, 155}, *Dvl1/2/3*^{122, 158}, *Fz1/2*¹⁵⁹, *Celsr1*¹⁶⁰, *Scribble*^{161, 162}, *Ptk7*¹⁶³, *Sec24b*^{159, 164}, *wnt5a*¹²⁴, *Ryk*⁹³).

2. Problématique et pertinence:

2.1. Problématique

Beaucoup d'études ont été réalisées afin de comprendre les changements au niveau cellulaire et moléculaire qui affectent la fermeture normale du tube neural. La voie de signalisation wnt non canonique a été investiguée par plusieurs groupes de recherche à cet effet. Faisant partie des gènes principaux régulant la voie PCP, *Vangl2* était le sujet de plusieurs études sur des cohortes de patients atteints d'ATN. Le séquençage de ces patients a révélé des mutations ponctuelles dans *Vangl2* qui ne se trouvaient pas chez le groupe témoin^{86, 87}. D'autres études chez la Souris et la Grenouille ont démontré que des mutations dans *Vangl2* affectent fortement la formation du tube neural. Dans la présente étude, nous identifions une nouvelle souris mutante *Curly Bob* qui présente un phénotype semblable à *Looptail* (*Vangl2*^{S464N}) et qui interagit génétiquement avec cette dernière. La caractérisation de cette mutante est importante pour une meilleure compréhension de la voie PCP et de rapport entre structure et fonction de *Vangl2* durant l'établissement de la PCP dans le tissu embryonnaire.

2.2. Hypothèse et objectifs

Le but final des études génétiques et fonctionnelles est d'identifier des mutations chez la souris qui causent une ATN grave. Des mutations ayant un aussi grand effet sur la fermeture du tube neural chez les souris ont de grandes chances d'avoir un effet similaire chez les humains. Nous émettons comme hypothèse que les souris *Curly Bob* pourraient mener à

l'identification d'un gène impliqué dans la fermeture du tube neural. Aussi nous pensons que la nouvelle souris *Curly Bob* pourrait représenter un puissant modèle murin d'anomalies de fermeture du tube neural pour des études futures sur les ATN et la voie PCP.

Nos objectifs spécifiques dans ce projet sont les suivants:

1. Mener des études d'interaction génétique entre les souris *Looptail* et *Curly Bob*.
2. Utiliser une approche de gènes candidats afin d'identifier par séquençage Sanger la mutation responsable du phénotype.
3. Caractériser de façon moléculaire et fonctionnelle la souris *Curly Bob*.

2.3. Pertinence et retombés scientifiques

La souris *Curly Bob* représente un modèle puissant afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui mènent vers le développement d'une ATN. Le gène muté dans cette mutante se retrouve dans la même région génétique et physique que *Vangl2*, ce qui suggère la présence d'un nouvel allèle de *Vangl2*. Le but de la présente étude est celui de caractériser un nouvel allèle mutant de *Vangl2* chez la souris qui pourrait servir d'un modèle d'ATN murin dans des études futures.

3. Matériel et méthodes:

3.1. Maintien des souris:

Souris *Curly Bob*:

La souris *Curly Bob* a été obtenue du programme MGI de chez "Toronto Center for Phenogenomics". Cette souris a été générée par l'intermédiaire de la super-mutagenèse ENU dans la lignée C3H/HeJ et restée sur le même fond génétique pendant 13 générations. Afin de déterminer si le phénotype est robuste et d'augmenter la taille des portées, le fond génétique de la souris a été changé par out cross avec des souris de fond FVB/N. Cette lignée a été maintenue par croisement entre frères et sœur et croisement avec des souris FVB/N à chaque troisième génération.

Souris *Looptail*:

La souris *Looptail* nous a été gracieusement fournie par le Dr. Philippe Gros de l'Université McGill. La mutation *Lp* dans *Vangl2* est d'origine spontanée et provient du fond génétique A/J mais elle se présente maintenant avec le fond génétique C57BL/6J. Elle est maintenue en générant des croisements entre les frères et sœurs⁸⁴.

3.2. Identification de la mutation chez la souris *Curly Bob*:

Nous avons priorisé le séquençage du gène *Vangl2* chez cette souris pour trois raisons :

1) La mutation a été cartographiée initialement pour être dans une région candidate sur le chromosome 1 et proche de *Vangl2* et 2) le phénotype de cette mutante est semblable à celui

de Lp causé par une mutation de *Vangl2* (*Vangl2*^{S464N}). Le séquençage des sept exons de *Vangl2* a été fait en utilisant les amorces et températures d'hybridation suivant (Tableau I):

Tableau I. Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de *mVangl2*.

Exons	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation	Taille du fragment amplifié (pb)
1 et 2	mVANGL2-ex1-2F mVANGL2-ex1-2R	AAGAGGTCCTCAGCCCGCG GACTTGCTAGGAGACTCC	63°C	440
3	mVANGL2-ex3F mVANGL2-ex3R	ATGTGTACCTCTGCTCTGCC CATCTGGGTCTCATCTTTGTC	59°C	270
4	mVANGL2-ex4F mVANGL2-ex4R	CGACCTGCCCTGATGTGTC GGCAAGGGAGGTAGCTTGG	58°C	300
5	mVANGL2-ex5F mVANGL2-ex5R	CATATCCTCTGGCTGTGAG CGGGTACCACTCAGTTGGC	58°C	310
6	mVANGL2-ex6F mVANGL2-ex6R	GTAGGATGAGCAGTGAGCAC CCGTGACCAACAGAGACAAG	58°C	350
7	mVANGL2-ex7F mVANGL2-ex7R	GCTGTGTCACAGAGGATGAAG ACATCCCTCCTCCGCGGCT	58°C	310

3.3. Génotypage des souris:

Pour le génotypage des souris adultes et embryons, un bout de queue ou une partie du sac embryonnaire a été utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique. L'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique de BIO BASIC EZ-10 Spin Column, BS628). Le génotypage des souris a pu être réalisé à l'aide du séquençage par Sanger.

3.3.1 Souris *Curly Bob*.

Le génotypage des souris a pu être réalisé à l'aide du séquençage par la méthode de Sanger. La mutation faux-sens T803A de la souris *Curly Bob* se trouve sur l'exon 4 du gène *Vangl2*. Les amorces utilisées pour le génotypage sont mVangl2-ex4F (5'-CGACCTGCCCTGATGTGTC-3') et mVangl2-ex4R (5'-GGCAAGGGAGGTAGCTTGG-3'). Le fragment de 285 pb est amplifié par PCR avec la One Taq® DNA polymérase (New England Biolabs, #M0480L) à l'aide de l'appareil "SimpliAmp™" (Applied Biosystems/Life Technologies) en utilisant les conditions suivantes: 30 secondes à 94°C, suivi par 35 cycles chacun de 15 secondes à 94°C, 15 secondes à 61°C, 30 secondes à 68°C, suivi par un cycle d'élongation de 5 minutes à 68°C. Le produit de PCR est ensuite séquencé par la méthode de Sanger.

3.3.2 Souris *Looptail*.

La mutation G1391A de la souris *Looptail* se trouve dans l'exon 7 du gène *mVangl2*. Les amorces utilisées pour le génotypage sont mVangl2-ex7F (5'-GCTGTGTCACAGAGGATGAAG-3') et mVangl2-ex7R (5'-ACATCCCTCCTCCGCGGCT-3'). Le fragment de 310 pb est amplifié par PCR avec la One Taq® DNA polymérase (New England Biolabs) à l'aide de l'appareil "SimpliAmp™" (Applied Biosystems/Life Technologies) en utilisant les conditions suivantes : 30 secondes à 94°C, suivi par 35 cycles chacun de 15 secondes à 94°C, 15 secondes à 62°C, 30 secondes à 68°C, suivi par un cycle d'élongation de 5 minutes à 68°C.

3.4. Phénotypage et complémentation de *Curly Bob* avec *Looptail*:

Les souris hétérozygotes *Curly Bob* ($Vangl2^{+/1268N}$) ont été croisées avec des souris hétérozygotes *Looptail* ($Vangl2^{+/S464N}$). Les embryons étaient phénotypés par inspection visuelle, pour la présence d'une queue droite ou queue bouclée et un tube neural fermé ou ouvert (craniorachischisis). L'âge embryonnaire variait selon les expériences. Des E11,5 pour les analyses immunohistochimiques sur le tube neural, E18,5 pour analyses immunohistochimiques sur les cochlées et système vestibulaire, ont été utilisés pour le phénotypage.

Pour toutes les expériences des différentes lignées de souris, le protocole d'éthique pour l'expérimentation avec les souris a été approuvé par le Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) du Centre de Recherche du CHU Sainte Justine.

3.5. Immuno- buvardage de type western:

3.5.1 Extraction des protéines

Les embryons E18,5 sont sacrifiés. Le cerveau est collecté dans un tube Eppendorf (1,5 ml) et conservé à -80°C. Le tissu est repris dans un "Dounce homogenizer" (capacité 5cm³) en verre avec 300µl de tampon de lyse RIPA (50 mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Na-déoxycholate, 1% Triton (X100), 1 mM EDTA, 1x cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche, Mannheim, Allemagne, 04693159001) pour un volume final de 10ml, dans du PBS). Le cerveau est homogénéisé après quelques coups en utilisant le pilon. Le lysat est ensuite prélevé, centrifugé à 17 000g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est

prélevé. La quantification des protéines est faite à l'aide du kit BCA™ Protein Assay (de Thermo Scientific, PI23227) en suivant le protocole du manufacturier.

3.5.2 Gel SDS-Page

Les protéines sont séparées par migration à travers un gel par la technique sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Le gel est constitué d'un gel de concentration (5%) [Recette pour 1 gel: 2,35ml ddH₂O, 1,25ml (4X buffer de concentration: 125mM Tris-HCl pH:6,8 et 0,1% SDS), 0,85ml polyacrylamide (30% acrylamide/bis-acrylamide), 0,5ml (SDS 10%), 50µl (10% Ammonium Persulfate), 3µl de TEMED pour un volume final de 5ml. Ce gel est suivi d'un gel de séparation (8%) [Recette pour 1 gel: 3,7ml ddH₂O, 2,5ml tampon de séparation (375mM Tris-HCl pH:8,8 et 0,1% SDS), 2,7ml de (30% acrylamide/bis-acrylamide), 1ml SDS (10%), 100µl (10% Ammonium Persulfate), 6µl de TEMED pour un volume final de 10ml].

Afin de dénaturer les protéines, les échantillons sont mélangés à une solution de Laemmli 1X (Laemmli 4X: 0,25ml d'une solution 1M de Tris-HCl pH:6,8, 4ml de glycérol 100%, 5ml SDS (10%), 10% β-mercaptoéthanol, 0,5mg de bleue de bromophénol). La migration se fait pendant 1h 30min à 150V. Les protéines du lysat ainsi séparées selon leur poids moléculaire sont transférées (à 100V pendant 48min) sur une membrane PVDF (Immobilon®-P de Millipore, IPVH00010). La membrane est rincée au TBS 1X (TBS 10X pour 500ml: 30,3g Tris, 43,9g NaCl, pH: 8). La membrane est ensuite incubée pendant 30min à température pièce dans une solution de blocage (5% de lait dans du TBS/Tween20 0,1%) puis incubée pendant la nuit à 4°C avec un anticorps primaire polyclonal, anti-Vangl2 de chèvre (1:1000; sc-46561; Santa Cruz) suivie de 1h à température pièce. Trois lavages de 5min avec du TBS-Tween20 suivent et une incubation de 2h à température pièce avec un

anticorps secondaire anti-chèvre, conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) (1:5000; Abcam). Après trois lavages avec du TBS-Tween20, la membrane est incubée avec un agent de chimioluminescence (ECL) (Amersham, RPN3243) et exposée sur un film. La β -actine a été visualisée suite à une incubation de 1h avec un anticorps monoclonal anti- β -actine de souris (Novus Biologicals; NV600-501; 1:5 000) à température pièce dans la solution de blocage. Trois lavages de 5min suivent et une incubation de nouveau avec un anticorps secondaire anti-souris conjugué à la HRP, pendant 45min (1:10 000; Abcam). Cette expérience est répétée trois fois pour chaque génotype (n=3).

3.6. Système double-hybride chez la levure

Le système de double hybride chez la levure [MatchMaker system 3 (#K1612-1, Clontech)] a été utilisé pour étudier l'interaction entre hVangl2-Cterm wild-type, hVANGL2-Cterm-I268N et hVANGL2-Cterm-S464N avec hDVL3 et hSCRIB1-PDZ. La construction wild-type et mutante de hVANGL2-Cterm-pGBKT7 et aussi hSCRIB1-PDZ-pGADT7 et hDvl-pGADT7 ont été introduites dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* Y187 (MAT α) et AH109 (MATa), (pGADT7 dans AH109 et pGBKT7 dans Y187). Dans ce système, AH109 exprime les protéines introduites avec le domaine d'activation alors que Y187 exprime WT-hVANGL2-Cterm et les constructions de *VANGL2* mutantes avec un domaine de liaison. *S. cerevisiae* AH109 et Y187 clones ont été mises ensemble et l'activité de GAL4 a été testée comme décrits dans le MatchMaker system 3. L'activité de GAL4 reconstituée (interaction dans GAL4 entre les fusions avec les domaines d'activation et de liaison à l'ADN) a été testée par la croissance de cellules diploïdes sur les différents milieux de sélection: -Leu/-Trp (stringence faible, sans leucine ni tryptophane) un drop out double (DDO), -His/-Leu/-Trp (stringence intermédiaire,

sans histidine, leucine et tryptophane) un drop out triple (TDO) et -Ade/-His/-Leu/-Trp (haute stringence) un drop out quadruple (QDO). L'interaction entre les protéines a été évaluée selon la croissance de cellules diploïdes sur le milieu solide après 96h à 30°C.

3.7. Immunohistochimie sur des sections du tube neural:

Les embryons de types sauvage, hétérozygote et homozygote pour l'allèle *Vangl2*^{L268N} sont récoltés au jour embryonnaire 11,5. Les embryons sont rincés au PBS et fixés au paraformaldéhyde 4% à 4°C pendant la nuit. Le lendemain les embryons sont rincés 3 fois au PBS et sont mis dans une solution de 30% sucrose pendant une nuit à 4°C avec agitation. Le jour suivant, les embryons sont prélevés et mis en agitation dans une solution préparée auparavant (50% sucrose: OCT dans un ratio 1:1) pendant 2h à température pièce. Les embryons sont ensuite inclus dans des blocs avec de l'OCT et congelés en utilisant de la glace sèche et de l'éthanol. Les blocs sont conservés à -80°C pour leur utilisation future. Les blocs sont repris et coupés au cryostat, avec une épaisseur de 14µm.

Les sections sont mises dans une solution de blocage pendant 2h à température pièce (10% sérum de chèvre normal (NGS), 1% Triton X-100, PBS), l'anticorps primaire (anti-vangl2) à 4°C pendant la nuit avec 1h à température pièce le lendemain (5% NGS, 0,1% Triton X-100, 1/50- 1/100 anti-vangl2, PBS). Le lendemain, trois lavages au PBS pendant 10 minutes chaque suivies d'une incubation avec l'anticorps secondaire pendant 2h à température pièce (5% NGS, 0,1% Triton X-100. 1:400 Alexa 555 conjugated -goat anti Mouse). On fait ensuite trois lavages au PBS et les lames sont prêtes pour être montées avec du Vectashield (Vector) et visualisées sous un microscope confocal (DM5500 Q, Leica).

3.8. Immunohistochimie sur les cellules ciliées de la cochlée et de l'ampoule postérieure:

Les cochlées et vestibules ont été prélevées des embryons E18,5 dans du PBS froid puis directement transférées au paraformaldéhyde 4% pour fixation pendant une nuit. Le lendemain, les tissus sont lavés trois fois au PBS. Les tissus peuvent être gardés 2 semaines au moins à 4°C. Les cellules ciliées de l'organe de Corti et des parties du système vestibulaire (utricule, saccule et ampoule) sont microdisséquées sous un microscope dans du PBS 0,15% Triton X-100 et incubées 1h dans du PBS 0,15% Triton X-100 avec 5% de sérum de chèvre. Les parties sont ensuite prélevées et incubées de nouveau dans du PBS 0,15% Triton X-100 avec 5% de sérum de chèvre avec l'anticorps contre la phalloïdine conjugué à un Alexa Fluor 488 (1/100, Numéro de Cat: A12379). Elles sont incubées pendant la nuit à 4°C en agitation. Le lendemain, les tissus sont prélevés et lavés avec du PBS 0,15% Triton X-100 trois fois pendant 15min puis montés sur des lames à l'aide de Prolong Gold. Au moins 30 cellules de chaque rangée de l'apex de l'organe de Corti ont été utilisées pour la quantification. Pour l'organe de Corti l'orientation des cils en « V » a été déterminée en traçant une ligne fixe dans le milieu du « V » et une ligne parallèle à l'axe médio-latéral¹⁶⁵. Pour le système vestibulaire, la mesure de désorientation est faite en mesurant l'angle formé par la ligne qui coupe la cellule en deux en passant par le kinocilium et une ligne perpendiculaire à l'axe de l'épithélium sensoriel¹⁶⁶. Les études sur la désorientation des cellules ciliées généralement considèrent qu'un changement de l'angle de $\pm 30^\circ$ de la position 0 définit la cellule comme étant désorientée (schéma explicatif de la méthode de calcul dans Figure 14, page 51).

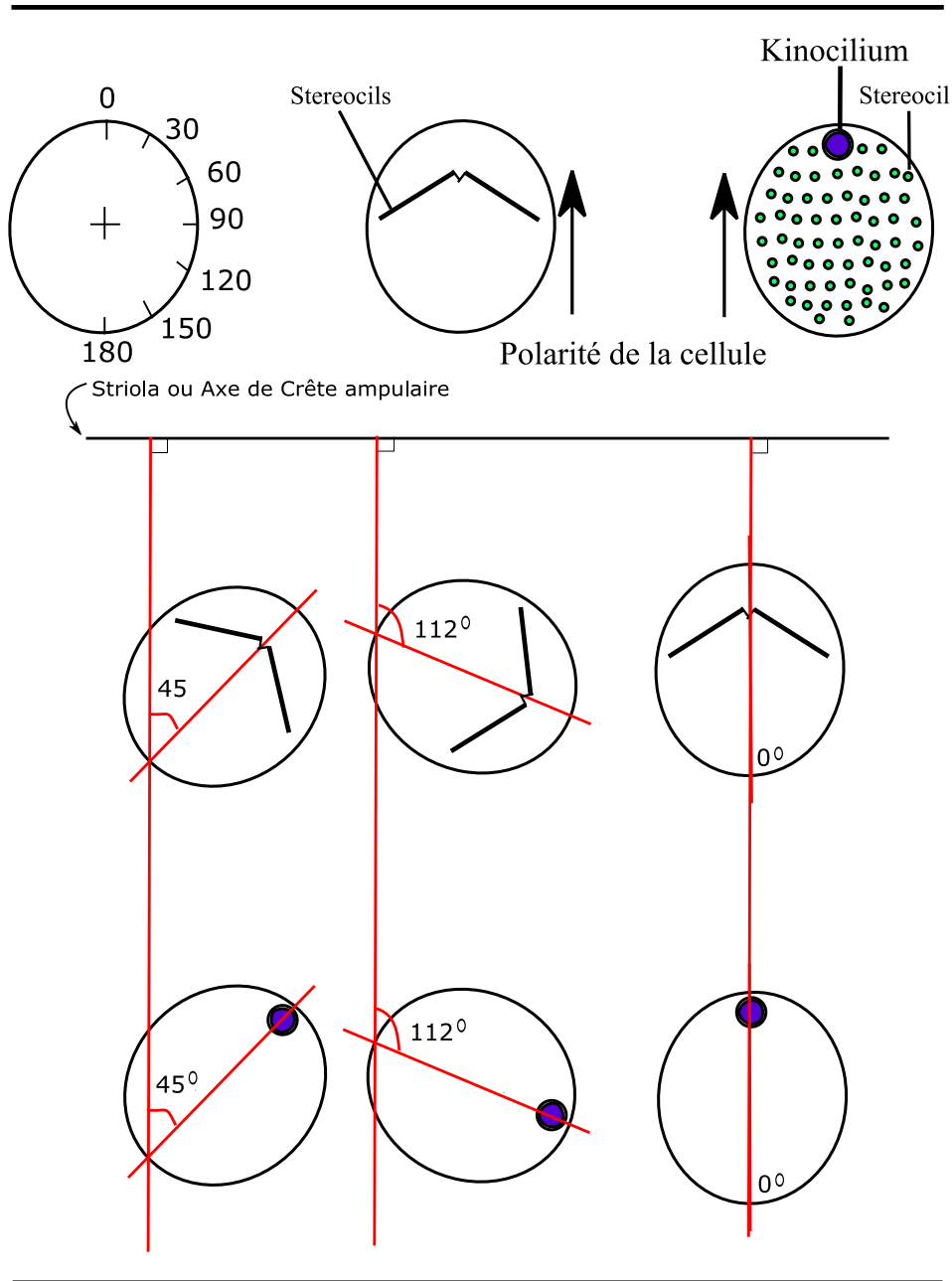


Figure 14. Schéma illustrant la méthode de mesure des angles des cellules ciliées de l'Organe de Corti et du système vestibulaire.

4. Résultats:

4.1. Caractérisation moléculaire du mutant *Curly Bob*:

La mutation de *Curly Bob* a été reliée au chromosome 1 entre 128-200Mb au 'Centre of Modeling Human Disease'. Cette information de cartographie avec la présence d'une queue bouclée nous a permis de privilégier le séquençage de *Vangl2*, un gène de la voie PCP. Le séquençage du cadre de lecture ouvert et des jonctions entre exons et introns de *Vangl2* nous a permis de trouver une mutation faux-sens dans l'exon 4. Cette mutation ne se trouve ni chez les deux lignées parentales ni les 28 autres lignées de souris pures 'inbred'. Ceci suggère fortement que cette mutation ne constitue pas un simple polymorphisme. La mutation se trouve dans l'exon 4 et change le nucléotide T803 de la séquence codante en A803 (Figure 15B; page 53). Ce changement résulte en un changement de l'isoleucine à la position 268 en asparagine (Figure 15C; page 53). Des outils de prédiction de l'effet de changement d'un acide aminé sur la structure et fonction d'une protéine comme Polyphen et PROVEAN estiment que la mutation est probablement dommageable (score: 0,999) et délétère (score : -6,632) respectivement. Cette mutation se trouve proche d'un « domaine de ciblage vers la membrane »¹⁶⁷ dans la partie C-terminale de la protéine aux acides aminées 280-283 [YYXXF]¹⁶⁷ et pas loin des deux autres allèles affectant la fermeture du tube neural, D255E ou *Lp*^{m1Jus} et R259L ou *Lp*^{m2Jus}, décrits auparavant^{84, 150, 151} (Figure 15A; page 53). En comparant la séquence de *mVangl2* avec la séquence de *Vangl2* dans plusieurs autres espèces et même avec la séquence de *Vangl1*, l'orthologue de *Vangl2*, on s'aperçoit que l'acide aminé affecté chez cette mutante se trouve dans un motif extrêmement bien conservé (motif LSIQR) (Figure 15C; page 53).

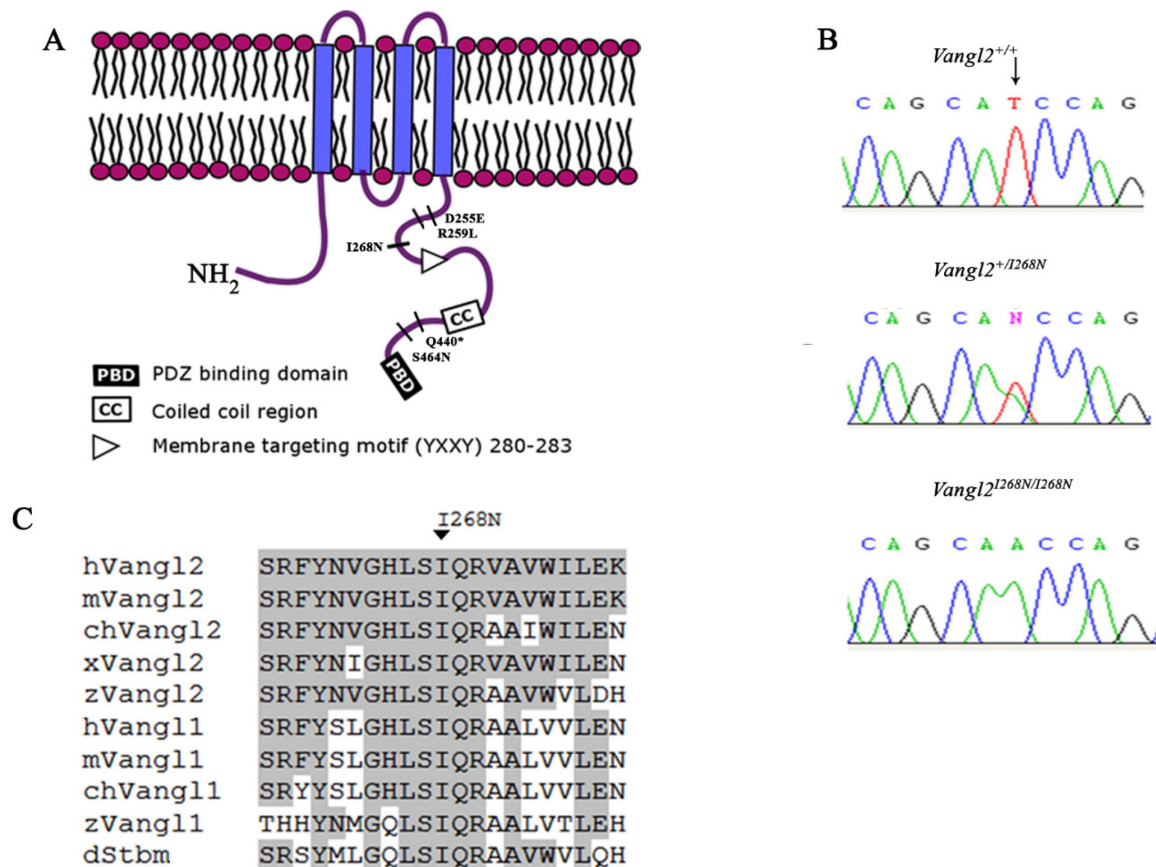


Figure 15. Identification de la mutation p. Ile268Asn dans Vangl2 chez la souris Curly Bob. (A). Une représentation de la protéine de Vangl2 montrant les domaines fonctionnels importants avec la position de plusieurs alleles décrits en plus de la nouvelle mutation. (B) Les séquences partielles de *Vangl2* chez l'espèce sauvage, l'hétérozygote et l'homozygote des souris *Curly Bob* montrant le changement c.803T→A qui produit la mutation faux-sens p. Ile268Asn. (C). Un alignement partiel de mVangl2 avec 9 autres sequences de Vangl/stbm, en indiquant la position de l'isoleucine remplacé par une arginine dans l'allèle muté. Les acides aminés conservés sont surlignés en gris. Ile268 est conservée dans toutes les protéines Vangl/stbm analysées. *homo sapiens* (hVangl2) NP_065068.1; *mus musculus* (mVangl2) NP_277044.1; *gallus gallus* (chVangl2) XP_015153866.1; *xenopus laevis* (xVangl2) NP_001082179.1; *danio rerio* (zVangl2) NP_705960.1; *homo sapiens* (hVangl1) NP_001165882.1; *mus musculus* (mVangl1) NP_808213.2; *gallus gallus* (chVangl1) XP_015150294; *danio rerio* (zVangl1) NP_991313.1; *drosophila melanogaster* (dstbm) NP_477177.1.

4.2. Études phénotypiques du mutant *Curly Bob* :

Les études phénotypiques ont révélé une association du phénotype de la queue bouclée avec l'allèle mutant dans 36% des souris adultes hétérozygotes. Ce phénotype n'a pas été détecté dans aucune des souris de type sauvage. Parmi les femelles hétérozygotes, seulement 17,7% souffrent de l'absence de l'ouverture vaginale, une condition empêchant l'accouplement (Tableau II; page 55). Les mâles et femelles hétérozygotes montrent le phénotype de 'secouement de tête' une condition où l'animal n'est pas capable de tenir sa tête stable dans une position horizontale. Les souris avaient aussi des épisodes où ils tournent en cercles dans leurs cages pendant quelques minutes, qu'on va appeler 'comportement de tours en rond' pour le terme en anglais 'circling behaviour'. Ce dernier et le phénotype de 'secouement de tête' peuvent indiquer un dérèglement du système vestibulaire.

Parmi les 136 embryons dont 36 *Vangl2*^{+/+}, 73 *Vangl2*^{+/*I268N*} et 27 *Vangl2*^{*I268N/I268N*} générés de croisements entre souris *Curly Bob*, tous les embryons de type sauvages étaient normaux, 5% des embryons hétérozygotes souffraient de spina bifida et 93% des embryons homozygotes souffraient de craniorachischisis (Table II, figure 16; pages 55 et 56 respectivement).

Tableau II. Étude de génotype-phénotype des croisements *Curly Bob* et *Curly Bob X Looptail*.

Souris	N	Genotype de <i>Vangl2</i>	Queue bouclée	Spina Bifida	Cranio-rachischisis
<i>Curly Bob</i> souris adultes (n=580)	M=151	+/+	0%	N/A	N/A
	F=139				
	M=149	+/ <i>I268N</i>	36%	N/A	N/A
	F=141 ^a				
<i>Curly Bob X Curly Bob</i> (n=136 embryons)	36	+/+	0%	0%	0%
	73	+/ <i>I268N</i>	29%	5%	0%
	27	<i>I268N/I268N</i>	93%	0%	93%
<i>Looptail X Curly Bob</i> (n=56 embryons)	14	+/+	0%	0%	0%
	11	+/ <i>I268N</i>	27%	0%	0%
	16	+/ <i>S464N</i>	31%	0%	0%
	15	<i>I268N/S464N</i>	100%	0%	93%

^a 17.7% des femelles *Vangl2*^{+/*I268N*} n'ont pas d'ouverture vaginale.

M: mâle, F: femelle, *Curly Bob*: *Vangl2*^{*I268N*}, *Looptail*: *Vangl2*^{*S464N*}.

4.3. Effet de la nouvelle mutation sur l'expression de *Vangl2* dans le tissu embryonnaire :

Afin de mieux caractériser l'effet de cette mutation nous avons investigués le niveau d'expression de la protéine chez les embryons affectés dans le tube neural. Les expériences d'immunofluorescence sur des sections transverse du tube neural à E11,5 révèlent une diminution du niveau d'expression de *Vangl2* chez les embryons homozygotes (Figure 17A; page 57). Cela a été confirmé avec une analyse semi quantitative par western-blot montrant une diminution d'autour 50% de *Vangl2*/β-actine chez les hétérozygotes (*Vangl2*^{+/*I268N*}) et une

absence presque complète de la protéine chez les homozygotes ($Vangl2^{I268N/I268N}$) par rapport aux embryons de type sauvage ($Vangl2^{+/+}$) (Figure 17B, C; page 57). Il n'était pas possible pour nous d'expliquer la fluorescence vue au niveau apical chez l'homozygote (Figure 17A; page 57). On suggère que cela proviendrait d'une non-spécificité de l'anticorps étant donné que le tube neural est exposé au milieu extérieur durant le développement.

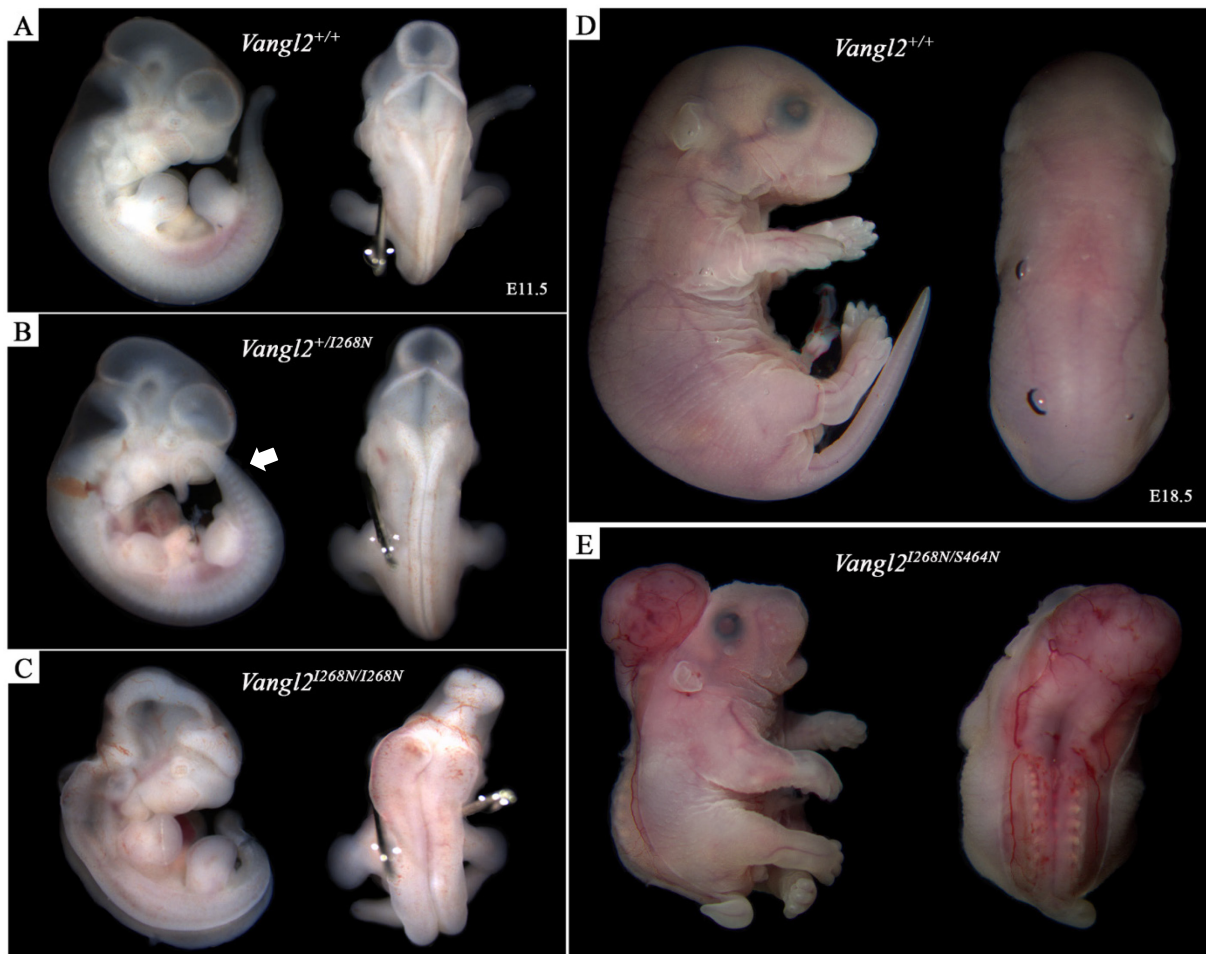


Figure 16. Études de phénotype et morphologie du développement du tube neural chez les hétérozygotes $Vangl2^{+/I268N}$ et hétérozygotes composites $Vangl2^{I268N/S464N}$. Les embryons E11,5 homozygotes $Vangl2^{I268N/I268N}$ (C) et les embryons E18,5 $Vangl2^{I268N/S464N}$ (E) montrent un craniorachischisis par comparaison à leurs compagnons de portée d'espèce sauvage (A et D respectivement). Notons la présence d'une queue bouclée chez les embryons E11,5 $Vangl2^{+/I268N}$ (B).

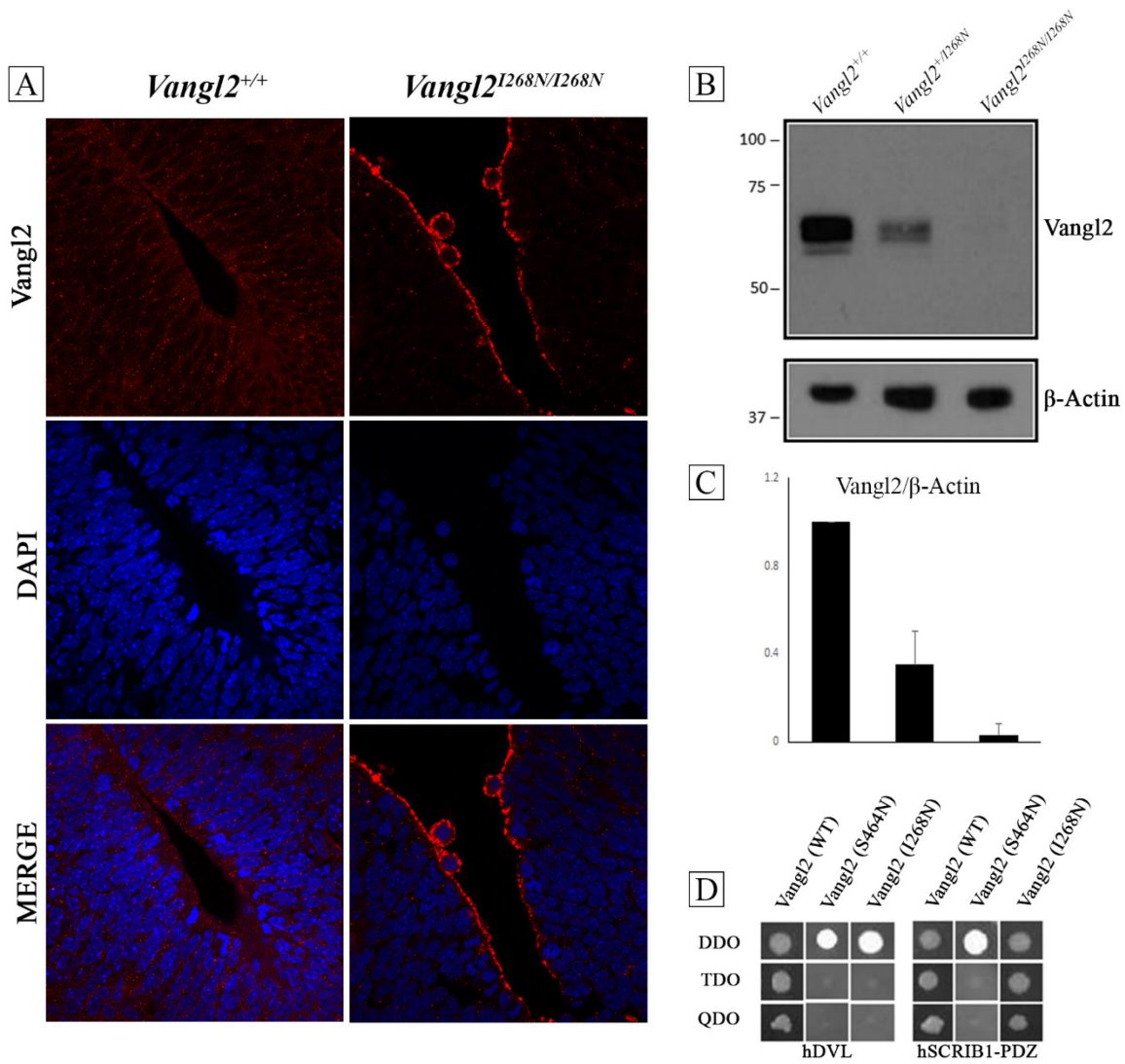


Figure 17. La mutation p. Ile268Asn affecte le niveau d'expression de Vangl2 et son interaction physique avec DVL3. (A) Immunofluorescence contre la protéine Vangl2 sur des sections de tube neural d'embryon E11,5 wild-type et homozygotes. Les noyaux ont été marqués au DAPI. (B) Immunobuvardage de type western sur des lysats de cerveau d'embryons E18,5 wild-type, hétérozygotes et homozygotes. (C) Analyse semi-quantitative des niveaux d'expression de Vangl2 en Western-blot de la partie B. (D) Test d'interaction utilisant le système double hybride de la levure pour tester CT-VANGL2^{I268N} avec DVL3 et SCRIB1.

4.4. Études d'interaction physique entre *Vangl2*^{I268N} et des protéines de la voie PCP :

En utilisant le système double hybride chez la levure nous avons testé l'effet potentiel de l'introduction de la mutation p. Ile268Asn dans *Vangl2* sur l'interaction de sa protéine avec DVL3 et SCRIB1. SCRIB1 est reconnu comme modulateur des deux voies de polarité (ABP et PCP) et reconnu comme modulateur de la voie PCP¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. L'utilisation de VANGL2-S464N, connue pour sa perte d'interaction avec la famille des protéines DVL, dans notre essai, nous a servi de témoin. Cette mutation n'a par contre, pas été testée pour son interaction avec SCRIB1. Comme attendu nous avons vu avec p. Ser464Asn une perte de l'interaction de VANGL2 avec DVL3 et nous démontrons dans cette étude une perte de son interaction avec SCRIB1. Nous avons vu aussi, que VANGL2-I268N perd son interaction avec DVL3, tandis que son interaction avec SCRIB1 n'est aucunement affectée (Figure 17D; page 57).

4.5. Études d'interaction génétique entre *Curly Bob* et *Looptail* :

Afin de mieux caractériser cette mutante au niveau cellulaire et moléculaire, les défauts de la voie PCP représentés par une désorientation des cellules ciliées dans l'oreille interne ont été investigués. Les cellules ciliées sont facilement visualisées lors d'une immunohistochimie à fluorescence avec un anticorps contre F-actine (phalloïdine) (Figure 18B; page 60). La comparaison de l'orientation des cellules ciliées de l'organe de Corti chez l'hétérozygote *Vangl2*^{+/I268N} avec le type sauvage *Vangl2*^{+/+} révèle des défauts sévères seulement dans l'OHC3 (P=0.0001). Les autres couches, IHC, OHC1 et OHC2 ne sont pas affectées significativement. Chez l'homozygote toutes les couches de cellules ciliées de l'organe de

Corti sont significativement désorientées ($P < 0.0001$) (Figure 18B, C; page 60). Lors de la dissection des oreilles internes nous avons remarqué que la taille de l'oreille interne (incluant cochlée et système vestibulaire) est réduite chez les homozygotes ($Vangl2^{I268N/I268N}$) par comparaison aux oreilles internes des embryons de type sauvage et embryons hétérozygotes ($Vangl2^{+/+}$ et $Vangl2^{+/I268N}$) (Figure 18A; page 60). Nous avons aussi remarqué une réduction du nombre de couches cellulaires chez les embryons $Curly\ Bob^{I268N/I268N}$ par comparaison avec $Curly\ Bob^{+/I268N}$ et $Curly\ Bob^{+/+}$ (Figure 18D; page 60)

En parallèle, nous voulions investiguer si une complémentation se trouve entre $Vangl2^{I268N}$ et $Vangl2^{S464N}$. Dans ce but nous avons croisé des hétérozygotes $Curly\ Bob^{+/I268N}$ avec des hétérozygotes $Lp^{+/S464N}$. Parmi les 15 embryons hétérozygotes composite ($Vangl2^{I268N/S464N}$), un embryon avait une apparence normale avec fermeture complète du tube neural alors que les 14 autres embryons souffraient tous d'une ouverture complète du tube neural, une craniorashischisis (Tableau II, Figure 16E; page 55 et 56 respectivement). Aucune ATN n'a été détectée chez les 11 embryons $Vangl2^{+/I268N}$ et les 16 embryons $Vangl2^{+/S464N}$ (Tableau II; page 55).

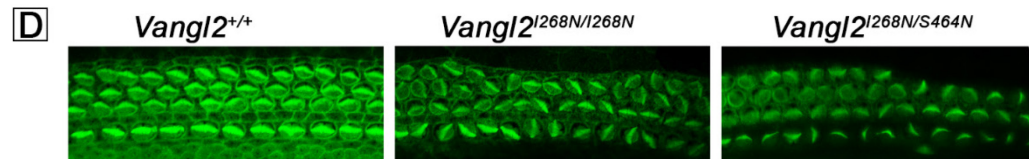
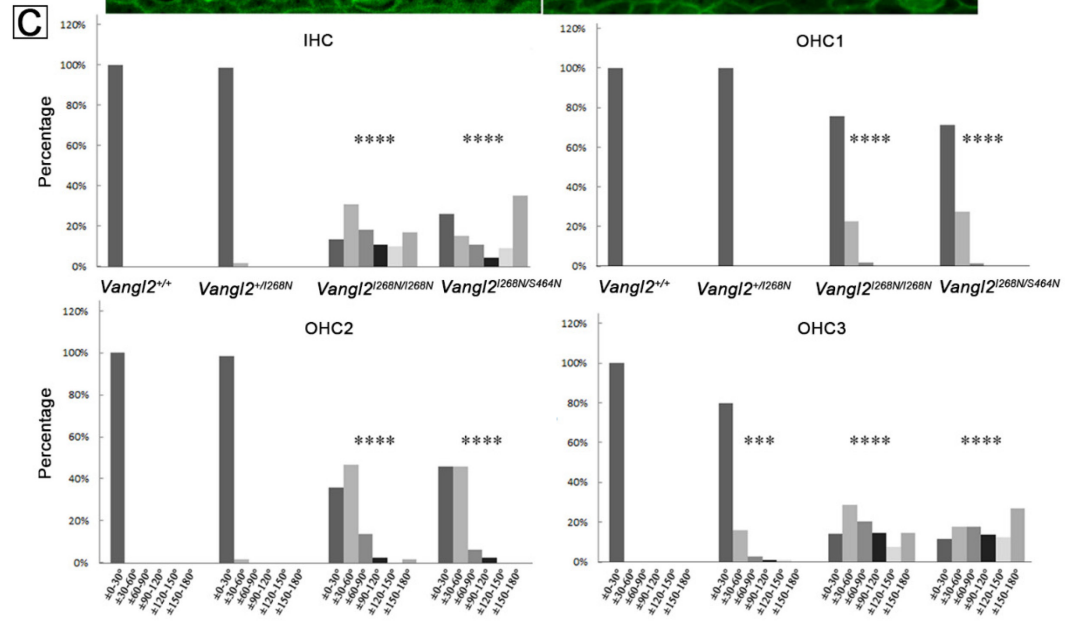
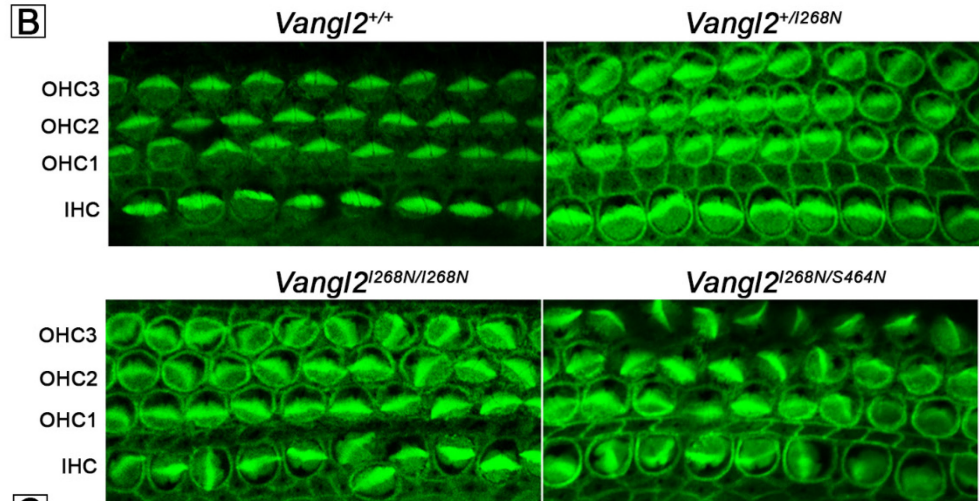
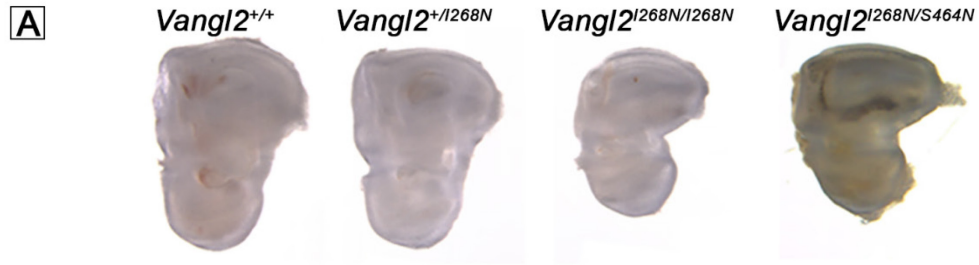


Figure 18. Une analyse de l'orientation des cellules ciliées de la cochlée chez les mutants de *Vangl2*^{I268N} et les hétérozygotes composites *Vangl2*^{I268N/S464N}. (A) Les oreilles internes d'embryons *Vangl2*^{I268N/I268N} et *Vangl2*^{I268N/S464N} E18,5 sont plus petites que celles de leurs compagnons de portée hétérozygotes et wild-type. (B) Immunohistochimie sur les cellules ciliées utilisant la phalloïdine-AF488 pour marquer la F-actine, montrant des différences significatives dans l'orientation des cellules chez *Vangl2*^{I268N/I268N} et *Vangl2*^{I268N/S464N} en comparaison avec les compagnons de portée wild-type. Des défauts de polarité ont été observés dans l'OHC3 chez les hétérozygotes *Vangl2*^{+/I268N}. (C) Quantification de l'orientation des cellules ciliées dépendamment du génotype et du type de cellule (OHC1, OHC2, OHC3 and IHC; Outer and Inner Hair Cells). *** P<0.001; ****P<0.0001. (D) Quelques régions dans la cochlée manquent une rangée de cellules chez *Vangl2*^{I268N/I268N} comme chez *Vangl2*^{I268N/S464N} en comparaison avec les compagnons de portée wild-type. Ce phénotype n'est pas détecté chez les hétérozygotes *Vangl2*^{+/I268N}.

Dans l'oreille interne, les hétérozygotes composites (*Vangl2*^{I248N/S464N}) développent des défauts sévères dans l'orientation des cellules ciliées et ce, par comparaison avec des compagnons de portée d'espèce sauvage (Figure 18B, C; page 60). L'orientation des cellules de la troisième couche externe (OHC3) et de la couche ciliée interne (IHC), est significativement altérée. Ces défauts sont présents, mais moins sévères dans la première et deuxième couche externe (OHC1 et OHC2) (Figure 18C; page 60). Une diminution de la taille de l'oreille interne a été remarquée accompagnée d'une réduction du nombre des couches de cellules ciliées (Figure 18A, D; page 60). Ces deux phénotypes ne se trouvaient pas chez les compagnons de portée hétérozygotes (Figure 18).

L'orientation des cellules dans l'épithélium sensoriel de l'ampoule postérieure a été aussi étudiée par immunohistochimie avec un anticorps contre la spectrine (anti-spectrin alpha chain). L'absence de cette protéine dans le kinocilium rend le calcul de l'orientation des cellules assez facile (Figure 19A, page 63). L'axe PCP dans ces cellules est considéré

perpendiculaire à l'axe de l'épithélium sensoriel de l'ampoule dans une direction postérieure; vers le canal semicirculaire (Figure 19A, page 63). Nous avons par la suite calculé le degré de désorientation des cellules par rapport à l'axe de la PCP avec des histogrammes polaires (Figure 19C, page 63). Chez les animaux de type sauvage *Vangl2*^{+/+}, l'orientation de la majorité des cellules tombe dans une valeur de 0 à ±30° de déviation de l'axe PCP, tandis que chez les embryons *Vangl2*^{+/*I268N*} et *Vangl2*^{*I268N/I268N*} l'orientation était sévèrement affectée, avec seulement une fraction des cellules qui tombe dans les valeurs normales et la majorité des cellules qui se trouvent à l'extérieur de ces angles et aléatoirement orientées (entre ±30° et ±180°) (**P<0.0001) (Figure 19B, C; page 63). L'orientation des cellules ciliées de l'ampoule postérieure est sévèrement affectée chez les embryons *Vangl2*^{*I268N/S464N*} aussi (Figure 19B, C; page 63).

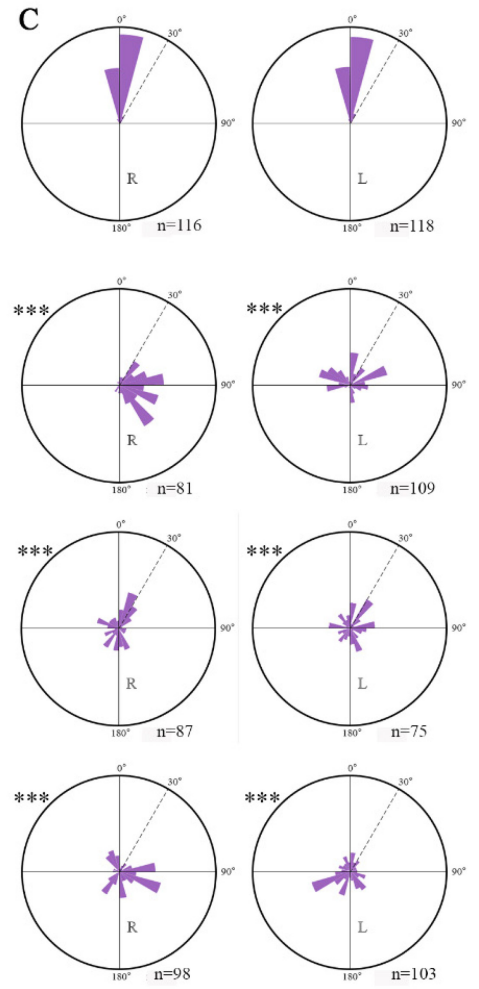
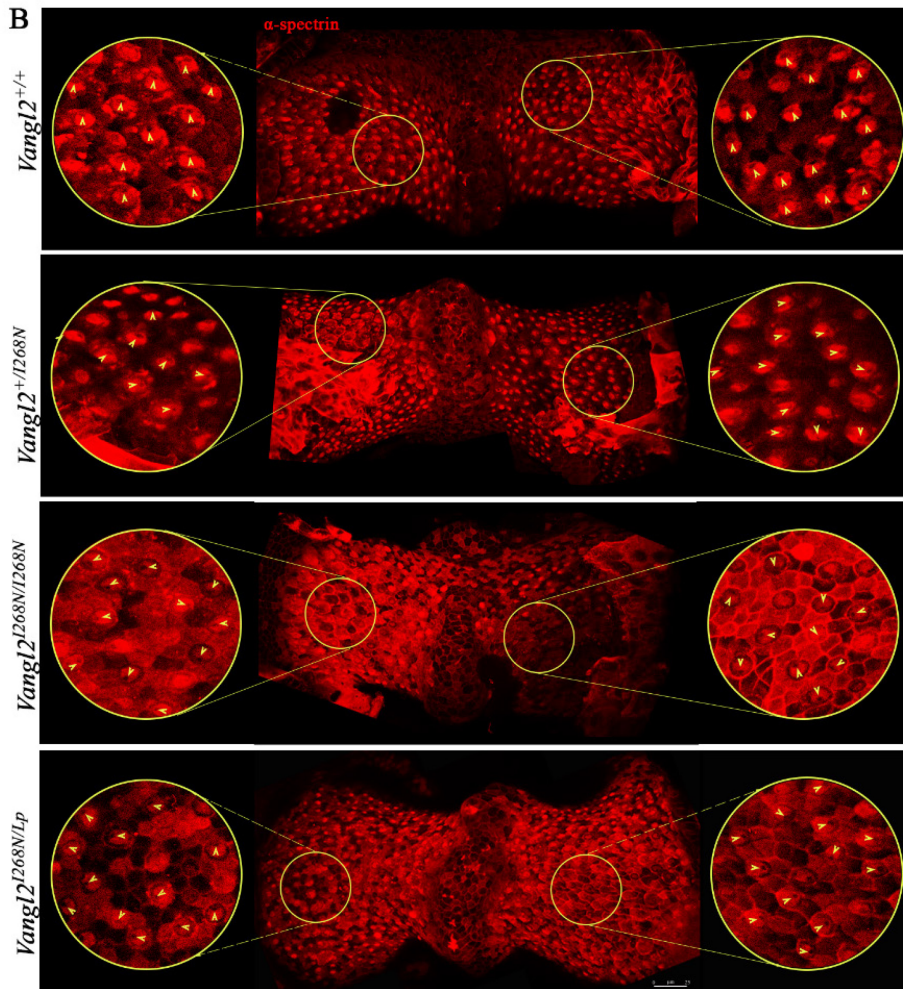
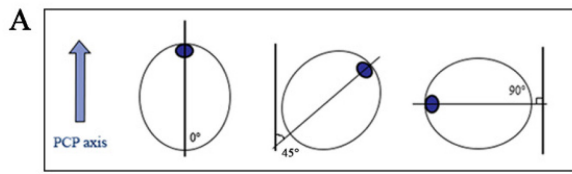


Figure 19. Analyse de l'orientation des cellules ciliées de l'ampoule postérieure chez les mutants de *Vangl2*^{I268N} et les hétérozygotes composites *Vangl2*^{I268N/S464N}. (A) Un diagramme explique la méthode par laquelle l'orientation des cellules a été calculée. (B) Immunohistochimie contre α -spectrin, montrant les cellules mais pas le kinocilium. Des défauts d'orientation sévères sont visible dans les ampoules postérieures de mutant *Vangl2*^{+/I268N}, *Vangl2*^{I268N/I268N} and *Vangl2*^{I268N/S464N} chez des embryons E18,5 par comparaison à leurs compagnons de portée wild-type. Le bleu montre l'emplacement du kinocilium dans la cellule. (C) Des histogrammes polaires pour les côtés droits et gauches de chaque ampoule ont été générés pour les embryons wild-types et mutants. R: Droite, L: Gauche.

5. Discussion:

5.1. *Curly Bob* représente un nouvel allèle de *Vangl2*

Dans ce projet nous étions capables d'identifier un nouvel allèle de *Vangl2*. Nous caractérisons l'allèle *Vangl2*^{I268N} comme responsable de défauts de développement embryonnaire suite à un déséquilibre dans la signalisation de la PCP chez la souris. Cette mutation agit de façon semi-dominante, causant une queue bouclée chez les souris portant un seul allèle muté et un craniorashischisis chez les souris homozygotes. Trois autres allèles étudiées, *Vangl2*^{S464N}, *Vangl2*^{D255E} et *Vangl2*^{m1Yzcm}, agissent de façon similaire^{84, 150}. Par contre cette mutante démontre des différences phénotypiques par comparaison aux autres allèles décrits. Les souris adultes hétérozygotes développent deux phénotypes, secouement de tête et un comportement de tours en rond. Le 'secouement de tête' a déjà été détecté dans d'autres mutantes de *Vangl2* mais le 'comportement de tours en rond' peut indiquer un défaut plus sévère du système vestibulaire. Nous avons montré que les cellules ciliées de l'ampoule postérieure faisant partie du système vestibulaire sont désorientées chez les hétérozygotes

Vangl2^{+/*I268N*}, révélant un déséquilibre dans la PCP chez ces animaux. Ce phénotype a été décrit auparavant chez des mutantes de *Vangl2* mais toujours chez les embryons homozygotes, et aussi chez les mutants *Fzd3*^{-/-};*Fzd6*^{-/-122}. Afin de mieux comprendre l'origine du déséquilibre, des études additionnelles seraient nécessaires. Nous n'avons pas investigué le système reproductif mais nous pensons que des malformations du système reproductif se développent chez les femelles hétérozygotes. Justement, une étude sur le développement du tractus reproductif chez des femelles (FRT) *Looptail* (*Lp*^{*S464N*}) démontre que la forme typique (cylindrique) des cellules de l'épithélium utérin est perdue, l'épithélium accumule des couches de cellules plus arrondies et sa polarité apico-basale est affectée¹⁵⁴ (*Scrib1* n'est plus restreint dans le côté basolatéral des cellules). De plus, ils montrent dans cette étude que les cornes utérines sont plus petites (en liaison avec la CE défectueuse) et ne se fusionnent pas au niveau du cervix^{154, 171}. Dans la nouvelle mutante nous avons détecté l'absence d'une ouverture vaginale chez 17,7% des femelles hétérozygotes (*Vangl2*^{+/*I268N*}). Ce même phénotype se trouve chez à peu près 50% des femelles hétérozygotes *Looptail* (*Vangl2*^{*S464N*})¹⁷¹. Cette différence permet de mieux gérer la colonie et de la maintenir, faisant de cette nouvelle mutante un outil précieux pour des études futures sur la signalisation PCP dans la formation du système reproductif, tube neural et système sensoriel de l'oreille interne. La diminution du nombre de rangées de cellules ciliées de l'Organe de Corti chez les homozygotes de la nouvelle mutante (*Vangl2*^{*I268N/I268N*}) et les hétérozygotes composites (*Vangl2*^{*I268N/S464N*}) par comparaison à leurs compagnons de portée d'espèce sauvage, est une autre différence phénotypique. Généralement les études sur des mutantes de la voie PCP (comme *Vangl2*^{*S464N/S464N*}, *Vangl2*^{+/*S464N*}/*Testin*^{-/-} et *Fz3*^{-/-}/*Fz6*^{-/-}) ont remarquées des cellules ciliées ectopiques additionnelles ou une augmentation du nombre de rangées cellulaires ciliées dans

l'Organe de Corti^{119, 122, 165}. Ces différences dans l'expression du phénotype probablement reflètent la présence de modificateurs génétiques qui dépendent de la lignée de souris dans laquelle la mutante spécifique a été générée.

5.2. Vangl2^{I268N} ne se rend pas à la membrane plasmique

L'isoleucine est un acide aminé hydrophobe qui préfère rester caché dans les régions hydrophobes d'une protéine alors que l'asparagine est polaire et préfère rester à la surface d'une protéine, exposée à l'eau. Cela représente un grand changement qui peut affecter la structure de la protéine. De plus la concordance du phénotype avec le génotype (93% des embryons homozygotes développent un craniorashischisis) suggère fortement que la mutation non-synonyme à la position T803 de *Vangl2* est responsable directement ou indirectement du phénotype observé. L'analyse de l'expression de Vangl2 dans le tissu du système nerveux par immunobuvardage de type western et par immunofluorescence montre une diminution de l'expression de la protéine. Afin d'investiguer l'effet de la mutation sur le transport et la demi-vie de la protéine, nos collaborateurs du laboratoire de Phillippe Gros (*Vicky Leung*) ont reconstruit la mutation dans hVangl1-GFP-Myc. Les protéines Vangl1 et Vangl2 sont, du point de vue fonctionnel, équivalentes^{88, 144, 152, 155, 172, 173}. Leurs résultats, suite à la génération de cellules MDCK stablement transfectées par cette construction, montrent que la protéine reste dans le cytoplasme et n'atteint pas la membrane plasmique de la cellule. Une colocalisation de hVangl2-268 avec la calréticuline, un marqueur de la membrane du RE est remarquable. De plus, cette construction est absente de la membrane plasmique (pas de colocalisation avec le marquage de la Na⁺,K⁺-ATPase). En parallèle, une construction contenant la mutation D255E dans hVangl1-GFP-Myc est aussi stablement transfectée dans

des MDCK et montre une expression similaire à celle vue avec la mutante I268N. Les analyses de demi-vie utilisant la cyclohexamide afin d'inhiber la traduction des protéines, montrent que la nouvelle mutante affecte fortement la demi-vie de la protéine par rapport à la protéine non-mutée. Ces analyses démontrent que la mutation I268N sur Vangl2 affecte le ciblage de Vangl2 (rétention dans le RE) et sa stabilité. Cette variante est, du point de vue moléculaire et fonctionnel, identique à Vangl2-D255E et par extension à Vangl2-S464N. Comme les deux dernières variantes de Vangl2, I268N est probablement dégradée par la voie du protéasome, mais cela reste à être démontré^{89, 152, 174}. Une étude par Merte et al., montre que Sec24b un composant des vésicules COPII responsables du transport entre le RE et Appareil de Golgi, n'est pas capable d'interagir avec Vangl2-D255E ni Vangl2-S464N¹⁶⁴. Vu que Vangl2-I268N est identique du point de vue moléculaire et biochimique à D255E et S464N, nous supposons que Sec24b n'est pas capable d'interagir non plus avec Vangl2-I268N.

5.3. *Vangl2*^{I268N} affecte l'interaction de VANGL2 avec DVL3

Ces changements (S464N et D255E) empêchent Vangl2 d'interagir physiquement avec la famille de protéines dishevelled (Dvl1, Dvl2 et Dvl3)¹⁷³ dans le système double hybride de la levure. Dans cette étude, nous avons utilisé Vangl2-S464N comme control pour la perte d'interaction avec Dvl3. Cette perte d'interaction a été reproduite avec la nouvelle mutation (I268N) introduite dans Vangl2.

Vangl est une protéine avec quatre domaines transmembranaires. Sa partie C-terminale hautement conservée dans plusieurs espèces, contient la plupart des mutations associées avec le phénotype *looptail*. De plus la majorité des mutations dans *hVangl* trouvées chez des

patients souffrant d'ATN se trouvent dans la partie C-terminale de la protéine. La nouvelle mutation (Vangl2-I268N) se trouve aussi dans la partie C-terminale. Le domaine de liaison au PDZ, PBM est indispensable pour la liaison avec Scrib et Dvl, des protéines qui contiennent des domaines PDZ. Une délétion du PBM sur Vangl2 abolie l'interaction avec Scrib1^{175, 176}. De façon intéressante nous démontrons dans cette étude que la mutation S464N (Vangl2-S464N) qui est proche du PBM perd son interaction avec Scrib1. Par contre Vangl2-I268N ne perd pas cette interaction. La situation est différente dans le cas de Dvl, où l'interaction avec Vangl2 cette fois-ci se fait par l'intermédiaire du PBM mais aussi par d'autres éléments se trouvant dans la partie C-terminale. L'interaction des protéines de la famille dishevelled est perdue aussi dans plusieurs allèle de mVangl2 (S464N, D255E)¹⁷³ mais aussi avec les variantes humaines de Vangl2 (R353C, F437S)⁸⁵ et Vangl1 (V239I). La nouvelle variante, I268N, aussi affecte l'interaction de Vangl2 avec Dvl3.

En se basant sur les résultats de notre étude, Vangl2 I268/Vangl1 I272 peut être considérée critique pour la fonction de la protéine et le développement du tube neural. Aucune variante humaine de Vangl2 dans cette position n'a été répertoriée dans ExAC, ce qui renforce encore plus notre résultat. De façon similaire aucune mutation n'a été répertoriée dans le motif de transport TGN (VANGL2 280-283; VANGL1 284-287), suggérant qu'un variant dans ces positions hautement conservées cause une létalité prénatale, empêchant par ce fait leur apparence dans les études de cohortes adultes.

6. Conclusion et perspectives :

Cette étude a permis l'identification d'une nouvelle souris mutante de Vangl2 générée par mutagenèse ENU. Cette mutante montre des caractéristiques phénotypiques très similaires à d'autres allèles de Vangl2 étudiés comme (Vangl2^{Lp}, Vangl2^{Lpm2jus}, Vangl2). Nous avons aussi remarqué des différences phénotypiques avec les mutants mentionnés, comme le "comportement de tours en ronds" et les anomalies au niveau du système vestibulaire chez l'hétérozygote et l'homozygote de cette mutante. Nous avons aussi montré qu'une interaction génétique existe entre Vangl2^{I268N} et Vangl2^{S464N} démontrant que ces deux allèles ont un effet similaire sur le fonctionnement de la protéine.

D'autres études seront nécessaires pour comprendre l'origine exact du comportement de tour en rond chez les hétérozygotes, vu que ce phénotype n'a pas été rapporté chez les souris *Looptail*. Ce comportement pourrait être originaire du cerveau, ou d'une désorientation plus sévère dans les organes du système vestibulaire comme utricule et saccule. On pourrait penser aussi que ce phénotype additionnel serait le résultat d'un effet pathogénique de la mutation I268N sur des interactions intracellulaires de Vangl2 avec des membres de la voie PCP ou autres.

Cette mutante (Vangl2^{I268N}) servira d'un outil pour comprendre la relation entre structure et fonction de Vangl2. Deux mutations indépendantes répertoriées (R270H dans *VANGL2* et R274Q dans *VANGL1*) chez des patients avec ATN et validées dans des essais fonctionnels, avec la nouvelle mutante caractérisée dans la présente étude, ramènent notre attention vers l'importance du motif LSIQR (dans lequel ces trois mutations se trouvent) dans la maturation des protéines Vangl et leur ciblage subséquent vers la membrane plasmique.

La mutagenèse à l'ENU représente un outil puissant dans l'étude des fonctions des gènes et l'établissement de modèles pour les maladies chez l'homme. Les différents allèles de *Vangl2* découverts, représentent une ressource génétique extrêmement utile afin de bien établir la fonction de ce gène dans la signalisation de la PCP et d'identifier des modificateurs des phénotypes de CE et de PCP dans le développement du tube neural, de l'oreille interne et du système reproducteur femelle.

Bibliographie

1. Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O. Textbook of Diabetes and Pregnancy, Third Edition: CRC Press; 2016. 547 p.
2. Li Z, Ren A, Zhang L, Ye R, Li S, Zheng J, et al. Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi Province, China. Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology. 2006;76(4):237-40.
3. Tuncbilek E, Boduroglu K, Alikasifoglu M. Neural tube defects in Turkey: prevalence, distribution and risk factors. The Turkish journal of pediatrics. 1999;41(3):299-305.
4. Teebi AS, al Saleh QA, Odeh H. Meckel syndrome and neural tube defects in Kuwait. Journal of medical genetics. 1992;29(2):140.
5. Hendricks KA, Simpson JS, Larsen RD. Neural tube defects along the Texas-Mexico border, 1993-1995. American journal of epidemiology. 1999;149(12):1119-27.
6. De Wals P, Rusen ID, Lee NS, Morin P, Niyonsenga T. Trend in prevalence of neural tube defects in Quebec. Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology. 2003;67(11):919-23.
7. Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, et al. Essentials of Stem Cell Biology: Elsevier Science; 2009. 680 p.
8. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology: Elsevier Health Sciences; 2014. 576 p.
9. Daniel R, Patrick C, Sylvie F, Nathalie G, Frédéric G, Patrick L, et al. Biologie-Tout le cours en fiches - 2e éd.: 300 fiches de cours, 300 QCM et bonus web. 2e édition ed: Dunod; 2012 oct 10 2012. 768 p.
10. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology: Elsevier/Saunders; 2013. 506 p.
11. Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. Molecular regulation of blastocyst formation. Animal reproduction science. 2004;82-83:583-92.
12. Foucrier J, Bassez G. Reproduction et Embryologie - UE2, 1re année Santé: Cours et QCM corrigés: Ediscience; 2010. 368 p.
13. André Beaumont PC, Daniel Richard. Biologie animale - Les Cordés-9éd: Anatomie comparée des vertébrés2009. 688 p.
14. Richard D, Chevalet P, Fournel S, Giraud N, Gros F, Laurenti P, et al. Biologie -Tout le cours en fiches: 300 fiches de cours, 270 QCM et bonus web: Dunod; 2015.
15. Webster S, de Wreede R. Embryology at a Glance: Wiley; 2016. 128 p.
16. Foucrier J, Franquinet R, Vervoort M. Atlas d'embryologie descriptive - 3e édition: Dunod; 2013. 160 p.
17. Mikawa T, Poh AM, Kelly KA, Ishii Y, Reese DE. Induction and patterning of the primitive streak, an organizing center of gastrulation in the amniote. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists. 2004;229(3):422-32.
18. Squire L, Bloom FE, Spitzer NC, Squire LR, Berg D, du Lac S, et al. Fundamental Neuroscience. 3 ed: Elsevier Science; 2008. 1280 p.

19. Mauriès J-P. Embryologie et embryogenèse 2017 [Available from: <http://www.vetopsy.fr/embryologie/embryologie.php#organogenese>.
20. Standring S. Gray's Anatomy E-Book: The Anatomical Basis of Clinical Practice: Elsevier Health Sciences; 2015.
21. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Human Molecular Genetics*. 2009;18(R2):R113-29.
22. Stocker JT, Dehner LP. *Pediatric Pathology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 1569 p.
23. Koob GF, Moal ML, Thompson RF. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*: Elsevier Science; 2010. 1816 p.
24. Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, et al. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mechanisms of development*. 1997;63(1):39-50.
25. Sidis Y, Schneyer AL, Sluss PM, Johnson LN, Keutmann HT. Follistatin: essential role for the N-terminal domain in activin binding and neutralization. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(21):17718-26.
26. Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoroventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*. 1996;86(4):589-98.
27. McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & Development*. 1998;12(10):1438-52.
28. Squire LR. *Fundamental Neuroscience*: Elsevier/Academic Press; 2013. 1127 p.
29. Davis AS, D'Amato RC. *Handbook of Pediatric Neuropsychology*: Springer Publishing Company; 2010. 1400 p.
30. India E. *Orthodontics: Diagnosis of and Management of Malocclusion and Dentofacial Deformities*: Elsevier India; 2011. 786 p.
31. Ybot-Gonzalez P1 CP, Gerrelli D, Copp AJ. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development*. 2002.
32. Zohn IE. Mouse as a model for multifactorial inheritance of neural tube defects. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2012;96(2):193-205.
33. Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris AJ. *Inborn Errors of Development: The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis*: Oxford University Press; 2004. 1082 p.
34. Hall BK. *The Neural Crest in Development and Evolution*: Springer New York; 2013. 313 p.
35. Théveneau E, Duband J-L, Altabef M. Ets-1 Confers Cranial Features on Neural Crest Delamination. *PLoS ONE*. 2007;2(11):e1142.
36. Milet C, Monsoro-Burq AH. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology*. 2012;366(1):22-33.
37. Hans J. ten Donkelaar ML, Akira Hori. *Clinical Neuroembryology: Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System* 2014 jun 16, 2014. 659 p.
38. Shimokita E, Takahashi Y. Secondary neurulation: Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Development, growth & differentiation*. 2011;53(3):401-10.
39. Janigro D. *Mammalian Brain Development*: Springer Science & Business Media; 2009 18-09-2009. 227 p.

40. O'Rahilly R, Muller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*. 2002;65(4):162-70.
41. Nakatsu T, Uwabe C, Shiota K. Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects. *Anatomy and embryology*. 2000;201(6):455-66.
42. Bhatnagar SC. *Neuroscience for the Study of Communicative Disorders*: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 440 p.
43. Sanes DH, Reh TA, Harris WA. *Development of the Nervous System*. 3e éd ed: Elsevier Science; 2011. 360 p.
44. Egan P. Folic acid may prevent neural tube defects 2011 [updated 2011. Available from: <http://www.pamelaegan.com/neural-tube-defects/>.
45. Dépistage prénatal d'anomalies congénitales: Laboratoire national de santé; luxembourg; [updated 2014-03-05. Available from: http://www.lns.public.lu/actualites/articles/2007/11/depistage_prenatal/index.html.
46. Morrow RJ MM, Whittle MJ. Ultrasound detection of neural tube defects in patients with elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Obstetrics gynecology*. 1991;78(6).
47. P. Lopes CP. *OBSTETRIQUE - DCEM & Sages Femmes: Heures de France*; 1991. 208 p.
48. Smith AD WN, Cuckle HS, Stirrat GM, Bobrow M, Lagercrantz H. Amniotic-fluid acetylcholinesterase as a possible diagnostic test for neural-tube defects in early pregnancy. *the Lancet*. 1979;1(8118).
49. Duttaroy AK, Basak S. *Early Nutrition and Lifestyle Factors: Effects on First Trimester Placenta*: Springer International Publishing; 2016. 159 p.
50. Litwack G. Folic acid and folates. Preface. *Vitamins and hormones*. 2008;79:xvii-xviii.
51. Milunsky A JH, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, Willett W. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA*. 1989;262(20).
52. Wald NS, J. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *the Lancet*. 1991;338(8760).
53. Wald NJ LM, Morris JK, Wald DS. Quantifying the effect of folic acid. *the Lancet*. 2001;358(9298).
54. Preedy VR, Srirajaskanthan R, Patel VB. *Handbook of Food Fortification and Health: From Concepts to Public Health Applications*: Springer New York; 2013. 461 p.
55. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. *Nutrients*. 2011;3(3):370-84.
56. Groenen PM PP, Wevers RA, Swinkels DW, Franke B, Mariman EC, Steegers-Theunissen RP. Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003;189(6).
57. Greene N, Copp A. Inositol prevents expression of a genetic model of neural tube defects in mice. *Nutrition reviews*. 1997;55(5):176-7.
58. P Cavalli AJC. Inositol and folate resistant neural tube defects. *Journal of medical genetics*. 2002;39.
59. Ray JG WP, Thompson MD, Vermeulen MJ, Meier C, Wong PY, Farrell SA, Cole DE. Vitamin B12 and the risk of neural tube defects in a folic-acid-fortified population. *Epidemiology*. 2007;18(3):6.

60. Miles D Thompson DECaJGR. Vitamin B-12 and neural tube defects: the Canadian experience. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;89(2).
61. Bromley RL, Baker GA, Meador KJ. Cognitive abilities and behaviour of children exposed to antiepileptic drugs in utero. *Current opinion in neurology*. 2009;22(2):162-6.
62. Meador K, Reynolds MW, Crean S, Fahrbach K, Probst C. Pregnancy outcomes in women with epilepsy: a systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. *Epilepsy research*. 2008;81(1):1-13.
63. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2009;28(1):1-10.
64. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic Acid Antagonists during Pregnancy and the Risk of Birth Defects. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(22):1608-14.
65. Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR. Development of the choroid plexus. *Microscopy research and technique*. 2001;52(1):5-20.
66. Parada C, Martin C, Alonso MI, Moro JA, Bueno D, Gato A. Embryonic cerebrospinal fluid collaborates with the isthmic organizer to regulate mesencephalic gene expression. *Journal of neuroscience research*. 2005;82(3):333-45.
67. Miyajima JA, Nabiyouni M, Zindah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2003;81(4):317-28.
68. Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2006;13(1):2-10.
69. Manning SM, Jennings, R. and Madsen, J. R. Pathophysiology, prevention, and potential treatment of neural tube defects. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. 2000(6):6-14.
70. Gelineau-Van Waas J, Finnell RH. Importance of model organisms in understanding the biology and genetic basis of human nonsyndromic neural tube defects. *Teratology*. 2001;64(4):177-80.
71. Lynch SA. Non-multifactorial neural tube defects. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2005;135c(1):69-76.
72. Rampersaud E, Bassuk A, Enterline D, George T, Siegel D, Melvin E, et al. Whole genomewide linkage screen for neural tube defects reveals regions of interest on chromosomes 7 and 10. *Journal of medical genetics*. 2005;42(12):940-6.
73. Stamm DS, Siegel DG, Mehlretter L, Connelly JJ, Trott A, Ellis N, et al. Refinement of 2q and 7p loci in a large multiplex NTD family. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2008;82(6):441-52.
74. Stamm DS, Rampersaud E, Slifer SH, Mehlretter L, Siegel DG, Xie J, et al. High Density SNP Screen in A Large Multiplex Neural Tube Defect Family Refines Linkage to Loci at 7p21-Pter And 2q33.1-35. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2006;76(6):499-505.
75. Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clinical genetics*. 2007;71(4):295-310.
76. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*. 1995;10(1):111-3.
77. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, et al. The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An

evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *American journal of human genetics*. 1999;64(4):1045-55.

78. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Arata L, Merello E, Finnell RH, et al. Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *Journal of human genetics*. 2002;47(6):319-24.

79. Beaudin AE, Stover PJ. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: a minireview. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2009;85(4):274-84.

80. Molloy AM, Brody LC, Mills JL, Scott JM, Kirke PN. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2009;85(4):285-94.

81. Seller MJ. *Neural Tube Defects (Ciba Foundation Symposium 181)*. John Wiley and Sons, Chichester. 1994.

82. Wallingford JB, Harland RM. *Xenopus* Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis. *Development*. 2001;128(13):2581-92.

83. Darken RS, Scola AM, Rakeman AS, Das G, Mlodzik M, Wilson PA. The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *The EMBO journal*. 2002;21(5):976-85.

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

85. Lei Y-P, Zhang T, Li H, Wu B-L, Jin L, Wang H-Y. *VANGL2* Mutations in Human Cranial Neural-Tube Defects. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(23):2232-5.

86. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, et al. Mutations in *VANGL1* Associated with Neural-Tube Defects. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(14):1432-7.

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

88. Iliescu A, Gros P. The intracellular carboxyl terminal domain of *Vangl* proteins contains plasma membrane targeting signals. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2014;23(4):337-43.

89. Iliescu A, Gravel M, Horth C, Gros P. Independent mutations at Arg181 and Arg274 of *Vangl* proteins that are associated with neural tube defects in humans decrease protein stability and impair membrane targeting. *Biochemistry*. 2014;53(32):5356-64.

90. 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*. 2004;131(8):1663-77.

91. Nam JS, Turcotte TJ, Smith PF, Choi S, Yoon JK. Mouse *crispin/R-spondin* family proteins are novel ligands for the *Frizzled 8* and *LRP6* receptors and activate *beta-catenin*-dependent gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(19):13247-57.

92. Ho HY, Susman MW, Bikoff JB, Ryu YK, Jonas AM, Hu L, et al. *Wnt5a-Ror-Dishevelled* signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(11):4044-51.

93. Macheda ML, Sun WW, Kugathasan K, Hogan BM, Bower NI, Halford MM, et al. The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(35):29312-23.
94. Banerjee S, Gordon L, Donn TM, Berti C, Moens CB, Burden SJ, et al. A novel role for MuSK and non-canonical Wnt signaling during segmental neural crest cell migration. *Development*. 2011;138(15):3287-96.
95. Berger H, Wodarz A, Borchers A. PTK7 Faces the Wnt in Development and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017;5.
96. Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S, et al. R-Spondin Family Members Regulate the Wnt Pathway by a Common Mechanism. *Molecular Biology of the Cell*. 2008;19(6):2588-96.
97. Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford TJ, Mieszczanek J, Bienz M. Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(5):1937-42.
98. Henderson BR, Fagotto F. The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. *EMBO Reports*. 2002;3(9):834-9.
99. Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, Henderson BR. Specific Armadillo Repeat Sequences Facilitate β -Catenin Nuclear Transport in Live Cells via Direct Binding to Nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(2):819-31.
100. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4(11).
101. Archbold HC, Broussard C, Chang MV, Cadigan KM. Bipartite recognition of DNA by TCF/Pangolin is remarkably flexible and contributes to transcriptional responsiveness and tissue specificity of wntless signaling. *PLoS genetics*. 2014;10(9):e1004591.
102. Giese K, Amsterdam A, Grosschedl R. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes & Development*. 1991;5(12b):2567-78.
103. Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes & Development*. 1991;5(5):880-94.
104. Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosschedl R, Wright PE. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*. 1995;376(6543):791-5.
105. Kim CH, Oda T, Itoh M, Jiang D, Artinger KB, Chandrasekharappa SC, et al. Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature*. 2000;407(6806):913-6.
106. Merrill BJ, Pasolli HA, Polak L, Rendl M, Garcia-Garcia MJ, Anderson KV, et al. Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development*. 2004;131(2):263-74.
107. Liu J, Wu X, Mitchell B, Kintner C, Ding S, Schultz PG. A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2005;44(13):1987-90.
108. Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1(-/-)* mice. *Genes & Development*. 2002;16(24):3173-85.

109. Najdi R, Syed A, Arce L, Theisen H, Ting JH, Atcha F, et al. A Wnt kinase network alters nuclear localization of TCF-1 in colon cancer. *Oncogene*. 2009;28(47):4133-46.
110. Lawrence PA, Shelton PM. The determination of polarity in the developing insect retina. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1975;33(2):471-86.
111. Vinson CR, Adler PN. Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature*. 1987;329(6139):549-51.
112. Singh J, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2012;1(4):479-99.
113. Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M. Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *The EMBO journal*. 2003;22(17):4409-20.
114. Lawrence PA, Casal J, Struhl G. Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of *Drosophila*. *Development*. 2004;131(19):4651-64.
115. Tree DR, Ma D, Axelrod JD. A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13(3):217-24.
116. McNeill H. Planar Cell Polarity: Keeping Hairs Straight Is Not So Simple. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(2).
117. Adler PN. Planar Signaling and Morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Cell*. 2002;2(5):525-35.
118. Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, Wolf V, Montcouquiol M, Sassoon DA, et al. Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development*. 2003;130(11):2375-84.
119. Montcouquiol M, Kelley MW. Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(28):9469-78.
120. Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature*. 2003;423(6936):173-7.
121. Guo N, Hawkins C, Nathans J. Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(25):9277-81.
122. 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. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(8):2147-56.
123. Antic D, Stubbs JL, Suyama K, Kintner C, Scott MP, Axelrod JD. Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One*. 2010;5(2):e8999.
124. Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel KP, et al. *Wnt5a* functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol*. 2007;306(1):121-33.
125. Sokol SY. Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Current biology : CB*. 1996;6(11):1456-67.
126. Tada M, Smith JC. *Xwnt11* is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development*. 2000;127(10):2227-38.
127. Wallingford JB, Rowning BA, Vogeli KM, Rothbacher U, Fraser SE, Harland RM. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature*. 2000;405(6782):81-5.

128. Morgan R, El-Kadi AM, Theokli C. Flamingo, a cadherin-type receptor involved in the *Drosophila* planar polarity pathway, can block signaling via the canonical wnt pathway in *Xenopus laevis*. *The International journal of developmental biology*. 2003;47(4):245-52.
129. Carreira-Barbosa F, Kajita M, Morel V, Wada H, Okamoto H, Martinez Arias A, et al. Flamingo regulates epiboly and convergence/extension movements through cell cohesive and signalling functions during zebrafish gastrulation. *Development*. 2009;136(3):383-92.
130. Goto T, Davidson L, Asashima M, Keller R. Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Current biology : CB*. 2005;15(8):787-93.
131. Jessen K, Mirsky R. Signals that determine Schwann cell identity. *Journal of Anatomy*. 2002;200(4):367-76.
132. Park M, Moon RT. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nature cell biology*. 2002;4(1):20-5.
133. Tao H, Suzuki M, Kiyonari H, Abe T, Sasaoka T, Ueno N. Mouse *prickle1*, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(34):14426-31.
134. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. Zebrafish *prickle*, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Current biology : CB*. 2003;13(8):680-5.
135. Song H, Hu J, Chen W, Elliott G, Andre P, Gao B, et al. Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature*. 2010;466(7304):378-82.
136. Hashimoto M, Shinohara K, Wang J, Ikeuchi S, Yoshida S, Meno C, et al. Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nature cell biology*. 2010;12(2):170-6.
137. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS biology*. 2006;4(4):e115.
138. Kuhl 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*. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(17):12701-11.
139. Nalesso G, Sherwood J, Bertrand J, Pap T, Ramachandran M, De Bari C, et al. WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *The Journal of Cell Biology*. 2011;193(3):551-64.
140. Niu LJ, Xu RX, Zhang P, Du MX, Jiang XD. Suppression of Frizzled-2-mediated Wnt/Ca(2)(+) signaling significantly attenuates intracellular calcium accumulation in vitro and in a rat model of traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2012;213:19-28.
141. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003;5(3):367-77.
142. Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang HY. Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5600):2006-10.
143. Lei Y, Finnell RH. New Techniques for the Study of Neural Tube Defects. *Advanced techniques in biology & medicine*. 2016;4(1).
144. Reynolds A, McDermid JR, Lachance S, De Marco P, Merello E, Capra V, et al. VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish. *Mechanisms of development*. 2010;127(7-8):385-92.

145. Lei Y, Zhu H, Yang W, Ross ME, Shaw GM, Finnell RH. Identification of Novel CELSR1 Mutations in Spina Bifida. *PLoS One*. 2014;9(3).
146. Lei Y, Zhu H, Duhon C, Yang W, Ross ME, Shaw GM, et al. Mutations in planar cell polarity gene SCRIB are associated with spina bifida. *PLoS One*. 2013;8(7):e69262.
147. Greene ND, Copp AJ. Mouse models of neural tube defects: investigating preventive mechanisms. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2005;135c(1):31-41.
148. Gray JD, Ross ME. Mechanistic insights into folate supplementation from Crooked tail and other NTD-prone mutant mice. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2009;85(4):314-21.
149. Plows JF, Budin F, Andersson RA, Mills VJ, Mace K, Davidge ST, et al. The Effects of Myo-Inositol and B and D Vitamin Supplementation in the db/+ Mouse Model of Gestational Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2017;9(2).
150. Kibar Z, Underhill DA, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Justice MJ, Gros P. Identification of a new chemically induced allele (Lp(m1Jus)) at the loop-tail locus: morphology, histology, and genetic mapping. *Genomics*. 2001;72(3):331-7.
151. Guyot MC, Bosoi CM, Kharfallah F, Reynolds A, Drapeau P, Justice M, et al. A novel hypomorphic Looptail allele at the planar cell polarity Vangl2 gene. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2011;240(4):839-49.
152. Iliescu A, Gravel M, Horth C, Kibar Z, Gros P. Loss of membrane targeting of Vangl proteins causes neural tube defects. *Biochemistry*. 2011;50(5):795-804.
153. Devenport D, Fuchs E. Planar Polarization in Embryonic Epidermis Orchestrates Global Asymmetric Morphogenesis of Hair Follicles. *Nature cell biology*. 2008;10(11):1257-68.
154. Vandenberg AL, Sassoon DA. Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development via van gogh-like 2. *Development*. 2009;136(9):1559-70.
155. Torban E, Patenaude AM, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G, et al. Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(9):3449-54.
156. Leung V, Iliescu A, Jolicoeur C, Gravel M, Apuzzo S, Torban E, et al. The planar cell polarity protein Vangl2 is required for retinal axon guidance. *Developmental neurobiology*. 2016;76(2):150-65.
157. Greene ND, Gerrelli D, Van Straaten HW, Copp AJ. Abnormalities of floor plate, notochord and somite differentiation in the loop-tail (Lp) mouse: a model of severe neural tube defects. *Mechanisms of development*. 1998;73(1):59-72.
158. Etheridge SL, Ray S, Li S, Hamblet NS, Lijam N, Tsang M, et al. Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS genetics*. 2008;4(11):e1000259.
159. Yu H, Smallwood PM, Wang Y, Vidaltamayo R, Reed R, Nathans J. Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes. *Development*. 2010;137(21):3707-17.
160. Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanch B, Copp AJ, et al. Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Current biology : CB*. 2003;13(13):1129-33.

161. Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, et al. Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Human Molecular Genetics*. 2003;12(2):87-98.
162. Murdoch JN, Doudney K, Paternotte C, Copp AJ, Stanier P. Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of Lpp1, a novel gene involved in floor plate specification. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(22):2593-601.
163. Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 2004;430(6995):93-8.
164. Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, Schekman R, et al. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nature cell biology*. 2010;12(1):41-8.
165. Ren D-D, Kelly M, Kim SM, Grimsley-Myers CM, Chi F-L, Chen P. Testin interacts with vangl2 genetically to regulate inner ear sensory cell orientation and the normal development of the female reproductive tract in mice. *Developmental Dynamics*. 2013;242(12):1454-65.
166. Denman-Johnson K, Forge A. Establishment of hair bundle polarity and orientation in the developing vestibular system of the mouse. *Journal of neurocytology*. 1999;28(10-11):821-35.
167. Guo Y. A novel GTP-binding protein–adaptor protein complex responsible. 2013;2.
168. Yates LL, Schnatwinkel C, Hazelwood L, Chessum L, Paudyal A, Hilton H, et al. Scribble is required for normal epithelial cell-cell contacts and lumen morphogenesis in the mammalian lung. *Dev Biol*. 2013;373(2):267-80.
169. Kharfallah F, Guyot MC, El Hassan AR, Allache R, Merello E, De Marco P, et al. Scribble1 plays an important role in the pathogenesis of neural tube defects through its mediating effect of Par-3 and Vangl1/2 localization. *Human Molecular Genetics*. 2017;26(12):2307-20.
170. Robinson A. Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect, craniorachischisis. 2012;33(2):440-7.
171. Strong L. C. HWF. Hereditary loop-tail in the house mouse accompanied by imperforate vagina and with lethal craniorachischisis when homozygous. *J Hered*. 1949(40):329-34.
172. Jessen JR, Solnica-Krezel L. Identification and developmental expression pattern of van gogh-like 1, a second zebrafish strabismus homologue. *Gene expression patterns : GEP*. 2004;4(3):339-44.
173. Torban E, Wang HJ, Groulx N, Gros P. Independent mutations in mouse Vangl2 that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(50):52703-13.
174. Gravel M, Iliescu A, Horth C, Apuzzo S, Gros P. Molecular and cellular mechanisms underlying neural tube defects in the loop-tail mutant mouse. *Biochemistry*. 2010;49(16):3445-55.
175. Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, et al. Asymmetric Localization of Vangl2 and Fz3 Indicate Novel Mechanisms for Planar Cell Polarity in Mammals. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(19):5265-75.

176. Kallay LM, McNickle A, Brennwald PJ, Hubbard AL, Braiterman LT. Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;99(2):647-64.