

Université de Montréal

**Analyse génétique moléculaire du gène de la voie non-
canonique Frizzled/Dishevelled *PRICKLE1* dans les
anomalies du tube neural chez l'humain**

par

Marius Ciprian Bosoi

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc
en Sciences Biomédicales, option générale

Août, 2011

© Marius Ciprian Bosoi, 2011

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé:

Analyse génétique moléculaire du gène de la voie non-canonique Frizzled/Dishevelled
PRICKLE1 dans les anomalies du tube neural chez l'humain

Présenté par :
Marius Ciprian Bosoi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Julien Ghislain
Président-rapporteur

Dr. Zoha Kibar
Directeur de recherche

Dr. Edward Ruthazer
Membre du jury

Résumé

La voie de la polarité planaire cellulaire (PCP), aussi connue sous le nom de la voie non-canonique du Frizzled/Dishevelled, contrôle le processus morphogénétique de l'extension convergente (CE) qui est essentiel pour la gastrulation et la formation du tube neural pendant l'embryogenèse. La signalisation du PCP a été récemment associée avec des anomalies du tube neural (ATN) dans des modèles animaux et chez l'humain. Prickle1 est une protéine centrale de la voie PCP, exprimée dans la ligne primitive et le mésoderme pendant l'embryogenèse de la souris. La perte ou le gain de fonction de Prickle1 mène à des mouvements de CE fautifs chez le poisson zèbre et la grenouille. PRICKLE1 interagit directement avec deux autres membres de la voie PCP, Dishevelled et Strabismus/Vang. Dans notre étude, nous avons investigué le rôle de *PRICKLE1* dans l'étiologie des ATN dans une cohorte de 810 patients par le re-séquençage de son cadre de lecture et des jonctions exon-intron. Le potentiel pathogénique des mutations ainsi identifiées a été évalué par des méthodes bioinformatiques, suivi par une validation fonctionnelle *in vivo* dans un système poisson zèbre. Nous avons identifié dans notre cohorte un total de 9 nouvelles mutations dont sept: p.Ile69Thr, p.Asn81His, p.Thr275Met, p.Arg682Cys et p.Ser739Phe, p.Val550Met et p.Asp771Asn qui affectent des acides aminés conservés. Ces mutations ont été prédites *in silico* d'affecter la fonction de la protéine et sont absentes dans une large cohorte de contrôles de même origine ethnique. La co-injection de ces variantes avec le gène *prickle1a* de type sauvage chez l'embryon de poisson zèbre a démontré qu'une mutation, p.Arg682Cys, modifie dans un sens négatif le phénotype du défaut de la CE produit par *pk1* de type sauvage. Notre étude démontre que *PK1* peut agir comme facteur prédisposant pour les ATN chez l'humain et élargit encore plus nos connaissances sur le rôle des gènes de la PCP dans la pathogenèse de ces malformations.

Mots-clés: *PRICKLE1*, anomalies du tube neural, polarité planaire cellulaire, extension convergente, poisson zèbre

Abstract

The planar cell polarity pathway (PCP) or the non-canonical Frizzled/Dishevelled pathway controls the morphogenetic process of convergent extension (CE) that is essential during embryogenesis for gastrulation and neural tube formation. Recently, PCP signalling was associated with neural tube defects (NTD) in humans and animal models. The core PCP protein, Prickle1, is expressed in the primitive streak and mesoderm during mouse embryogenesis. Both gain and loss of function of Prickle1 cause faulty CE movements in zebrafish and the frog. PRICKLE1 physically interacts with two other core PCP members, Dishevelled and Strabismus/Vang. In the present study we investigated the role of *PRICKLE1* in the aetiology of NTDs in a large cohort of 810 patients through resequencing of its open reading frame and exon-intron junctions. The pathogenicity of the identified mutations was assessed through bioinformatics methods followed by a functional validation in a zebrafish system, *in vivo*. We identified in our cohort a total of nine novel mutations, of which seven affected conserved amino acids: p.Ile69Thr, p.Asn81His, p.Thr275Met, p.Arg682Cys, p.Ser739Phe, p.Val550Met and p.Asp771As. These mutations were predicted to affect the function of the protein *in silico* and were absent in a large cohort of ethnically-matched controls. Co-injection of these variants with the wild type *pk1* in zebrafish oocytes revealed that one mutation, p.Arg682Cys, antagonized the CE phenotype induced by the wild-type zebrafish *prickle1a* in a dominant fashion. Our study demonstrates that *PRICKLE1* can represent a predisposing factor for human NTDs and further expands our knowledge on the role that PCP genes in the pathogenesis of these malformations.

Keywords: *PRICKLE1*, neural tube defects, planar cell polarity, convergent extension, zebrafish

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Définition.....	1
1.2 Embryologie du système nerveux central	1
1.3 Les formes cliniques des ATN	10
1.3.1. Les ATN ouvertes.....	10
1.3.1.1. Les ATN ouvertes crâniiales.....	10
1.3.1.2. Les ATN ouvertes spinales ou les myélodysraphies ouvertes	11
1.3.2 Les ATN fermées.....	11
1.4 Étiologie	13
1.4.1 Facteurs environnementaux	13
1.4.2 Facteurs génétiques.....	15
1.4.2.1 Études des gènes de la voie métabolique des folates chez les ATN humains	16
1.4.2.2 Études des orthologues et homologues des gènes identifiés chez des souris modèles	17
1.5 La polarité planaire cellulaire (PCP)	19
1.5.1 Le module central de la PCP chez la Drosophile	19
1.5.2 Le module global de la PCP	21
1.5.3 Les effecteurs et les effets de la voie PCP	22
1.5.4 Particularités de la PCP et phénomènes spécifiques chez les vertébrés	23
1.5.4.1. La PCP dans la neurulation.....	24
1.5.4.2. PCP et l'orientation des cils dans l'oreille interne.....	25
1.5.4.3 Gènes des vertébrés faisant partie de la voie PCP et qui n'ont pas d'ortologue chez la Drosophile.....	25
1.5.4.4 La PCP dans d'autres processus cellulaires	27
La PCP dans les mitoses.....	27

La PCP dans la ciliogenèse	27
La PCP et la polarité apico-basale.....	28
1.6 La voie canonique Wnt/Fz et la voie Wnt/Calcium	29
1.7 Le gène <i>PRICKLE1</i> (<i>PK1</i>)	31
1.7.1 Caractéristiques structurelles de PK. Interactions spécifiques.	31
1.7.2 Prickle dans la voie non-canonique Wnt/Fz	33
1.7.2.1 Fonctions dans le module central du PCP.....	33
1.7.2.2 Fonctions sur les voies effecteurs de la PCP	34
1.7.3 Le patron d'expression de <i>Prickle</i>	34
1.7.4 Rôle dans la gastrulation	35
1.7.5 Rôle dans la voie canonique Wnt/Frizzled.....	36
1.7.6 Rôle dans la voie Wnt/Calcium	37
1.7.7 Le knock-out de <i>Prickle1</i> chez la souris.....	37
2. Projet de recherche.....	39
2.1 Problématique.....	39
2.2 Hypothèse et objectives.....	40
2.3 Pertinence et retombées.....	40
3. Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene <i>PRICKLE1</i> in human neural tube defects	41
4. Discussion	66
Effets potentiels des mutations de PK1 sur les interactions spécifiques avec Vangl, DVL et DIVERSIN.....	66
Des études futures de validation des mutations de PK1 sur les interactions spécifiques avec les membres de la PCP	68
Le rôle de PK1 dans l'épilepsie chez l'humain.....	69
La puissance des animaux modèles pour les études génétiques des ATN humains	70
Futures directions et défis	70

Liste des tableaux

Manuscrit, Table1: Rare missense variants (<1%) identified in <i>PRICKLE1</i> in human neural tube defects.....	57
Manuscrit, Table S1: Characteristics of patients with neural tube defects.....	63
Manuscrit, Table S2: Primers used for site-directed mutagenesis in the zebrafish <i>Prickle1a</i> open reading frame.....	64

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du processus d'extension convergente.....	3
Figure 2: Le processus de pliage de la plaque neurale.....	5
Figure 3: Les points d'initiation de la fermeture du tube neural.....	8
Figure 4: La neurulation secondaire.....	9
Figure 5: La voie de la polarité planaire cellulaire. Les protéines centrales et leurs interactions.....	21
Figure 6: Diagramme des trois voies de signalisation Wnt/Frizzled.....	29
Figure 7: Diagramme de la protéine PRICKLE1.....	32
Manuscrit, Figure 1:A) Lateral views of 2 days post fertilization zebrafish illustrating the 3 clusters identified based on phenotype severity; B-G) The distribution of the 3 clusters in each of the experimental groups; H) Dose response curves for de coinjections assay.....	59
Manuscrit, Figure S1: <i>PRICKLE1</i> mutations in neural tube defects patients.....	65
Manuscrit, Figure S2: Distribution of the 3 clusters in the noninjected and in the 100, 200, 300 and 400 pg of wildtype <i>zpk1a</i> RNA injected groups.....	66

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
aPKC	Protéine kinase atypique C
ARN	Acide ribonucléique
ATN	Anomalies du tube neural
Bbs	Syndrome de Bardet-Biedl
BMP	Protéine morphogénétique osseuse
Ca²⁺	Calcium
CAMKII	Kinase calcium/calmodulin dépendante II
CE	Extension convergente
Crc	Circletail
Cthrc1	Collagen triple helix repeat containing1
Dg	Diego
Ds	Dachsous
Dvl/Dsh	Dishevelled
Fj	Four-jointed
Ft	Fat
Fy	Fuzzy
Fz	Frizzled

GFP	Green fluorescent protein
GSK3β	Glycogène-synthase-kinase 3 β
Int	Inturned
JNK	Kinase Jun
LAP	Leucine-rich repeat and PDZ domain
LCS	Liquide cérébro-spinal
LEF	Lymphoid Enhancer-binding factor
Lp	Loop-tail
LRP	LDL-R-Related protein
MTHFR	5,10-methylene-tetrahydrofolate réductase
PAR	Récepteurs activés par les protéases
PCP	Polarité planaire cellulaire
pk	prickle - spiny legs
PKC	Protéine kinase C
ppt	Pipetail, Wnt5
PTK7	Protéine tyrosine kinase
Rho	Ras homolog
ROCK	Kinase associée à Rho
Scrib	Scribbled
Shh	Sonic Hedgehog
slb	Silberblick, Wnt11

SNP	Polymorphisme d'un nucléotide simple
stan/fmi	Starry night/Flamingo
Tbx	T-box transcription factor
TCF	T-cell factor
Vang/Stbm	Van gogh/Strabismus
VANGL	Vang-like
Wnt	Wingless
βcat	β -caténine

À tous les patients atteints des anomalies du tube neural

Remerciements

Je tiens à remercier Dr. Zoha Kibar de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait découvrir la beauté de la recherche médicale fondamentale.

Je remercie à tous les membres du laboratoire Kibar et spécialement Marie-Claude Guyot, Vincent Quoc-Huy Trinh, Redouane Allache et Annie Reynolds pour leur aide essentiel au parcours de ce projet.

Je remercie Dr. Pierre Drapeau de m'avoir permis d'effectuer une bonne partie de mes expériences dans son laboratoire et Dr. Edna Brustein pour son agréable assistance.

Je remercie La Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine et La Fondation des Etoiles, ainsi que l'Université de Montréal pour le soutien financier.

1. Introduction

1.1 Définition

Les anomalies du tube neural (ATN) représentent le groupe le plus commun et le plus sévère de malformations du système nerveux central. Elles touchent 1-2 enfants par 1000 naissances. Les ATN sont le résultat d'une défaillance partielle ou complète de la fermeture du tube neural pendant l'embryogénèse et peuvent se produire à tous les niveaux de l'axe rostrocaudal.

1.2 Embryologie du système nerveux central

Les premières étapes dans le développement embryonnaire responsables pour la formation du système nerveux central (moelle épinière et cerveau) sont la gastrulation (semaines 2-3 chez l'humain) et la neurulation (semaines 3-6).

Pendant la **gastrulation**, le disque embryonnaire bilaminaire formé de l'épiblast et de l'hypoblast devient tridermique par la formation du mésoderme. La ligne primitive, formée des cellules épiblastiques omnipotentes apparaît aux jours 14-15 sur la ligne médiane dorsale de l'embryon. Des cellules épiblastiques vont ensuite migrer par le nœud de Hensen formé à l'extrémité crâniale de la ligne primitive et par la ligne primitive rostrale et former l'endoderme embryonnaire. Ensuite, une deuxième population cellulaire épiblastique migre par la ligne primitive pour s'intercaler entre l'épiblast et l'hypoblast, donnant ainsi naissance au mésoderme. Les cellules mésodermales qui migrent au long de la ligne médiane vont former la notochorde qui aura un rôle inducteur pour l'ectoderme neural. Finalement, les cellules qui restent au niveau de l'épiblast formeront l'ectoderme^{1,2}.

La neurulation est le processus fondamental qui mène au développement du tube neural, le précurseur du cerveau et de la moelle épinière. Chez l'humain, la neurulation se déroule en deux phases qui ont lieu à des niveaux distinctes au long de l'axe rostrocaudal

de l'embryon : la neurulation primaire (semaines 3-4), responsable pour la formation du cerveau et de la plupart de la moelle épinière, suivie par la neurulation secondaire (semaines 5-6) qui est limitée au niveau du bourgeon de la queue et qui va donner naissance à l'extrémité caudale de la moelle épinière, incluant la plupart des régions sacrale et coccygienne³.

La neurulation primaire commence par la formation du neuroectoderme suite à l'interaction entre la notochorde et l'ectoderme qui le recouvre. Normalement, les protéines morphogénétiques osseuses (BMP, bone morphogenetic proteins) sont responsables pour stimuler l'ectoderme à former de l'épiderme en inhibant en même temps la formation du neuroectoderme. L'induction neurale survient avec la suppression du destin épidermique par des antagonistes des BMP comme chordin, noggin et follistatin provenant du nœud primitif permettant ainsi la formation du neuroectoderme. En plus de ces facteurs, des facteurs de croissance des fibroblastes, la signalisation par la voie canonique des wingt et des facteurs de croissance analogues à l'insuline y sont aussi impliqués².

La plaque neurale se transforme ensuite dans un tissu allongé, large dans la région crânienne et étroit dans les régions spinales. Ce changement de morphologie est possible par le processus d'extension convergente (CE). La CE décrit l'étrécissement et l'allongement d'un groupe de cellules sur l'axe de l'embryon pendant la gastrulation et sur le long de la plaque neurale pendant la neurulation. Pendant ce processus complexe, les cellules s'allongent sur leur axe medio-latéral et produisent des protrusions cellulaires qui leur permettent de migrer et s'intercaler avec les cellules avoisinantes. Ce changement de la morphologie et la migration de ces cellules vont faire en sorte que le tissu va, en même temps, converger vers la ligne médiane et s'allonger le long de l'axe antéro-postérieur se traduisant par un axe allongé et une largeur plus étroite de la plaque neurale (**Figure 1**). La CE est contrôlée par la voie non-canonique du Wingt/Frizzled (Wnt/Fz), ou la voie de la polarité planaire cellulaire (PCP, planar cell polarity) qui sera décrite dans le chapitre **1.5**.

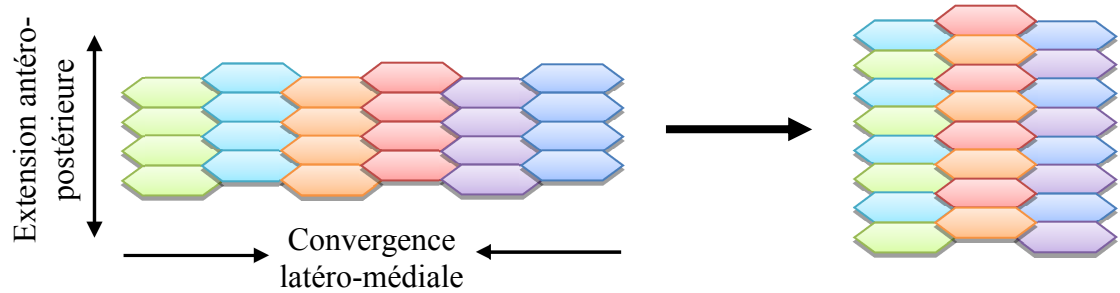


Figure 1. Diagramme simplifié du processus morphogénétique d'extension convergente pendant la gastrulation et la fermeture du tube neural. Les cellules s'allongent sur leur axe medio-latéral et produisent des protrusions cellulaires qui leur permettent de migrer et s'intercaler avec les cellules avoisinantes. L'axe antéro-postérieur de la plaque neurale devient ainsi plus long et sa largeur plus étroite.

En même temps que l'extension convergente, un deuxième processus morphogénétique appelé constriction apicale a lieu menant à la formation des plis neuraux⁴. La constriction apicale représente un changement morphologique des cellules columnaires dans la plaque neurale dont le diamètre apical diminue ses dimensions. Ce changement de forme est commun dans les processus de pliage des couches cellulaires pendant la morphogenèse.

Les mécanismes de la constriction apicale représentent encore un sujet de controverse. La théorie la plus populaire est que la superficie apicale se rétrécit dû à un appareil contractile sous-membranaire situé dans le domaine apical des cellules qui fonctionnerait similairement à l'appareil contractile des myocytes. En effet, il a été démontré que les régions apicales des cellules de l'épithélium neuronal sont enrichies en actine⁴. En plus, le traitement des embryons de souris avec cytochalasine D (un inhibiteur des microfilaments d'actine) inhibe la fermeture des plis neuraux craniaux⁵, effet observé aussi suite à la perte de fonction des diverses protéines associées aux filaments d'actine, comme *shroom*, *vinculin*, *Mena/profilin* et *p190RhoGAP*⁶.

D'autres théories formulées pour expliquer les mécanismes de la constriction apicale impliquent soit une augmentation de l'adhérence intercellulaire dans la région apicale (puisque'il a été démontré que la superficie de contact entre les cellules de la plaque neurale des amphibiens augmente pendant la neurulation), soit une augmentation de la hauteur des cellules dans le contexte d'un volume et d'une superficie basale constantes (obligeant les cellules à adopter la forme de cale)⁴.

Suite à ces changements morphologiques dans la plaque neurale, les plis neuraux se forment avec la création de points d'articulation à 2 sites: le point d'articulation médiane (ou la charnière médiane) situé au-dessus de la notochorde sur la longueur de l'axe rostrocaudal (**Figure 2.b**) et une paire de points d'articulation dorsolatérales (les charnières dorsolatérales) situées sur les côtés latéraux des plis neuraux, surtout au niveau du futur cerveau (**Figure 2.b et 2.c**).

Le point médian est le seul pli au niveau de la région spinale proximale et sa formation semble nécessiter la présence des signaux provenant de la notochorde (la suppression du développement de la notochorde empêche la formation du pli médian)⁷ quoique la signalisation par BMP joue aussi un rôle essentiel par la régulation des changements morphologiques et de la polarité des cellules épithéliales du futur tube neural⁸.

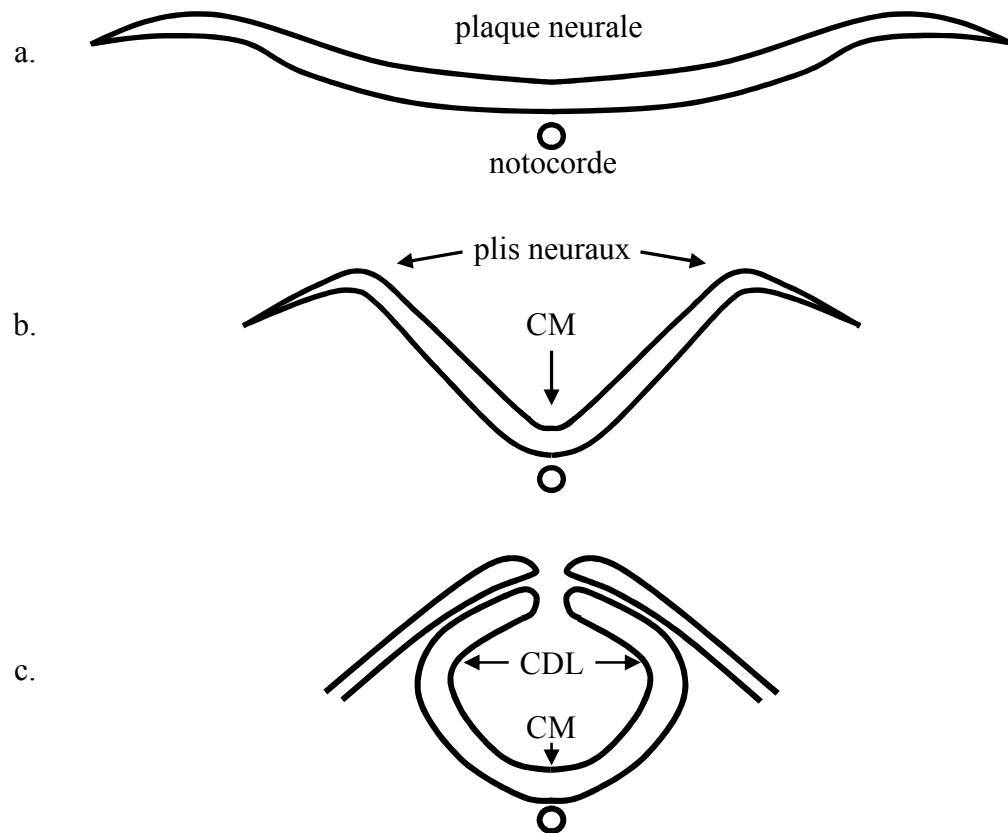


Figure 2. Représentation du processus de pliage de la plaque neurale. Les bords de la plaque neurale s’élèvent (a), avec la formation des plis neuraux (b). Ensuite, (c) le tube neural prend forme par le pliage de la plaque neurale autour de la charnière médiane (CM) et des charnières dorsolatérales (CDL).

Les plis dorsolatérales se forment au niveau spinal distal et au niveau crânien. À partir des études effectués chez la souris, il est connu que l’étendue axiale des points d’articulation dorsolatérales est contrôlée par l’équilibre entre la signalisation par Bmp2 et celle par Sonic hedgehog (Shh)⁷. Bmp2, exprimé par l’ectoderme dorsal, stimule la transcription de Noggin à tous les niveaux de l’axe antéropostérieure embryonnaire. Tandis que Bmp2 a une influence inhibitrice sur la formation des points d’articulation dorsolatérales, Noggin agit comme inhibiteur de Bmp2 et ainsi favorise la formation de ces plis. Shh, exprimé par la notocorde, est à son tour un inhibiteur de Noggin et favorise

l'activité inhibitrice de *Bmp2* sur la formation des plis dorsolatérales. Étant donné que l'expression de *Shh* est grande dans la région spinale proximale, les plis dorsolatérales ne se forment pas tandis que dans la région distale où *Shh* est presque absent, on constate leur formation^{7,9}. En résumant, toute augmentation du niveau d'expression de *Shh* empêche la formation des plis dorsolatérales résultant dans l'apparition de la spina bifida tandis que la perte de fonction de *Shh* va entraîner la formation prématurée des plis dorsolatérales mais avec la fermeture du tube neural sur toute sa longueur¹⁰.

Après la formation de ces points d'articulation, la plaque neurale tourne autour du point médian et, par convergence, autour des points dorsolatérales. La fermeture du tube neural se réalise par la fusion de la plaque neurale quand les plis neuraux viennent en contact sur la ligne médiane dorsale et fusionnent. (**Figure 2.c**). Cette fusion se fait dans une succession d'évènements qui comprend la fusion du neuroépithélium, la fusion de l'ectoderme de surface, la séparation du neuroépithélium de l'ectoderme de surface et la séparation de l'ectoderme fusionné du tube neural, la différenciation et la migration des cellules des crêtes neurales entre ces structures ainsi qu'un remodelage approfondi de la matrice extracellulaire¹¹. Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables pour cette fusion sont encore peu compris. On connaît que, pendant le rapprochement des plis neuraux, les cellules apicales forment des protrusions cellulaires qui s'entremêlent, suivi par la formation de contacts cellulaires permanents¹² qui seraient sous le contrôle des récepteurs des tyrosine-kinase Eph et des récepteurs activés par les protéases (Protease Activated Receptors - PAR) Par1 et Par2. Les récepteurs Eph et leurs ligands contrôlent normalement la répulsion des cônes de croissance neuronaux et des cellules migratrices dans le système nerveux. Chez la souris, pendant le processus de fusion des plis neuraux, Ephrin-A5 et son récepteur EphA7 sont exprimés dans les cellules situées sur les bords des plis neuraux craniaux. Par l'action d'une version endogène tronquée du récepteur EphA7, la réponse cellulaire à Ephrin-A5 est une d'adhésion plutôt que de répulsion, importante pour la fusion des plis puisque la perte de fonction d'*Ephrin-A5* cause l'exencéphalie chez la souris¹³. *Par1* et *Par2*, quant à eux, sont exprimés chez la souris dans les cellules de l'ectoderme couvrant le neuroépithélium au moment et l'endroit de la fusion. Ils agissent

dans la fusion de plis à travers les protéines G et spécifiquement les sous-unités $G\alpha_{i,o}$ et $G\alpha_z$ aussi que Rac qui est un effecteur en aval de la signalisation par G_i ¹¹. Le double knock-out de *Par1* et *Par2* cause exencéphalie, spina bifida et queue en tirebouchon tandis que la perte de fonction de $G\alpha_{i,o,z}$ cause spina bifida seulement suggérant que les fermetures crâniale et caudale pourraient avoir des différentes exigences pour les voies de signalisation couplés aux sous-unités G_i ¹⁴.

La fermeture du tube neural dans la neurulation primaire se fait par une succession d'évènements morphogénétiques bien définie, et qui a été étudiée en détail chez la souris (**Figure 3b**). Elle est initiée au niveau de la jonction du rhombencéphale avec la région cervicale (point de fermeture 1) et progresse en même temps vers les régions du futur cerveau et spinale. La fermeture du cerveau comprend deux points de fermeture: un situé à la jonction du prosencéphale avec le mésencéphale (point de fermeture 2) et un situé à l'extrémité rostrale du prosencéphale (point de fermeture 3). La fermeture qui a lieu entre ces points d'initiation complète la neurulation crânienne tandis que la progression caudale de la fermeture à partir du point 1 va se finaliser par la fermeture du neuropore postérieur marquant ainsi la fin de la neurulation primaire. Les points de fermeture 1 et 3 se retrouvent aussi chez l'humain et leur position est constante. Le point 2 a une position variable chez la souris, étant situé soit caudal dans le mésencéphale chez certaines souches soit, chez les autres, plus rostral dans le prosencéphale. Dans ces dernier cas les point 2 et 3 sont parfois aussi rapprochés qu'il est difficile de les distinguer. Ceci est similaire avec l'embryon humain où le point de fermeture 2 n'est pas toujours observé¹⁵.

En plus des deux points de fermeture mentionnés, qui ont une présence constante dans les études effectués sur des embryons humains, on retrouve aussi d'autres points, accessoires (jusqu'au un totale de cinq, voir **Figure 3a**), qui ont une présence inconstante et dont on ne connaît pas encore la fréquence réelle¹⁶. La présence de ces points supplémentaires est aussi supportée par des descriptions faites dans la littérature, des patients avec anomalies multiples du tube neural, avec trois myéломéningocèles; deux situés au niveau thoracique (supérieur et inférieur) et un au niveau lombaire¹⁷.

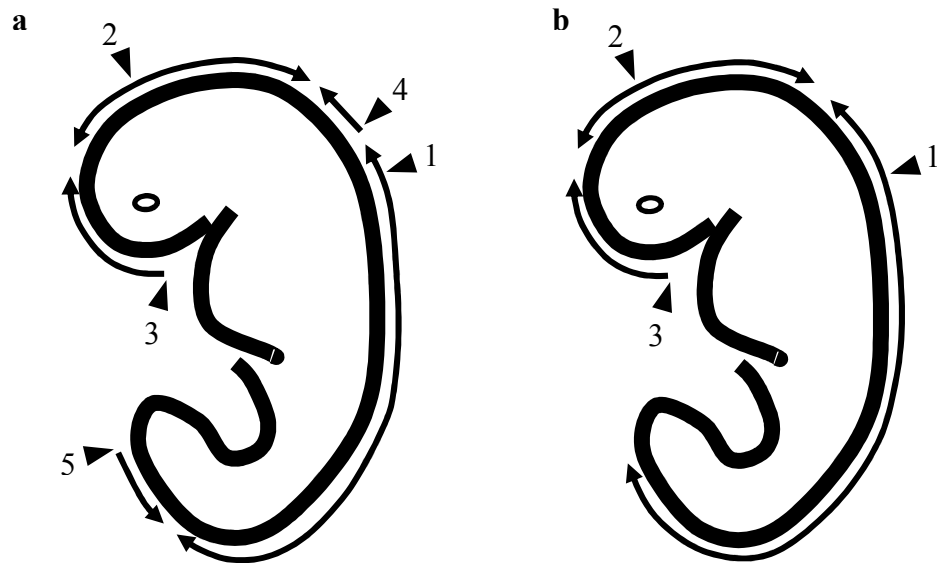


Figure 3. Les points d'initiation de la fermeture du tube neural chez (a) l'humain et (b) la souris.

Pendant la neurulation secondaire, une population de cellules multipotentes dans le bourgeon de la queue acquiert un destin neural et s'organise dans la région dorsale du bourgeon de la queue pour générer un neuroépithélium entourant une cavité centrale – l'éminence caudale. Par cette canalisation, le tube neural sacro-caudale se forme dont la lumière est en continuité avec celle du tube neural primaire situé rostral¹⁰ (**Figure 4**).

Malgré leurs morphogénèses distinctes, la neurulation primaire et secondaire semble représenter en fait un programme unique, sous le contrôle des mécanismes cellulaires et moléculaires similaires. Le tube neural secondaire aussi que le tube primaire prend naissance de la plaque neurale. Pendant que le tube neural primaire se forme par le pliage de la plaque neurale et la fusion consécutive des plis, le tube neural secondaire se forme par l'invagination de la plaque neurale dans son segment caudal générant l'éminence caudale qui, après sa canalisation, s'unit au canal neural¹⁸.

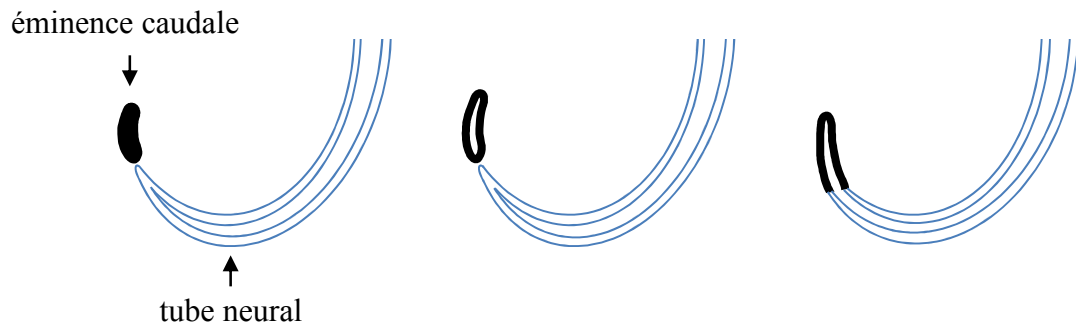


Figure 4. Pendant la neurulation secondaire, l'éminence caudale souffre un processus de canalisation et s'unit au canal neural donnant naissance au tube neural sacro-caudale.

L'occurrence des anomalies du tube neural comme la spina bifida à tous les niveaux de la moelle épinière supporte l'implication des mécanismes communs autant pour la neurulation primaire que pour la neurulation secondaire. Pourtant, d'autres malformations spécifiquement caudales, comme l'agénésie caudale, indiquent la participation d'un programme développemental distinct, même si des gènes responsables pour la neurulation secondaire n'ont pas été nombreux à être découverts^{18,19}. Des exemples comprennent des gènes impliqués soit dans la migration des cellules mésodermiques, comme *T* (situé dans la région de délétion chromosomique chez les souris Brachyury, caractérisées par des queues courtes) qui est un facteur de transcription T-box, soit des gènes impliqués dans la formation du mésoderme, comme *Tbx6*, un autre gène T-box. Les gènes *Wnt3a* et *Wnt5a* sont connus eux aussi d'affecter la neurulation secondaire par leur implication dans la formation du mésoderme caudal et respectivement dans la génération défectueuse du mésoderme caudal paraxial¹⁸.

1.3 Les formes cliniques des ATN

Selon le fait que le tissu neural soit exposé à l'extérieur ou recouvert par la peau, les ATN sont classifiées en formes ouvertes, quand le tissu neural est exposé directement à l'extérieur, et fermées quand le défaut est recouvert par la peau (pourtant, des taches de naissance existent dans jusqu'à 50% de cas). Le terme "spina bifida occulta", par exemple, désigne un défaut en absence de tout signe externe quoique l'utilisation de ce terme ne soit pas conseillée³.

1.3.1. Les ATN ouvertes

Les myélodysraphies ouvertes représentent les plus fréquentes formes cliniques des ATN. Les formes prédominantes sont l'anencéphalie et la myéloméningocèle ou la myéloaraphie (aussi appelée spina bifida aperta)³.

1.3.1.1. Les ATN ouvertes crânielles

L'anencéphalie résulte d'un manque de fermeture du tube neural crânial. Un défaut dans la fermeture du point 2 cause l'acranie (ou l'exencéphalie); la boîte crânienne ne se forme plus et le tissu cérébral, même si assez bien différencié et en développement, reste exposé. Ce tissu va dégénérer dans les stades plus tardifs, vers la fin du premier trimestre, formant l'anencéphalie. Le manque de fermeture du point 3 va causer l'anencéphalie limitée dans la région frontale et va souvent être associé avec des malformations des os faisant partie de la boîte crânienne et avec des malformations des structures nerveuses²⁰⁻²². Les enfants nés avec anencéphalie sont mort-nés ou meurent peu après naissance²³.

Le **craniorachischisis** est une forme relativement rare des ATN et représente le manque de fermeture du tube neural sur toute sa longueur²³. Il résulte d'un défaut dans la

fermeture du point 1 qui interfère avec la formation de la charnière médiane. Ça entraîne la formation des plis neurax normaux mais éloignés l'un de l'autre, empêchant ainsi leur fusion normale²⁴.

Le **céphalocèle** consiste dans l'herniation du cerveau ou des méninges par un défaut dans la boîte crâniale. Le terme désigne un spectre de malformations comprenant l'encéphalocèle et la méningocèle crâniale. L'encéphalocèle peut avoir plusieurs sites de formation: occipital, pariétal ou antérieur et peut être sincipital (visible) ou basale (qui n'est pas directement visible). Pourtant, la majorité (75%) des encéphalocèles surviennent au niveau occipital, sur la ligne médiane et sont donc visibles²².

1.3.1.2. Les ATN ouvertes spinales ou les myéلودysraphies ouvertes

La **myéломéningocèle** est la plus fréquente des ATN ouvertes (plus de 98% des ATN spinales). Elle résulte d'un trouble dans la neurulation primaire et représente l'herniation de la moelle épinière et/ou des nerfs par un défaut osseux de la colonne vertébrale^{23,25}. La placode neurale voit ainsi son versant dorsal complètement exposé à l'extérieur. Leur positionnement habituel est dans la région lombaire ou lombo-sacrée du rachis.

La **myélocèle** est une forme plus rare et se distingue de la myéломéningocèle par l'absence d'expansion des espaces sous-arachnoïdiens qui fait en sorte que la placode neurale ne dépasse pas le niveau du tissu cutané, restant néanmoins découverte.

1.3.2 Les ATN fermées

Les ATN fermées, où le tissu neural est recouvert par la peau, sont classées dans deux sous-catégories, selon la présence d'une masse sous-cutanée. Les formes avec masse sous-cutanée sont représentées par: lipomyeloschisis, lipomyéломéningocèle, méningocèle et myélocystocèle tandis que les formes sans masse sous-cutanée comprennent les

dysraphismes complexes (comme la diastématomyélie), le sinus dermique, syndrome de régression caudale et la dysgénésie spinale segmentaire.

Dans le **lipomyeloschisis** un défaut vertébral dorsal, habituellement lombo-sacré, est couvert par un lipome sous-cutané (d'où la dénomination "fermée"). La moitié dorsale de la moelle épinière présente, au niveau du défaut, une fissuration focale qui est en continuité avec le canal central au-dessous et parfois en dessous de la lésion²⁶.

La **lipomyéломéningocèle** est une forme de lipomyeloschisis dans laquelle l'expansion de l'espace subarachnoïdien ventral cause l'herniation postérieure de la placode, de la moelle, de l'arachnoïde et de la dure-mère. Ainsi, la placode neurale n'a plus de contact avec le canal rachidien²⁷.

La **méningocèle** représente une herniation méningée à travers un défaut osseux vertébral contenant seulement du liquide cérébro-spinal (LCS) et étant recouverte par la peau d'aspect normal. La **myélocystocèle** est une lésion très rare qui consiste en un kyste formé par la dilatation du segment terminal du canal central²⁸.

Le **sinus dermique** décrit une communication, bordée par l'épithélium, entre la superficie des téguments et la dure-mère ou la moelle épinière. On peut le retrouver sur la ligne médiane, à tous les niveaux de l'axe neural et résulte d'une adhésion anormale du tube neural au derme. Le sinus dermique peut être associé avec un drainage du LCS, des kystes intra-duraux dermoïdes ou épidermoïdes et peut poser un risque important d'infections²⁹.

La **diastématomyélie** est une malformation dans laquelle la moelle épinière est bifurquée avec ou sans le sac dural dans deux sections distinctes. Elle est produite suite au maintien d'une communication anormale entre le sac embryonnaire et l'amnios par une fistule après la fermeture du canal neurentérique primaire. Autour de cette fistule, le mésenchyme et l'endoderme forment un trajet de clivage entre les deux notochordes et plaques neurales qui soient ainsi séparés³⁰.

Un groupe de malformations sévères du segment terminal spinal a été groupé dans le cadre du **syndrome de régression caudale**. On y retrouve l'agénésie du coccyx et celle des vertèbres sacrales, lombaires et même thoraciques. La grande majorité d'entre eux

implique le sacre seul et donc le terme d'agénésie sacrale et souvent utilisé pour nommer la régression caudale³¹. Les anomalies rachidiennes dans la régression caudale sont associées avec celles des autres structures dérivées de la région caudale de l'embryon : le système urogénital, l'intestin postérieur et les membres inférieures, avec la symptomatologie consécutive pour toutes ces systèmes et organes affectés³².

La **dysgénésie spinale segmentaire** représente l'agénésie ou la dysgénésie de la colonne vertébrale lombaire ou thoraco-lombaire, accompagnée par le développement défectueux de la moelle et des racines des nerfs spinaux sous-jacents. Les patients présentent paraplégie ou paraparésie aussi que des malformations congénitales des membres inférieurs³³. Il a été proposé que l'embryologie de la régression caudale et celle de la dysgénésie spinale segmentaire soient en fait basée sur le même type de défaut segmentaire notochordal, les différences étant conférées par le positionnement spatial d'un tel défaut³⁴.

1.4 Étiologie

Les anomalies du tube neural ont une étiologie multifactorielle impliquant des facteurs environnementaux et génétiques³⁵.

1.4.1 Facteurs environnementaux

Le plus important élément épidémiologique associé avec les ATN est l'effet protecteur de l'acide folique (ou la vitamine B₉), administré aux mères dans la période périconceptionnelle. La supplémentation en acide folique, soit de façon médicamenteuse, soit alimentaire (utilisée principalement en Amérique de Nord par la fortification des produits céréaliers) peut réduire l'incidence des ATN jusqu'à 60 – 70%^{36,37}. Les formes actives de l'acide folique, comme le tétrahydrofolate ou l'acide dihydrofolique, agissent comme accepteurs et donneurs des radicaux méthyl. Elles reçoivent ces radicaux à partir

des acides aminés comme l'histidine, la serine et la glycine et les cèdent pour la synthèse des purines (adénine et guanine) et de la thymine aussi que de la méthionine par la reméthylation de l'homocystéine à travers la vitamine B12. Le cycle de la méthylation a lieu dans toutes les cellules sauf les hématies et est essentiel pour la méthylation de l'ADN (dans la régulation de l'expression des gènes), des protéines (modifications post-traductionnelles) et des lipides³⁶. Malgré de nombreuses études, les mécanismes exacts par lesquelles la carence en acide folique prédispose aux ATN restent inconnues²¹.

En plus de l'apport en acide folique en soi, les facteurs qui affectent son absorption, son transport ou son métabolisme peuvent jouer un rôle dans la pathogénèse des ATN. Il a été démontré que jusqu'à 70% des mères avec un enfant touché par les ATN produisent des anticorps capables de lier les récepteurs des folates sur la membrane placentaire empêchant ainsi la liaison de l'acide folique. La supplémentation en acide folique dans ces cas pourrait augmenter l'apport intracellulaire par des voies alternatives ou par compétition avec ces anticorps et restaurer l'homéostasie des folates³⁸. Quoique cette hypothèse soit intéressante, une relation de causalité avec les ATN reste encore à être démontrée dans les différentes populations à risque. Jusqu'à maintenant, une étude menée sur des patientes d'origine irlandaise n'avait trouvé aucune association entre la présence des anticorps contre les récepteurs des folates et les grossesses affectées par des ATN³⁹. Les antagonistes des folates sont reconnus pour leur effet tératogène dans les ATN: la Carbamazépine (médicament anticonvulsivant) et le fumonisin (agent antifongique) diminuent l'apport cellulaire des folates tandis que l'antibiotique triméthoprim et la carence de la vitamine B₁₂ affectent son métabolisme^{10,40}.

L'hyperglycémie de la mère, dans les cas de diabète mal contrôlé, est responsable de certains cas des ATN par une mortalité cellulaire excessive dans le neuroépithélium. Un trouble dans la régulation de la glycémie semble aussi être le facteur causatif pour un risque plus élevé des ATN dans l'obésité maternelle¹⁰.

La carence en inositol joue un rôle important dans la fermeture du tube neural démontré par la prévention du développement des ATN chez la souris mutante *curly tail* qui sont

résistantes à la supplémentation en acide folique. Les défauts du tube neural chez cette souris sont dus à une réduction de la prolifération cellulaire dans l'intestin postérieur. L'inositol renverse cette réduction par la stimulation du cycle cellulaire dans l'intestin postérieur en régulant la phosphorylation par la Protéine kinase C (PKC) quoique les cibles de cette régulation ne soient pas encore connues^{10,41}.

D'autres éléments environnementaux causatifs pour les ATN sont l'administration de l'acide valproïque (le plus probablement par une forte inhibition de l'histone-désacétylase qui produirait un déséquilibre dans l'acétylation/désacétylation des protéines), l'hyperthermie maternelle et la carence en zinc dont les mécanismes d'action restent encore inconnus¹⁰.

1.4.2 Facteurs génétiques

Beaucoup d'arguments pointent vers l'existence d'une base génétique des ATN. Les ATN sont associées avec des anomalies chromosomiques, les plus fréquentes étant la trisomie 13, 18 (environ 6.5%) et l'aneuploïdie (5 à 17% des cas avec ATN)²⁴. Elles sont aussi présentes dans plusieurs syndromes génétiques comme le syndrome de Meckel, le méningocèle sacral antérieur, le syndrome de Currarino et la sténose anale⁴². Le risque de récurrence pour les frères et sœurs des cas atteints des ATN est significativement plus élevé que dans la population générale (10 à 50 fois^{21,24}) et rend l'éventualité d'une composante génétique beaucoup plus probable que celle d'un tératogène environnemental⁴³. Par ailleurs, on observe une hausse supplémentaire du risque après deux ou plusieurs grossesses affectées¹⁰. Si on ajoute à ces éléments le fait que les ATN peuvent avoir une distribution familiale et le fait qu'il y a une plus grande concordance parmi les jumeaux monozygotiques^{10,21}, on peut conclure que l'étiologie des ATN comprend une forte composante génétique. On estime l'héritabilité des ATN à environ 60%, et elle semble suivre un modèle multifactoriel oligogénétique (dans lequel un petit nombre de 3 à 4 gènes serait impliqué) plutôt qu'un modèle Mendélien⁴⁴. Le modèle oligogénétique est supporté

par l'historique des familles affectées par les ATN dans lesquelles des paires enfant-parent affectés sont rares et la plupart des cas sont apparentés de deuxième ou troisième degré²⁴. Pourtant, le nombre et l'identité des gènes impliqués restent largement inconnus⁴⁴.

Les ATN ont une étiologie complexe et des grandes familles avec plusieurs membres affectés sont très rares, ce qui fait que l'identification des gènes prédisposant aux ATN chez les humains par clonage positionnel traditionnel est difficile. Quoique les études d'association du génome entier effectuées dans les ATN ont identifiées des régions candidates sur les chromosomes 2, 7 et 10 ; leurs résultats sont compliqués par l'hétérogénéité génétique et la pénétrance variable^{45,46}. La plupart des études génétiques sur les ATN chez l'humain se sont penchées sur: (a) les gènes de la voie métabolique des folates du à leur rôle protecteur dans les ATN (maintenant universellement accepté) et (b) les gènes candidats inférés des souris modèles.

1.4.2.1 Études des gènes de la voie métabolique des folates chez les ATN humains

Le gène *5,10-méthylène-tetrahydrofolate réductase (MTHFR)* a été le plus étudié comme facteur de risque dans les ATN étant donné son rôle central dans la voie des folates en tant que régulateur des niveaux des folates disponibles pour la reméthylation de l'homocystéine. Un polymorphisme d'un nucléotide simple (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) commun dans *MTHFR*, c.677C>T a été associé avec un niveau réduit d'activité de l'enzyme, des niveaux élevés de homocystéine plasmatique et un risque élevé pour les ATN dans certaines populations^{47,48} tandis que, par exemple, la population hispanique semble ne pas être affectée¹⁰. Une autre mutation dans ce gène, c.1298A>C, a été aussi associée avec une diminution de l'activité enzymatique de *MTHFR* et un risque élevé pour les ATN⁴⁹. Malgré ces résultats, la souris knockout pour le gène *MTHFR* n'a pas réussi à expliquer le mécanisme complet par lequel ces mutations augmentent le risque des ATN. Cette souris modèle ne présentait pas un phénotype d'ATN, même en condition de carence en acide folique, quoique les niveaux d'homocystéine étaient élevés⁵⁰.

On a aussi suggéré que des SNP dans deux autres gènes de la voie des folates soient associés avec une hausse du risque pour les ATN. Il s'agit de c.2756A>G dans *méthionine synthétase* et c.66A>G dans *méthionine synthétase réductase*^{36,51,52}. Les études effectués dans des souris transgéniques avec un knockout partiel ou total de ces gènes ont pourtant failli démontrer un phénotype d'ATN et donc expliquer le rôle de ces gènes dans la pathogenèse de la maladie^{53,54}. Un quatrième gène centrale dans le métabolisme des folates, la *méthylène-THF déshydrogénase/formyle-THF synthétase/méthényl-THF cyclohydrolase*, impliqué dans des réactions de conversion des substrats utilisés pour la synthèse des purines et des thymidines, semble très promettant puisqu'une diminution dans le taux des mitoses ou une augmentation du taux de mutations pendant des processus morphogénétiques essentielles pourrait entrainer la fermeture incomplète ou le manque de fermeture du tube neural²¹. De plus, un SNP dans ce gène, le c.1958G>A, a été fortement associé avec une hausse du risque maternel pour les ATN⁵⁵⁻⁵⁷.

1.4.2.2 Études des orthologues et homologues des gènes identifiés chez des souris modèles

Il y a présentement approximativement 245 souches de souris mutantes qui présentent des anomalies du tube neural⁵⁸. Les données recueillis de leurs études ont une importance particulière pour la compréhension de ces anomalies chez l'humain dû aux multiples similarités qui existent entre les neurulations dans ces deux organismes. Par ailleurs, les phénotypes de ces mutants couvrent toutes les principaux phénotypes incluant l'anencéphalie, la spina bifida aperta et le craniorachischisis¹⁰.

En partant de cette richesse de données issues des modèles murins, une approche structurée, basée sur les voies développementales impliquées dans la morphogenèse du tube neural a été possible. Comme attendu et déjà décrit en partie dans les chapitres antérieurs, les protéines identifiées des modèles murins ayant un rôle dans des fonctions biologiques cellulaires pertinentes pour les ATN comprennent: des protéines du cytosquelette (shroom, vinculin, mena et palladin), des protéines de transduction du signal (les kinases jun (JNK) et la kinase C riche en alanine myristillée), des protéines du cycle cellulaire (ex. la

Phosphatase et régulateur de l'actine 4), protéines contrôlant la différenciation neuronale (Neurofibromine 1 et Paired box 3), des protéines liées à l'apoptose (B cell lymphoma/leukemia-10, les kinases IκB 1 et 2) et des protéines impliquées dans les interactions entre la surface cellulaire et la matrice extracellulaire (ex. Laminin)^{10,59-63}.

En plus de ces protéines aux rôles spécifiques, des voies de signalisation importantes dans la fermeture du tube neural ont été aussi identifiées. La signalisation par Notch, la signalisation par Shh et les Bmp se sont établies en tant que voies candidates pour déchiffrer les possibles mécanismes des ATN^{64,65}.

Des études génétiques des homologues de ces gènes ont été effectuées dans des cohortes des patients atteints par les ATN mais n'ont pas réussi à identifier un gène majeur qui soit impliqué dans leur pathogénèse.

Très important, les études génétiques sur des modèles animaux avaient permis de démontrer un fort lien entre la voie de la polarité planaire cellulaire (PCP, voie non-canonique du *Frizzled/Dishevelled*) et les ATN. Les mécanismes de son implication dans le développement des ATN seront décrits en détails dans le chapitre **1.5**.

Des études plus récentes se sont penchées sur la contribution des gènes *Vang-Like 1* (*VANGLI*) et *VANGLI2*, composants de la voie PCP, dans la pathogénèse des ATN humaines⁶⁶⁻⁶⁸. La première étude avait mis en évidence, par le re-séquençage du gène *VANGLI*, la présence de trois mutations: p.Val239Ile, p.Arg274Gln et la p.Met328Thr dans *VANGLI* dans une cohorte de 137 patients atteints par des ATN. La mutation p.Val239Ile avait été démontrée dans le système double-hybride en levure d'affecter l'interaction de *VANGLI* avec ses partenaires Dishevelled (Dvl) 1, 2 et 3 prouvant ainsi son caractère pathogénique. Des mutations spécifiques aux patients au niveau du gène *VANGLI* avaient été ensuite identifiées dans une cohorte plus grande, ayant des diverses origines ethniques. Deux de ces mutations, p.Val239Ile et p.Met328Thr, causent la perte de fonction de la protéine tel que démontré par des études sur son effet au niveau de la CE chez le poisson zèbre, prouvant une fois de plus le rôle de ce gène comme facteur de risque dans le développement des ATN chez l'humain^{67,69}. L'homologue de *VANGLI*, *VANGLI2*, a

été lui aussi étudié dans la même cohorte de patients que les deux études précédentes. Des mutations qui y avaient été identifiées, spécifiques aux patients, suggèrent que *VANGL2* pourrait prédisposer au risque des ATN dans approximativement 2.5% des cas des myélodysgraphies fermées⁶⁸. Ces études impliquent fortement la voie PCP dans la pathogenèse des ATN humaines.

1.5 La polarité planaire cellulaire (PCP)

La polarité planaire cellulaire, aussi appelé polarité tissulaire, représente le processus par lequel les cellules deviennent polarisées dans le plan d'un épithélium.

1.5.1 Le module central de la PCP chez la Drosophile

Connue aussi sous le nom de voie non-canonique de Frizzled/Dishevelled, la PCP a été étudiée pour la première fois et de façon très détaillée dans les poils des ailes adultes, les soies abdominaux et les ommatidies de la Drosophile. On a identifié ainsi un groupe de gènes centraux de la PCP qui inclut : *van gogh/strabismus (vang/stbm)*, *frizzled (fz)*, *dishevelled (dsh)* chez la Drosophile, *Dvl* chez les vertébrés), *starry night/flamingo (stan/fmi)*, *prickle (pk)* et *diego (dg)* (**Figure 5**). Les interactions spécifiques entre ces protéines et la distribution sous-cellulaire des complexes multi-protéiques ainsi formés sont fondamentales pour l'établissement et la propagation des signaux polarisants dans les tissus.

Pendant la signalisation par la PCP, **Fz** est distribuée de façon asymétrique sur la membrane cytoplasmique, avec une plus grande concentration dans le domaine apicale des interfaces proximo-distales cellulaires. Cette asymétrie dans la distribution de Fz est dépendante de l'activité de Dsh mais aussi de Stan/Fmi, Pk et Vang/Stbm⁷⁰. **Dsh** est recrutée par Fz à la membrane cellulaire et elle a aussi une distribution asymétrique étant concentrée sur la membrane distale et appauvrie sur la membrane antéro-postérieure aussi

que dans le cytoplasme^{71,72}. **Fmi** (récepteur avec sept domaines transmembranaires faisant partie de la superfamille des cadhérines) est enrichie aux pôles proximale et distale des cellules et sa distribution se perd si Fz ou Dsh sont absentes ou ne fonctionnent pas⁷³. fmi est responsable du positionnement apical de Fz⁷⁰. La protéine membranaire **Stbm** a été démontrée d'être localisée proximal, dans la zone des jonctions adhérentes des cellules de l'aile nymphale chez la Drosophile et interagit directement avec Pk, Dgo et Dsh⁷⁴. **Pk** est recrutée par Stbm à la membrane proximale⁷⁴ et interagit aussi avec Dsh et Dgo⁷⁵. En ce qui concerne **Dgo**, c'est une protéine à domaines d'ankyrine qui interagit directement avec Pk et Stbm. Elle partage avec ces deux protéines un rôle dans le maintien de la distribution apicale de Fmi qui, consécutivement, promue et maintient le complexe initial des protéines de la PCP au niveau membranaire pour faciliter leurs interactions ultérieures dans la signalisation⁷⁶. Dgo est distribuée, comme Fmi, aux pôles distale et proximale des cellules et Fmi est nécessaire pour cette distribution⁷⁷. Ces interactions sont décrites de façon schématique dans la **Figure 5**.

Les interactions et la distribution de ces protéines résultent dans la création des asymétries moléculaires qui mènent à l'alignement des cellules avoisinantes⁷⁸. Cette asymétrie est donc obtenue par l'arrangement d'un groupe formé de Fmi, Fz, Dsh, Dgo au pôle distal de la cellule en même temps qu'un deuxième groupe, formé de Fmi, Vang et Pk prend une position proximale. Le mécanisme d'exclusion mutuelle entre ces deux groupes n'est pas encore bien connu mais c'est important à noter que dans les études effectuées chez la Drosophile et dans des vertébrés on a observé que les complexes protéiques proximales communiquent d'une cellule à l'autre et recrutent le groupe distal de la cellule voisine. Cette communication se ferait premièrement par l'intermédiaire de l'interaction du domaine extracellulaire de Fz avec les molécules de Vang situées sur la membrane proximale des cellules avoisinantes⁷⁹. Deuxièmement, un des modèles proposés pour la transmission des informations polarisantes entre les cellules a été que Fmi par son positionnement aux deux pôles cellulaires serait capable de former des liaisons homophiliques et diriger la disposition asymétrique des complexes multiprotéiques dans les cellules⁸⁰. On considère que ces deux mécanismes d'interaction fonctionnent en parallèle

pour la transmission du signal de polarité d'une cellule à une autre. Par cette collaboration impliquant plusieurs cellules, ce système est capable d'amplifier des faibles asymétries pour renforcer la polarité à travers un tissu⁸¹.

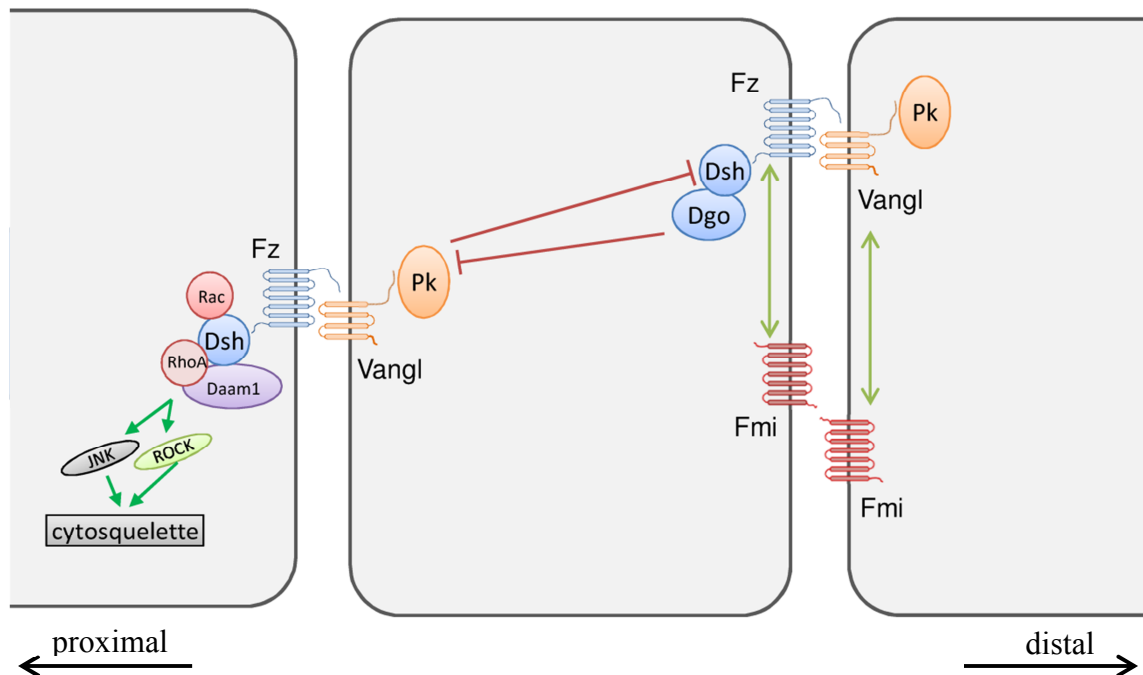


Figure 5. Diagramme simplifié des protéines centrales de la voie PCP ainsi que des interactions qui s'y établissent

1.5.2 Le module global de la PCP

En plus du module central avec son rôle dans l'amplification et la stabilisation de l'asymétrie au niveau subcellulaire, un module global de la PCP était identifié qui serait impliqué dans l'établissement d'un signal dépolarisant global faisant la liaison avec les axes des tissus. Le module global est formé par les cadhérines atypiques Fat (Ft) et Dachous (Ds) et la protéine Four-jointed (Fj) située dans l'appareil de Golgi. Les cellules des mutants de ces gènes, étudiés chez la Drosophile, sont capables de se polariser et de

coordonner leur polarisation avec les cellules avoisinantes mais, souvent, n'arrivent pas à s'aligner avec les axes des tissus qui voient ainsi leur morphologie globale affectée⁸². Il a été démontré que l'expression de Fz et Ds se fait selon des gradients alignés avec les axes des tissus qui se traduisent dans un gradient de la concentration des hétérodimères Ft-Ds au niveau subcellulaire⁸³. C'est proposé que ces gradients signalent au module central de la PCP mais, jusqu'au présent, la façon dont ça se fait reste inconnue.

Ayant comme point de départ le fait que Fz joue un rôle central dans la signalisation par la PCP et que Fz ont été d'abord connues d'agir comme récepteurs des Wnt dans la voie canonique de Fz/Dvl, beaucoup d'études se sont penchées sur lui comme cible pour l'initiation de l'asymétrie dans la PCP. Chez la Drosophile il a été proposé qu'un morphogène agirait comme ligand de Fz et dicterait le vecteur d'activation de Fz. Les efforts pour l'identification de cette molécule ont failli le trouver et en plus le knock-out de toutes les sept Wnt connus chez la Drosophile n'a pas altéré la PCP^{80,84}. On a aussi démontré que les mutants de Fz peuvent être sauvés par *Fz^{ACRD}* qui manque le domaine de liaison des Wnt⁸⁰. C'est tous des arguments contre une activation directe par les Wnt du Fz dans la PCP chez la Drosophile. Pourtant, on n'a pas exclu encore la possibilité que Wnt contrôlerait l'activité d'un morphogène (communément appelé X) ayant le rôle d'activateur et il reste à être identifié.

1.5.3 Les effecteurs et les effets de la voie PCP

Les modules spécifiques aux tissus, par exemple les gènes *Inturned (Int)* et *Fuzzy (Fy)*, sont impliqués dans la polarisation des cellules des poils chez la Drosophile par le contrôle de la polymérisation et le paquetage de l'actine. Des mutations dans ces gènes dans l'aile de la Drosophile génèrent des poils avec une polarité altérée et des cellules avec plus qu'un seul poil. Ces deux protéines sont positionnées en aval de Dsh et déterminent la polarité des poils dans une manière autonome (n'étant donc nécessaire pour la transmission de l'information polarisante entre les cellules)⁸⁵⁻⁸⁷. Il a été démontré que Fy est impliquée

dans le maintien de l'intégrité des réseaux de microtubules qui dirigent le développement du précurseur du poil épidermique⁸⁶.

La voie PCP exerce son effet sur le cytosquelette d'actine pour induire la polarisation des cellules ainsi que pour orienter la migration cellulaire. L'élément central dans cette signalisation est Dsh qui, par l'intermédiaire de ses domaines DEP et PDZ active les petites GTPases Rho et Rac. Pour réaliser l'activation de Rho, Dsh forme un complexe avec Dishevelled associated activator morphogenesis 1 (Daam1) et cette activation résulte dans l'activation consécutive de C-Jun (JNK). En ce qui concerne Rho, elle est responsable de l'activation de la kinase associée à Rho (Rho-associated kinase - ROCK) et de la myosine. Toutes ces cascades d'activation ont le rôle de modulation de l'actine et des microtubules et ainsi de réarrangement du cytosquelette⁴.

1.5.4 Particularités de la PCP et phénomènes spécifiques chez les vertébrés

Les processus qui ont lieu dans la signalisation par la PCP ainsi que les principales molécules qui y sont impliquées sont très bien conservés à travers l'évolution, de la *Drosophile* jusqu'au mammifères⁸⁸. Pourtant, avec une plus grande complexité morphologique et génétique des organismes évolués, le processus de la PCP est lui aussi devenu plus complexe présentant quelques différentes particularités.

Premièrement, chez les vertébrés, de nouveaux processus correspondent à la définition de la PCP tel que formulée chez la *Drosophile* : l'extension convergente, la fermeture du tube neural, la fermeture des paupières, l'orientation des touffes de cils des cellules ciliées dans l'oreille interne et l'orientation des follicules pileux⁸⁹.

Deuxièmement, la génétique de la PCP chez les vertébrés a gagné elle aussi en complexité et il faut tenir compte de deux aspects: (1) contrairement à la *Drosophile* qui a un seul gène pour chaque membre de la PCP, chez les vertébrés on retrouve des familles multigéniques⁹⁰ et (2) de nouveaux gènes dans la voie de signalisation de la PCP ont été identifiées chez les

vertébrés qui n'ont pas encore des homologues ou dont les homologues n'ont pas une implication prouvée dans la PCP chez la Drosophile. Ces gènes seront décrits dans la section **1.5.4.3**.

1.5.4.1. La PCP dans la neurulation

La neurulation des vertébrés a été parmi les phénomènes les plus étudiés par rapport à la PCP. Comme déjà décrit, les bords de la plaque neurale se plient, ascensionnent, se rapprochent et finissent par entrer en contact et fusionner pour créer le tube neural. Plus la plaque neurale reste large, plus la fusion des plis neuraux devient difficile résultant dans des anomalies du tube neural¹⁰. Par exemple, chez la souris *looptail* (ou le gène muté est *Vangl2*), les plis neuraux se forment de façon normale mais la distance trop grande entre eux empêche leur rapprochement et les souris homozygotes présentent craniorachischisis. Le défaut dans l'extension convergente chez ces souris cause une extension diminuée dans le mésoderme de la ligne médiane aussi que dans la plaque neurale mais des études sur des animaux chimères ont démontré que les cellules mutantes de la plaque neurale sont plus affectées que les cellules de type sauvage. Ça prouve que le défaut de fermeture du tube neural n'est pas dû à une induction notochordale défectueuse mais plutôt à un défaut autonome cellulaire des cellules mutantes et qu'une extension convergente défectueuse dans la plaque neurale mène à l'apparition des ATN⁹¹.

La souris *loop-tail*, dont les hétérozygotes sont caractérisés par une queue en tirebouchon et les homozygotes par le craniorachischisis, a permis d'identifier pour la première fois un gène de la PCP impliqué dans les ATN, *Vangl2*⁹². Depuis, le même phénotype de craniorachischisis a été trouvé dans d'autres souches mutantes ou dans des souris knock-out et presque tous les gènes impliqués faisaient partie de la PCP. Ainsi, les knock-out de *Cadherin*, *EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (Celsr1)*, *Scribbled (Scrib)* et *Protein tyrosine kinase (Ptk7)*, les doubles knock-out de *Dvl1/2*, *Dvl2/3* et *Fz3/6* aussi que les doubles knock-out hétérozygotes *Vangl2:Scrib* et *Vangl2:Dvl3* présentent aussi craniorachischisis^{40,93}. C'est à noter que les knock-out individuels de chacun de *Dvl1*, *Dvl2*, *Dvl3* et de *Fz3*, *Fz6* ne causent pas des ATN, probablement dû au rôle redondant de ces

paralogues⁹³. Cette association avec le craniorachischisis démontre un rôle important de la PCP dans le contrôle de la fermeture 1 (jonction rhombencéphale / région cervicale) du tube neural chez la souris. Pourtant, on a aussi observé d'autres phénotypes comme la spina bifida (par exemple les doubles hétérozygotes de *Vangl2* et *Ptk7*)⁹⁴ et l'exencéphalie (knock-out doubles de *Vangl2* avec *Collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1)*)⁹⁵.

1.5.4.2. PCP et l'orientation des cils dans l'oreille interne

Un des plus suggestifs et mieux connus exemples pour l'établissement de la polarité cellulaire chez les mammifères est représenté par l'oreille interne, notamment l'organe de Corti⁹⁶. L'organe de Corti contient des rangées de cellules ciliées qui présentent des touffes de stéréocils et un cil primaire, le kinocilium (au rôle sensoriel). La cochlée contient trois rangées de cellules ciliées externes et une rangée de cellules ciliées internes. Leurs stéréocils et le kinocilium sont positionnés sous la forme de la lettre «V» de façon polarisée pointant vers la périphérie de la cochlée⁹⁷. La polarisation des touffes de cils est sous le contrôle de la PCP et leur désorientation a été d'abord mise en évidence dans l'étude des souris *looptail* et *circletail*, suivies par les souris knock-out pour *Ptk7*, *Celsr1*, *Dvl1/Dvl2*, *Fz3/Fz6* et *Wnt7a*^{96,98}. La distribution asymétrique des principales protéines de la voie PCP a été mise en évidence dans l'oreille interne, révélant un comportement particulier de ces protéines comparé à la situation rencontrée chez la drosophile. Dans les cellules ciliées de l'organe de Corti on a trouvé que *Vangl2*, *Fz3* et *Fz6* sont localisées de la même côté, en contraste avec le positionnement mutuellement exclusif décrit chez la drosophile^{99,100}. Dans ce contexte, le partenaire responsable pour la localisation de côté opposée de *Dvl2* reste à être découvert⁹⁶.

1.5.4.3 Gènes des vertébrés faisant partie de la voie PCP et qui n'ont pas d'orthologue chez la Drosophile

Scrb1 À part la souris *loop-tail*, la souris mutante *circletail* (*Crc*), présente un défaut dans la fermeture 1 du tube neural et ainsi un craniorachischisis. La mutation dans *Crc* consiste d'une insertion d'une paire de bases qui produit un changement du cadre de

lecture du gène *Scribbled* (*Scrb1*) et la terminaison prématuré de la protéine. *Scrb1* est une protéine faisant partie de la famille de protéines LAP (leucine-rich repeat and PDZ domain) et qui présente 44% d'identité avec la protéine Scribble de la Drosophile. Pendant que chez la Drosophile, Scribble est impliqué dans la polarité apico-basale, celle-ci n'est pas perturbée de façon générale chez la souris *circletail* et *Scrb1* semble plutôt agir dans la PCP. Premièrement, *Crc* et *Lp* démontrent une interaction génétique (les doubles hétérozygotes développent craniorachischisis). Deuxièmement, le patron d'expression de *Scrb1* se superpose avec celui de *Vang2*, et il a été suggéré que les domaines PDZ de *Scrb1* pourraient interagir avec le motif de liaison de PDZ de *Vangl2*¹⁰¹.

Ptk7 Identifié suite à un criblage par capture de gènes, la perte de fonction de *protein tyrosine kinase 7* (*Ptk7*) chez la souris mène à la mort périnatale et au craniorachischisis par le manque d'initiation de la fermeture 1 du tube neural. Les souris présentent une plaque neurale et des somites plus larges comparées aux souris contrôles, aussi qu'une disposition désordonnée des kinocilium prouvant une CE inefficace. *Ptk7* interagit génétiquement avec *Lp*; les doubles hétérozygotes présentent spina bifida prouvant que *Ptk7* et *Vangl2* agissent dans la même voie. L'inactivation de *Ptk7* par injection de morpholino chez le *Xenopus* bloque la fermeture du tube neural et mène à un tronc raccourci¹⁰².

Les gènes *Wnt*. En contraste avec la Drosophile, les études sur les gènes *Wnt* dans le poisson zèbre, le *Xenopus* et la souris ont démontré que *Wnt5*, *Wnt7* et *Wnt11* sont impliqués dans la signalisation par la PCP. *Wnt11* (*silberblick*, *slb*) participe dans la régulation de l'extension convergente dans le mésoderme non-axial pendant la gastrulation du poisson zèbre¹⁰³ et, chez le *Xenopus*, *Fz7* a été identifié d'être le partenaire d'interaction de *Wnt11*¹⁰⁴. À son tour, *Wnt5* (*pipetail*, *ppt*) est nécessaire pour l'extension convergente dans les régions mesendodermiques et ectodermiques pendant les dernières étapes de la gastrulation. Son activité est redondante avec celle de *Slb/Wnt11* dans le mesendoderme antérieur où le phénotype mutant de *slb* est sauvé par l'injection d'ARN de *ppt/wnt5*. *Fz2* est requis pour l'activité de *ppt/wnt5* mais pas pour celle de *slb/wnt11*¹⁰⁵.

Une étude menée sur des cultures d'explants de cochlée embryonnaire de souris et regardant l'orientation des touffes de cils des cellules ciliées dans l'oreille interne, a démontré le rôle de *Wnt7a* dans ce processus ajoutant un troisième membre de la famille des *Wnt* (et le premier chez les mammifères) sur la carte des molécules impliquées dans la signalisation par la PCP. Il reste quand même à mieux définir son mécanisme d'action étant donné que les souris knock-out *Wnt7* ne présentaient pas des défauts dans le développement de la cochlée et de l'organe de Corti⁹⁸.

1.5.4.4 La PCP dans d'autres processus cellulaires

Des études récentes ont mis en évidence un rôle très important de la signalisation par la voie PCP dans les divisions cellulaires asymétriques, la ciliogenèse et la polarité apico-basale.

La PCP dans les mitoses

Les protéines de la voie PCP sont requises pour l'orientation du fuseau mitotique dans certains types cellulaires (au moins). Pendant la gastrulation chez le poisson zèbre les cellules de l'épiblast dorsal ne respectent pas le règle de Hertwig (d'avoir les fuseaux mitotiques alignés avec l'axe long de la cellule). Pendant que leur axe long est orienté medio-latéral dans l'interphase, leurs divisions se font plutôt le long de l'axe végétal-animal. Le mécanisme qui dirige ce phénomène dépend du complexe Fz/Dsh et est conservé à partir des nématodes et la *Drosophila* et allant jusqu'au vertébrés¹⁰⁶.

La PCP dans la ciliogenèse

Chez les vertébrés, la PCP a été impliquée dans la ciliogenèse. **Les gènes *Bbs*** sont des gènes impliqués dans le développement et la fonction des cils primitifs et sont responsables pour le syndrome de Bardet-Biedl qui est une ciliopathie héréditaire caractérisée par la rétinite pigmentaire, obésité, polydactylie post-axiale, dysplasie rénale, hypogénitalisme et des difficultés d'apprentissage¹⁰⁷. Les souris *Bbs4*^{-/-} présentent exencéphalie et leurs paupières sont ouvertes à la naissance. En plus, les cellules ciliées de

la cochlée sont désalignées chez les souris mutantes *Bbs1*, *Bbs4* et *Bbs6* et chez les doubles hétérozygotes *Bbs1*^{+/-}:*Ltap*^{+/-} et *Bbs6*^{+/-}:*Ltap*^{+/-} suggérant l'association des gènes *Bbs* avec la voie PCP et leur interaction génétique avec *Vangl2*¹⁰⁸.

Chez les vertébrés aussi que chez la Drosophile les protéines **Int** et **Fy** sont impliqués dans la réception du signal dépolarisant et dans l'organisation des microtubules pendant la signalisation PCP. Pendant que, chez la Drosophile il n'y a pas d'implication prouvée des cils dans la voie de Hedgehog (Hh), chez les vertébrés on a identifié un rôle pour *Int* et *Fy* dans la ciliogenèse et, par la suite, leur implication dans la responsivité à la signalisation par Hh.¹⁰⁹ Par ailleurs, chez le Xenopus, la perte de fonction de *Int* et *Fy* par injection de morpholino mène à un tube neural qui reste ouvert démontrant une implication des deux gènes dans la CE. Toujours chez le Xenopus, on a démontré que *Int* agit en amont de *Dvl* dans la morphogenèse des cils¹¹⁰. Considérés ensemble, l'implication des cils dans la signalisation par la PCP et la relation fonctionnelle entre *Dvl*, *Int* et *Fy* suggèrent que, chez les vertébrés, *Int* et *Fy* n'auraient pas juste un rôle effecteur mais elles seraient plus centrales dans le cadre de la PCP¹⁰⁹.

La PCP et la polarité apico-basale

Le fait que les protéines centrales de la voie PCP soient localisées dans le domaine sous-apical des cellules avait soulevé la question des mécanismes responsables pour le maintien et le contrôle d'une telle localisation. La phosphorylation de *Fz* par la protéine-kinase atypique C (aPKC), qui fait partie du complexe de la polarité apico-basale *Par3/Bazooka*, inhibe son activité tandis que *Par3* s'oppose à cette phosphorylation et protège la fonction de *Fz*¹¹¹. Par ailleurs, *Scribble1* (*Scrib1*), faisant partie du complexe homonyme de la polarité apico-basale, (composé de *Scrib*, *lethal giant larvae* (*Lgl*) et *Discs large* (*Dlg*)) interagit avec *Stbm* pour réguler les mouvements d'extension convergente pendant la gastrulation chez le poisson zèbre¹¹². En plus, chez la souris, il a été démontré que les protéines *Fz6*, *Vangl2* et *Fz3* suivent le positionnement de et sont co-localisées avec la E-cadherine sur l'axe apico-basal. Leur co-localisation a lieu soit sur toute la membrane

latérale dans l'épiderme, soit, dans l'intestine, au niveau des domaines apicales ou sous-apicales^{111,113}.

1.6 La voie canonique Wnt/Fz et la voie Wnt/Calcium

La signalisation par les Wnt est dernièrement regardée de plus en plus comme un seul grand réseau de signalisation intracellulaire. L'implication dans ce réseau des médiateurs spécifiques décrit trois grands modules de signalisation par Wnt: la voie de la polarité planaire cellulaire, la voie canonique Wnt/Fz et la voie Wnt/Calcium. Quoique dans la plupart des contextes biologiques ces modules semblent avoir un fonctionnement distinct, les recherches récentes démontrent qu'ils s'entremêlent de façon significative. Par exemple certaines protéines sont impliquées dans plusieurs des voies de signalisation des Wnt et les différentes voies de signalisation par Wnt agissent ensemble dans les mêmes cellules et se régulent réciproquement leur activité¹¹⁴ (**Figure 6**).

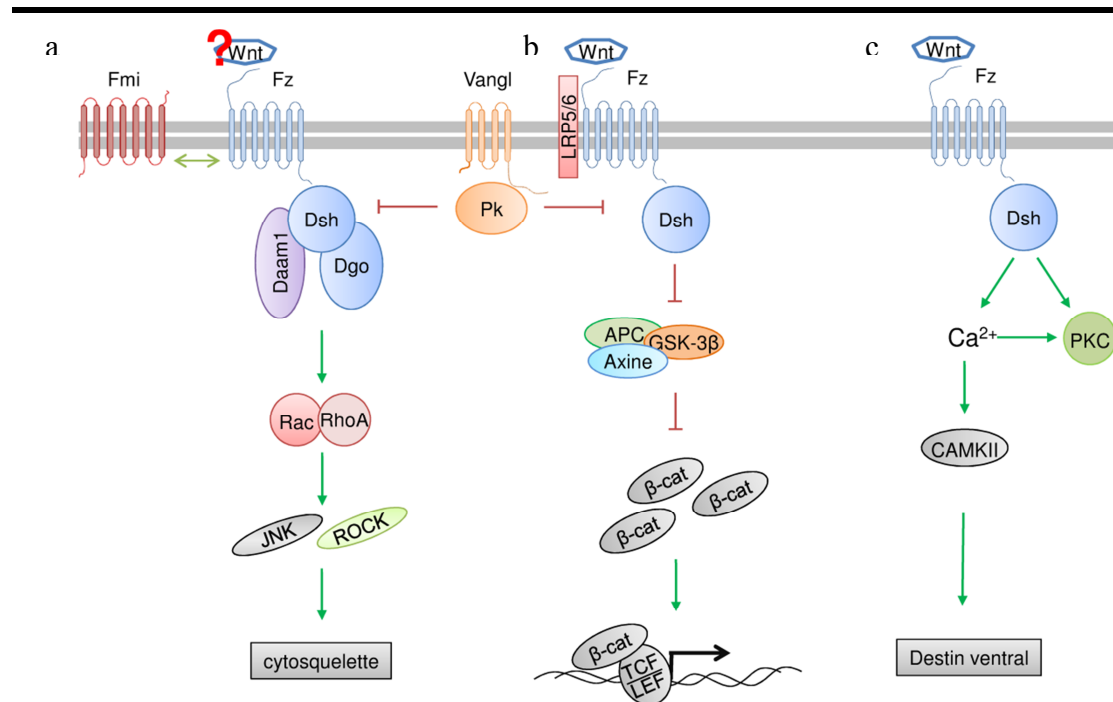


Figure 6. Diagramme des trois voies de signalisation Wnt/Frizzled. (a) La voie de la polarité planaire cellulaire ; (b) La voie canonique et (c) La voie Wnt/Calcium

La signalisation par **la voie canonique Wnt/Fz** est impliquée dans des nombreux processus morphogénétiques essentielles pour la spécification des axes embryonnaires, pour la prolifération et la différenciation cellulaires étant aussi impliquée dans le développement des différentes pathologies humaines, notamment dans les cancers.

L'initiation de la signalisation se fait par la liaison du ligand Wnt, au récepteur Fz avec la participation du corécepteur LDL-R-Related Protein 5/6 (LRP5/6). En absence du signal Wnt, la β -caténine/Armadillo cytoplasmique est rapidement dégradée par un complexe formé de l'Adenomatous Poliposis Coli (APC), l'axine (ou son homologue Conductin), ayant un rôle d'échafaud pour le complexe, et de la glycogène-synthase-kinase 3β (GSK 3β , ou Shaggy/Zeste-white chez la Drosophile). La liaison de la β -caténine à ce complexe mène à sa phosphorylation en vue de son ubiquitination par le complexe SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex). Finalement, la β -caténine est dégradée dans le protéasome¹¹⁵. Un niveau bas de β -caténine cytoplasmique et nucléaire maintient les gènes cibles de la voie canonique Wnt/Fz en état réprimé par l'action des corépresseurs sur les facteurs de transcription LEF/TCF (Lymphoid Enhancer-binding Factor/T-cell factor)¹¹⁶. Une fois Wnt lié aux récepteurs Fz et LRP5/6, Dvl est activée par phosphorylation et recrutée à la membrane. Ceci va entraîner le recrutement à la membrane de l'axine et du reste du complexe de dégradation de la β -caténine, avec la dégradation consécutive de l'axine et l'inhibition de la GSK 3β . Ainsi, la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine seront diminuées avec accumulation de β -caténine cytoplasmique qui devient disponible de lier en tant que cofacteur TCF/LEF et induire l'expression des gènes cibles¹¹⁶.

La voie Wnt/Calcium est considérée une voie alternative de signalisation de Wnt/Fz. Chez le *Xenopus*, on a démontré que *Wnt5a* et *Wnt11* stimulent l'activité de la kinase calcium/calmoduline dépendante II (CamKII) par la stimulation de la libération de Calcium intracellulaire¹¹⁷. La libération de calcium intracellulaire est induite par Wnt5 accompagnée par Fz2 à travers la voie du phosphatidylinositol. Ils agissent sur les sous-unités α et $\beta\gamma$ des protéines G qui, par la suite, hydrolyse l'inositol membranaire avec la libération de diacylglycérol (stimulateur de la protéine kinase C) et de 1,4,5-triphosphate

(qui mène à la libération de Ca^{2+} intracellulaire)¹¹⁸ et ne semblent pas agir dans la voie canonique, dépendante de β -caténine¹¹⁷. L'expression maternelle de ces deux gènes et leur signalisation à travers CamKII sont responsables pour la spécification des destins cellulaires ventrales dans l'embryon de *Xenopus* et ça par le maintien d'un gradient de l'activité de CamKII (réduit au niveau dorsal et élevé dans le domaine ventral)¹¹⁷. Ces données viennent compléter la découverte que l'activité de β -caténine sous le contrôle de Dishevelled est responsable pour l'induction du destin dorsal dans le mésoderme chez le *Xenopus*^{119,120}.

1.7 Le gène *PRICKLE1* (PK1)

1.7.1 Caractéristiques structurales de PK. Interactions spécifiques.

PRICKLE1 code une protéine cytoplasmique de 831 acides aminés qui présente un domaine PET (de Prickle, Espinas, Testin – les protéines qui avaient permis l'identification de ce domaine) N-terminal, trois domaines LIM et un domaine PKH (prickle homologous)¹²¹ (**Figure 7**). Les domaines LIM représentent des motifs riches en cystéine et histidine généralement impliqués dans les interactions protéine-protéine. Chaque domaine LIM contient deux doigts de zinc avec une conformation spécifique maintenue par des interactions hydrophobiques^{122,123}. La région PET-LIM de Pk interagit avec le domaine DEP de Dsh et inhibe la localisation membranaire de Dsh et consécutivement celle de Fz¹²⁴. Le domaine PKH est commun pour toutes les protéines Prickle mais il n'a pas encore de fonction décrite¹²¹.

On a décrit la présence, dans la séquence de PK1, des deux motifs «D-box» (Destruction box) (RxxLxxxxN/D/E – «x» représente n'importe quel acide aminé) ; D-box 1 situé à la position des acides aminés 557-565 et D-box 2 à la position 699-707 (**Figure 7**). Ces deux motifs promeuvent la dégradation par ubiquitination de Dvl et en conséquence l'inhibition de la signalisation par la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer du foie¹²⁵. Chez le poisson

zèbre et le *Xenopus*, le même effet a été mis en évidence, mais accompagné en plus par une déstabilisation des complexes Fz/Dsh démontrant ainsi que Pk a la capacité de réguler de façon négative la voie Wnt/PCP^{126,127}.

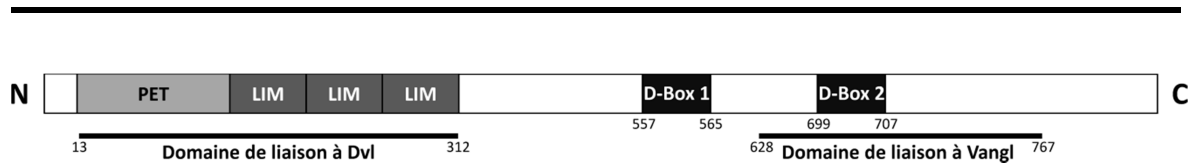


Figure 7. Diagramme de la protéine PRICKLE1 avec les plus importants domaines et leurs localisations.

Une séquence de 131 acides aminés proche de, mais n’incluant pas la région C-terminale de Pk, chez la *Drosophile* a été démontré d’être responsable pour l’interaction de Pk avec Stbm et de Pk avec lui-même. Cette région comprend des séquences d’acides aminés basiques et des résidus de serine conservés (chez la *Drosophile*, *Xenopus* et l’humain) et correspond à une région de 139 acides aminés de PRICKLE1 (628 à 767) (**Figure 7**). Le manque de ce fragment cause une altération de la polarité cellulaire dans les ommatidies de *Drosophile* par l’altération du recrutement de Pk par Stbm à la membrane cellulaire¹²⁸.

Pk présente dans sa région C-terminale une séquence signal pour la prénylation (CIIS). La prénylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui consiste dans l’attachement aux protéines des radicaux isoprényl. Ces modifications permettent l’attachement de la protéine aux membranes et certaines interactions protéine-protéine¹²⁹. La délétion du motif de prénylation n’affecte pas la localisation membranaire normale de Pk. Elle augmente quand même sa localisation cytoplasmique et nucléaire, comme il a été montré par l’injection chez le *Xenopus* d’une construction de Pk marqué avec GFP et manquant la séquence signal, suggérant que le recrutement à la membrane de Pk est seulement en partie dépendent de cette prénylation¹³⁰.

1.7.2 Prickle dans la voie non-canonique Wnt/Fz

1.7.2.1 Fonctions dans le module central du PCP

Prickle fait partie du groupe principal de protéines de la PCP et joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'asymétrie moléculaire dans la signalisation par la PCP.

Pendant la signalisation de la PCP, Prickle est recruté par Stbm à la membrane proximale des cellules¹²⁸ dans une manière dépendante de la présence des complexes Fz/Dsh sur la membrane distale des cellules proximales¹²⁴. En même temps, le bon fonctionnement de Pk est nécessaire pour le recrutement des complexes Fz/Dsh à la membrane distale des cellules proximales agissant ainsi de façon non-autonome¹²⁴. Pk agit donc dans une boucle de rétroaction pour amplifier les différences entre les niveaux initiales d'activité des complexes Fz/Dsh et moduler l'établissement de l'asymétrie moléculaire dans la PCP. L'importance de cet aspect fonctionnel de Pk est soulignée par le comportement différent des deux modules fonctionnelles principaux de PK: les domaines PET/LIM et le domaine de liaison à Vang et Dgo (le fragment de 131 acides aminés C-terminal). Une construction Δ PET/LIM (qui manque donc le domaine PET et les trois domaines LIM), de même que le fragment C-terminal agissent de manière dominant-négative dans la PCP^{127,128}. Une construction Δ C-term de Pk (manquant le fragment C-terminal) n'a pas de tels effets suggérant que le rôle le plus important de Pk serait dans le maintien de la boucle de rétroaction décrite ci-haut.

À part Stbm et Dsh, Prickle interagit avec Diego pour contrôler la distribution apicale de Fmi pendant l'initiation de la signalisation de la PCP. En échange, Fmi soutient le maintien d'un complexe formé par Stbm, Dsh et Fz aux surfaces adjacentes des cellules et dans leur domaine apical, facilitant ainsi leurs interactions spécifiques¹³¹.

Pk est en compétition directe avec Dgo pour lier Dsh. Pendant que, par sa liaison avec Dsh, Dgo stimule la signalisation de Fz, Pk agit plutôt comme inhibiteur de Dsh. La fonction combinée de Pk à côté de Dgo est donc celle de modulation de la voie Fz/Dsh par

le maintien d'un équilibre précis entre les complexes antagonistes qui s'y établissent¹³². Ça fait de *Pk* une composante non-linéaire et plutôt très dynamique de la PCP.

1.7.2.2 Fonctions sur les voies effecteurs de la PCP

Xenopus Pk lie JNK et joue un rôle central dans l'activation de JNK en réponse au fonctionnement de Dsh. Pendant que $\text{XPk}^{\Delta\text{PET/LIM}}$ (contenant juste la partie C-terminale de *Pk*) agit dans des études de surexpression dans un sens opposé au *Pk* sauvage, cela n'est plus valable en ce qui concerne l'effet sur l'activation de JNK par Dsh. On a observé que, à de grandes doses, Dsh est capable, lui seul, d'activer la JNK. $\text{XPk}^{\Delta\text{PET/LIM}}$, tout comme *Pk* sauvage inhibe cet effet, tandis que *Pk* contenant juste les domaines PET et LIM n'a pas cette propriété. Intéressant, aucune de ces versions tronquées de *Pk* n'est capable de lier JNK mais la version complète de *Pk* en est¹²⁷.

1.7.3 Le patron d'expression de *Prickle*

Chez le poisson zèbre et le *Xenopus*, *Pk* est exprimé maternellement au début des divisions de l'œuf. Pendant la gastrulation de ces deux organismes, son expression est située au niveau du mésoderme, de l'ectoderme et dans la plaque neurale^{126,133}.

Chez la souris, *Pkl* est exprimé dans l'entièreté de l'épiblast à 5.5dpc suivi par une réduction vers l'épiblast postérieur au niveau de l'initiation de la ligne primitive à 6.5dpc. À 7.5dpc l'expression au niveau de l'épiblast postérieur continue, surtout dans les cellules en train d'être intégrées dans la ligne primitive et celles qui se trouvent déjà dans la ligne primitive, faisant en sorte qu'à 8.0dpc l'expression de *Pkl* marque la totalité de la ligne primitive. On a trouvé *Pkl* exprimé aussi dans le nœud, le mésoderme paraxial et dans le mésenchyme des plis neuraux¹³⁴. Le patron d'expression de *Pkl* chez le poulet respecte les mêmes caractéristiques et confirme la continuation de son expression aux stades plus tardifs, dans la plaque du plancher et la notocorde sous-jacente au stade de Hamburger et

Hamilton¹³⁵ (HH) 10, surtout dans la région du rhombencéphale et du tube neural antérieur¹³⁶.

1.7.4 Rôle dans la gastrulation

Prickle agit en aval de Wnt5a et Slb/wnt11 pour participer dans le contrôle de la migration cellulaire dans le cadre de la CE pendant la gastrulation du poulet et du poisson zèbre^{126,137}. Chez le poulet, le poisson zèbre et le *Xenopus*, la surexpression de *Pk1a/XPk* aussi que sa perte de fonction affectent l'extension convergente et génèrent des phénotypes similaires: un axe du corps plus court et, dans le cas du *Xenopus*, même un phénotype semblable à la spina bifida^{127,137,138}.

Des études chez le poisson zèbre et le *Xenopus* ont révélé les mécanismes par lesquels Prickle participe dans le contrôle de la gastrulation et plus spécifiquement dans le contrôle de l'extension convergente. Chez le poisson zèbre, pendant la gastrulation, les cellules du mésoderme latéral convergent par une migration ordonnée vers le mésoderme axial. En même temps, les cellules du mésoderme axial s'intercalent dans la direction medio-latérale réalisant une extension très prononcée du tissu. Pendant ces mouvements cellulaires, il a été démontré que Pk1a se positionne à la membrane antérieure et ce positionnement est corrélé avec l'élongation médio-latérale des cellules du mésoderme postérieur. Cette distribution de Pk1a est accompagnée par une localisation membranaire postérieure de Dsh dans une manière dépendante de la signalisation par la voie non-canonique. Chez les mutants *trilobite-strabismus*, Pk1a et Dsh perdent ces localisations¹³⁹. Les mouvements et les intercalations cellulaires medio-latérales pendant la gastrulation sont altérés quand la fonction de Pk1a, Stbm et Fz est altérée. Chez le *Xenopus*, on a démontré que la motilité médio-latérale est dépendante de la déposition polarisée de la matrice extracellulaire de fibronectine qui est affectée par l'altération de la fonction de XStbm, XFz, Wnt11, Dsh et XPk. Puisque la perturbation expérimentale de la fonction de XPk, mais pas ceux des autres gènes de la PCP, peut être sauvée par une superficie exogène de

fibronectine, XPK semble détenir un rôle particulier dans la localisation et l'activation des complexes protéiques de la PCP en réponse aux signaux de polarité tissulaire déjà présents dans l'embryon. L'assemblage polarisé de la matrice extracellulaire sous le contrôle de la PCP semble fournir, à travers XPK, un signal polarisant qui est essentiel pour la régulation ultérieure par la PCP de la polarisation cellulaire médio-latérale¹⁴⁰.

1.7.5 Rôle dans la voie canonique Wnt/Frizzled

Le fonctionnement des complexes Frizzled/Dishevelled et Stbm/Prickle dans la voie PCP et les mécanismes d'exclusion mutuelle entre eux (décrites en détails dans le chapitre 1.5.) ont soulevé la question d'une implication de Prickle dans la signalisation par la voie canonique de Wnt/Frizzled, dans laquelle Dishevelled joue un rôle central. Chez le poisson zèbre, il a été démontré qu'à partir d'une localisation initialement cytoplasmique de Dsh (nécessaire pour la signalisation dans la voie canonique de Wnt¹⁴¹), celle-ci est recrutée à la membrane cellulaire en présence de Fz7. La surexpression de *Pkl* inhibe cette localisation de Dsh et diminue les niveaux intracellulaires de Dsh de façon significative¹²⁶. Le même effet avait été mis en évidence chez le *Xenopus* où on a aussi démontré que Pkl peut avoir un modeste effet inhibiteur sur l'activation par Wnt des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine, *siamois* et *xnr3*¹³⁰. Peut-être la plus convaincante mise en évidence de l'activité de Prickle1 dans la voie canonique de Fz/Dvl provient d'une étude effectuée dans le carcinome hépatocellulaire humain. La surexpression de *Prickle1* dans des cellules du carcinome hépatocellulaire, SMMC7721 et BEL7402, qui présentent un haut niveau d'expression de *Dvl3* avait conduit à une réduction significative (et dans une manière dépendante du niveau d'expression de Prickle1) des niveaux de Dvl3 et de la β -caténine. Des cibles du TCF/ β -caténine comme la c-myc et la cycline D1 ont vu aussi leurs niveaux diminuer comme résultat de la surexpression de *Prickle1*. Par contre, dans les cellules traitées avec chlorure de lithium (un inhibiteur de GSK3 β), la stabilité de la β -caténine avait augmentée et la surexpression de Prickle1 n'induit plus une si grande réduction de la β -

caténine, démontrant que l'effet de *Prickle1*, observé auparavant, se produit à travers la voie Dvl3-Axine/GSK3 β /APC/ β -caténine¹²⁵.

1.7.6 Rôle dans la voie Wnt/Calcium

La surexpression de *Pk1* augmente la libération de Calcium intracellulaire dans la blastule du poisson zèbre démontrant aussi un rôle de *Pk* dans la voie non canonique Wnt/Calcium. Cette activité de *Pk1* devient évidente seulement pendant le stade de transition mid-blastuléenne quand l'activation de la transcription zygotique des gènes commence^{130,142}. Dans ce contexte, comme les autres composantes de la PCP qui activent la voie WNT/Calcium, *Wnt5a* et *Fz2*, *Pk1* n'a pas d'effet sur la voie Wnt/beta-caténine¹³⁰.

1.7.7 Le knock-out de *Prickle1* chez la souris

Récemment, une souris knock-out pour *Pk1* a été générée et son étude a révélé de nouveaux aspects intéressants des fonctions de *Pk1* et possiblement des autres membres de la voie PCP dans l'embryogenèse des mammifères.

Chez les souris *mpk1*^{-/-}, la polarité apico-basale de l'épiblast est perdue, fait démontré par le positionnement aberrant à E5.5 de l'aPKC, un déterminant apical, quand comparé aux contrôles et par la localisation cytoplasmique de l'E-cadherin (quoique elle nécessite un positionnement membranaire apical), suggérant l'affectation des jonctions adhérentes. En même temps, à E5.5, la matrice extracellulaire des cellules de l'épiblast a été trouvée affectée avec l'affectation consécutive, à E6.5 des orientations des fuseaux de division, dont l'épiblast dépend pour acquérir une organisation correcte similaire à un épithélium pseudo-stratifié. Cela indique la nécessité pour *Pk1* dans l'établissement de la polarité apico-basale de l'épiblast à l'étape de prégastrulation.

Quoique les hétérozygotes *mpk1*^{+/-} soient viables et fertiles, les souris *mpk1*^{-/-} arrêtent leur développement à E6.5 avec une mortalité précoce embryonnaire. On a constaté chez les homozygotes l'absence de formation du mésoderme et de migration antérieure de l'endoderme viscéral distal. À E6.5, on n'a pas pu détecter la présence des marqueurs

mésodermiques *Wnt3* et *T* ni celle de *Bmp4* permettant la conclusion que le mésoderme et la ligne primitive échouent se former. Pourtant, à E5.5 l'expression de *Wnt3* et de *T* a été détectée dans l'épiblast proximal comme chez les souris contrôle suggérant que les cellules de l'épiblast proximal n'arrivent plus à migrer vers le postérieur et explicable par les défauts qui avaient été trouvés dans l'épiblast de ces souris. La détection à E5.5 d'une expression normale de *Bmp4* corroborée avec le fait que Nodal est responsable pour le maintien de cette expression et avec une expression normale de *Nodal* à E5.5-E6.5 suggèrent la possibilité que *mpk1* pourrait induire la formation du mésoderme en interagissant avec la voie Nodal¹⁴³.

2. Projet de recherche

2.1 Problématique

Les anomalies du tube neural (ATN) touchent 1-2/1000 naissances et représentent une cause majeure de mortalité périnatale. Les enfants avec ATN sont exposés à un risque de mortalité plus élevé dans la première année de vie comparé à la population générale et représentent un fardeau financier important pour les systèmes de santé à travers le monde. Les coûts des soins associés avec un patient présentant spina bifida par exemple, sont estimés à plus de 70000\$ par année pour les premiers vingt ans de vie¹⁴⁴. La supplémentation diététique en acide folique avait réduit de façon significative les nouveaux cas avec ATN, pourtant leur prévalence reste élevée.

Les ATN sont des maladies multifactorielles impliquant des facteurs environnementaux et génétiques. Quoique de nombreux facteurs génétiques ont été étudiés chez les ATN, le nombre et l'identité des gènes impliqués dans le développement des ATN restent jusqu'à présent largement inconnus¹⁴⁵. La perte de fonction des gènes de la voie non-canonique Fz/Dvl cause des ATN chez la souris. Chez l'humain, des mutations des membres de la voie PCP, *VANGL1* et *VANGL2*, aient été associées aux ATN¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Ces études impliquent fortement la contribution des principaux gènes de la voie PCP dans le développement des ATN chez l'humain.

2.2 Hypothèse et objectives

Notre hypothèse est que le membre de la voie de signalisation non-canonique du Fz/Dvl *PRICKLE1* est impliqué dans le développement des ATN chez l'humain.

Notre projet implique l'étude génétique moléculaire du gène de la voie PCP *PRICKLE1* en ayant deux objectifs principaux :

- (1) L'identification des mutations spécifiques aux patients dans *PRICKLE1* dans une grande cohorte des ATN bien caractérisée
- (2) La validation fonctionnelle des mutations identifiées au point (1)

2.3 Pertinence et retombées

L'identification de gènes prédisposant aux ATN aidera à mieux comprendre les mécanismes pathogéniques impliqués dans ces maladies, qui restent encore très peu connus. Ces études sont essentielles pour caractériser les interactions entre les gènes et l'environnement dans les ATN, ce qui permettra de développer des nouvelles stratégies de prévention et de faciliter le conseil génétique pour les couples à risque.

3. Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene *PRICKLE1* in human neural tube defects

Ciprian M. Bosoi¹, Valeria Capra², Redouane Allache¹, Vincent Quoc-Huy Trinh¹, Patrizia De Marco², Elisa Merello², Pierre Drapeau³, Alexander G. Bassuk⁴, and Zoha Kibar^{1,*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, CHU Sainte Justine Research Center and University of Montréal; ²Laboratorio del Servizio di Neurochirurgia, Istituto G. Gaslini, Genova, Italy; ³Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Montreal, Canada; ⁴Department of Pediatrics, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA

*To whom correspondence should be addressed: Zoha Kibar, CHU Sainte Justine Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine, Room A711, Montreal, QC H3T 1C5 Canada;

Contract grant sponsor: Grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, the SickKids Foundation, the Canadian Institutes for Health Research (Grant no. 86520), NIH 1R01 NS064159-01A1, the Gaslini Foundation and Telethon-Italy (Grant no. GGP08051).

Apport de coauteurs

Ciprian M. Bosoi:

Le séquençage du gène *PRICKLE1* dans 714 des 810 patients atteints par des ATN qui ont fait l'objet de l'étude et dans 346 contrôles

L'analyse bioinformatique des mutations identifiées

La validation fonctionnelle des mutations, spécifiquement: **(1)** La conception des expériences décrites dans l'article, **(2)** les expériences de biologie moléculaire, **(3)** les microinjections d'ARN chez le poisson zèbre, **(4)** l'analyse phénotypique des embryons et **(5)** les analyses statistiques (sauf la détermination des clusters phénotypiques, réalisée par Dr. Farida Kibar).

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

Valeria Capra, Patrizia De Marco et Elisa Merello: Le recrutement du groupe de 421 patients italiens inclus dans cette étude ainsi que des 346 contrôles italiens

Redouane Allache: La réalisation d'une partie des expériences de surexpression de *Prickle1a* chez le poisson zèbre

Vincent Quoc-Huy Trinh: le séquençage de 96 patients de l'étude

Pierre Drapeau: L'expertise pour les expériences effectuées sur les poissons zèbre et le support logistique pour ces expériences

Alexander Bassuk: Le recrutement des 389 patients des États-Unis et le génotypage de 5 mutations dans un groupe de 1050 contrôles provenant de "Human Genome Diversity Project"

Zoha Kibar:

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

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

La rédaction du manuscrit

ABSTRACT

The planar cell polarity (PCP) pathway controls the process of convergent extension (CE) during gastrulation and neural tube closure and has been implicated in the pathogenesis of neural tube defects (NTDs) in animal models and human cohorts. In this study, we analyzed the role of one core PCP gene *PRICKLE1* in these malformations. We screened this gene in 810 unrelated NTD patients and identified 7 rare missense heterozygous mutations that were absent in all controls analyzed and predicted to be functionally deleterious using bioinformatics. Functional validation of 5 *PRICKLE1* variants in a zebrafish model demonstrated that one variant, p.Arg682Cys, antagonized the CE phenotype induced by the wild-type zebrafish *prickle1a* in a dominant fashion. Our study demonstrates that *PRICKLE1* could act as a predisposing factor to human NTDs and further expands our knowledge of the role of PCP genes in the pathogenesis of these malformations.

Planar cell polarity (PCP) is the process by which epithelial cells become polarized along the plane of the epithelium. It was first described and studied in details in *Drosophila* where it controls the orientation of the hair cells in the developing wing and abdomen and of the sensory organ precursor cells of the notum and the ommatidial arrangement in the compound eye. Genetic studies of a wide range of mutants affecting these highly organized PCP structures led to the identification of a group of “core” PCP genes that include: *frizzled* (*fz*), *dishevelled* (*dsh*), *prickle-spiny legs* (*pk*), *strabismus/ vangogh* (*stbm/vang*), *flamingo/ starry night* (*fmi/stan*) and *diego* (*dgo*) (Simons and Mlodzik, 2008). The PCP or non-canonical Fz/Dsh pathway is highly conserved in vertebrates where all these core PCP genes have corresponding orthologs and homologs (Simons and Mlodzik, 2008). In vertebrates, PCP mediates a complex morphogenetic process called convergent extension (CE) during gastrulation and neural tube formation. During this process, cells elongate, move mediolaterally and intercalate between neighboring cells, leading to convergence towards the mediolateral axis and extension along the anteroposterior axis (Bassuk and Kibar, 2009). PCP is also implicated in other developmental processes including directional migration of facial motor neurons, oriented cell division, regulation of neuronal and nonneuronal cellular morphology and shape changes, axon guidance, orientation of sensory hair cells in the organ of Corti and ciliogenesis (Simons and Mlodzik, 2008). Defects in PCP signaling in mouse result in a wide range of developmental anomalies including neural tube defects (NTDs), polycystic kidneys, conotruncal heart defects and deafness (Simons and Mlodzik, 2008). In humans, mutations in two PCP genes, *VANGL2* and *VANGL1*, homologs of *van gogh*, were associated with NTDs, providing the first lines of evidence for the involvement of PCP in the pathogenesis of these malformations (Kibar et al., 2007; 2009; 2011). NTDs, including anencephaly and spina bifida, are the most common and severe malformations of the central nervous system, affecting 1-2/1000 births. They result from embryonic failure of neural tube closure that can occur at any level of the embryonic axis. Despite the protective effect of periconceptional supplementation with folic acid against a large fraction of NTDs (~50-70%), thousands of families are still affected with

these conditions urging the need for better understanding of the underlying pathogenesis. NTDs have a complex etiology involving interactions among environmental and genetic factors whose identities remain largely unknown (Bassuk and Kibar, 2009).

In this study, we focused on investigating the role of one core PCP gene, *PRICKLE1* (MIM#608500), homolog 1 of *pk* in *Drosophila*, in human NTDs. *PRICKLE1* encodes a cytoplasmic protein with an N-terminal PET (Pk, Espinas, Testin) domain, three LIM domains and a C-terminal PKH (prickle homologous) domain (Katoh and Katoh, 2003). The LIM domain is a cysteine-rich sequence with two zinc-finger motifs that mediates protein-protein interactions. The N-terminal PET domain combines with the three LIM domains during interactions with other proteins. The C-terminal domain contains a CaaX-motif prenylation site that determines protein-protein and protein-membrane interactions (Veeman et al., 2003). Pk physically interacts with other PCP components to modulate signaling through this pathway. Upon Fz activation, Stbm recruits Pk to the cell membrane, and through this interaction, Pk affects Stbm membrane localization and can cause clustering of Stbm. Pk competes with Dgo for Dsh binding and is thought to antagonize Dsh by affecting its membrane localization (Jenny et al., 2003; Das et al., 2004). Both gain-of-function and loss-of-function of *PRICKLE1* in *Xenopus* and zebrafish lead to defective convergent extension movements, manifested mainly by a shortened body axis (in both organisms) and spina bifida (in frog embryos) (Carreira-Barbosa et al, 2003; Takeuchi et al., 2003; Veeman et al., 2003). In mouse, knocking out *prickle1* leads to early embryonic lethality that is associated with failure of distal visceral endoderm migration and primitive streak formation resulting mainly from loss of apico-basal (AB) polarity in the epiblast tissue, suggesting a cross-talk between AB and PCP (Tao et al., 2009).

The well-established role of PCP signaling in the pathogenesis of NTDs in mouse models and humans as well as the effect of Prickle1 on CE movements in lower vertebrates prompted us to analyze this core PCP gene in human NTDs. We sequenced the open reading frame and exon-intron junctions of *PRICKLE1* in a large and multi-ethnic cohort of open and closed forms of NTDs. The cohort consisted of 810 NTD patients affected with

non-syndromic or isolated NTDs, where 66% of patients were affected with myelomeningocele or open spina bifida and 32% were affected with various forms of closed spinal NTDs. Of all 810 patients, 42% were male and 84% were of Caucasian White non-Hispanic origin. The two other major ethnic groups present in this cohort consisted of Hispanics (9%) and African Americans (4%) (Supp. Table S1) (Supp. Materials and Methods).

Our screening strategy of *PRICKLE1* in human NTDs focused on the coding exons where many of the disease-associated mutations are found (Stenson et al., 2009) (Supp. Materials and Methods). We have identified 9 rare missense mutations that were all absent in either 346 ethnically matched Italian control subjects (for the Italian cohort) or 1050 HGDP individuals (for the American multi-ethnic cohort) (Table 1). All these mutations were also absent from the dbSNP and 1000 genome databases. Of these, 7 mutations were predicted to be damaging to protein function using bioinformatics tools (PolyPhen and SIFT) (Table 1). These 7 “potentially pathogenic” variants are described in the next paragraphs in the order that they occur in the *PRICKLE1* protein. The DNA mutation and amino acid numbering systems are based on *PRICKLE1* cDNA sequence with the accession NM_001144881.1 and *PRICKLE1* protein sequence with the accession NP_001138353.1 respectively. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence. The initiation codon is codon 1.

Two variants, p. Ile69Thr (c.206T>C) and p.Asn81His (c.241A>C), were identified in the PET domain of *PRICKLE1* (Supp.Fig.S1). The p. Ile69Thr variant was identified in a 22 year-old Italian female affected by diastematomyelia type II which represents a complex dysraphic state caused by the failure of the midline integration of the notochord leading to a variably elongated separation of the spinal cord in two hemicords (Rossi et al., 2004). At birth, the proband showed a tuft of hair in the lumbar-sacral region. MRI showed schisis of the lumbar vertebrae (L2-L3) associated with a low-lying spinal cord and diastematomyelia characterized by the presence of two hemicords at level D12-L1. This

mutation was transmitted by her unaffected mother. Isoleucine is invariant across all species analyzed except in *Drosophila* where it is replaced by valine (Supp.Fig.S1). While isoleucine and valine are both highly similar in their hydrophobic non polar nature, a substitution by threonine is not conservative as it reduces the hydrophobicity at this position. The p.Asn81His variant was detected in an American male patient of a mixed Caucasian and African American origin and affected with lumbosacral myelomeningocele, a severe form of open NTDs characterized by exposure of the placode (a segment of flattened, non-neurulated embryonic neural tissue) through a midline skin defect in the back. The mutation was transmitted by his mother. Remarkably, Asn81 forms part of a 12 amino acids block that is absolutely conserved to *Drosophila* (Supp.Fig.S1). This change is not conservative as it introduces a positively charged amino acid at a normally neutral position.

One variant, p.Thr275Met (c.824C>T), was identified in the 3rd LIM domain of PRICKLE1 (Supp.Fig.S1). This mutation was detected in a 22 year-old Italian patient affected with lumbosacral myelomeningocele, hydrocephalus, Chiari type II malformation, and tethered cord. Thr275 forms part of an absolutely conserved “HWHAT” motif. The substitution of a threonine residue (neutral polar) by a methionine (neutral non polar) is not conservative as it reduces hydrophilicity. Four variants were identified in the last 284 amino acids at the carboxy terminus of PRICKLE1 (Supp.Fig.S1). One variant, p.Val550Met (c.1648G>A), was identified in a white Caucasian male affected with myelomeningocele. Val550 is highly conserved and a valine-to-methionine substitution is non-conservative; although both residues are apolar, methionine is less lipophilic due to its thiogroup. One variant, p.Arg682Cys (c.2044C>T), was identified in a white Caucasian American male affected with myelomeningocele. This mutation was transmitted from his mother. This arginine residue is conserved in all vertebrates analyzed and is replaced by serine in *Drosophila* (Supp.Fig.S1). An arginine (basic)-to-cysteine (neutral, polar) substitution is not conservative as it removes the positive charge at this residue. One variant, p.Ser739Phe (c.2216C>T), was detected in a white Caucasian American male

affected with myelomeningocele and that represents a familial NTD case with an affected paternal first degree cousin (not available for this study). This mutation was transmitted from the mother. However, the family NTD history was reported on the paternal side of the family; this reflects the complexity of the etiology of NTDs. One could hypothesize the presence of a cluster of gene variants (that remain largely unknown) on both paternal and maternal sides of the family that may interact with each other and/or with environmental factors to modulate NTD incidence; or alternatively, the NTD in the affected case and the NTD in his paternal cousin are caused by different risk factors as expected for a heterogeneous disease such as NTDs. Ser739 is highly conserved in human, mouse, dog, cow, chicken and frog (Supp.Fig.S1). A serine to phenylalanine substitution is not conservative as it reduces the hydrophilicity at this position. One variant, p.Asp771Asn (c.2311G>A), was detected in a white Caucasian American male affected with caudal agenesis, which represents a heterogeneous constellation of anomalies comprising total or partial agenesis of the spinal column, anal imperforation, genital anomalies, bilateral renal dysplasia or aplasia, pulmonary hypoplasia, and lower limb abnormalities. The mutation was transmitted from the unaffected mother. Asp771 is invariant across all species analyzed except in zebrafish and *Drosophila* where it is replaced by glutamate and serine respectively (Supp.Fig.S1). A substitution of aspartate (acidic) to asparagine (neutral) is not conservative as it removes the negative charge at this position.

Our genetic data implicate *PRICKLE1* in the pathogenesis of a fraction of human NTDs (7 in 810 or 0.8%) where we identified 7 rare missense mutations that were absent in all controls analyzed and that were predicted to be pathogenic *in silico*. All these mutations were heterozygous and private. In each case, when parents were available for DNA analysis, *PRICKLE1* mutations were detected in one of the parents indicating incomplete penetrance; or alternatively this could be caused by phenotypic variability since the parent could be affected by a mild undetected form of closed NTDs. None of these mutations map close to the intron-exon boundaries and hence most likely do not lead to splicing defects.

In order to test the potential impact of these *PRICKLE1* variants on protein function, we used a zebrafish model where overexpression of the wild-type *pk1a* leads to a defective CE manifested mainly by shortened body axis (Veeman et al., 2003) (Supp. Materials and Methods). We introduced the human mutations in the zebrafish *prickle1a* (*zpk1a*) open reading frame using site-directed mutagenesis. With this assay, we were only able to validate 5 variants (p.Ile69T, p.Asn81His, p.Thr275Met, p. Val550Met and p.Arg682Cys), since the two other variants (p.Ser739Phe and p.Asp771Asn) were not conserved in zebrafish. We first injected *zpk1a* RNA at 100, 200, 300 pg and 400 pg doses to determine the optimal dose that causes a significant perturbation in CE movements in injected embryos (Supp.Fig.S2). Injection of 200-400 pg wild-type *zpk1a* alone produced a range of phenotypes that were clustered into three groups based on the phenotype severity (grade 1: wild-typelike, grade 2: intermediate and grade 3: severe) (Fig. 1A). We examined the distributions of these three clusters at a dose of 400 pg among all 6 groups described above. The anticipated results of this overexpression assay are as follows: if the *zpk1a* variant has no effect on protein function, it will behave like the wild-type *zpk1a* and produce similar phenotypes and a similar distribution of the 3 groups defined above; if the *zpk1a* variant is a hypermorph, it will produce more severe phenotypes and a larger number of grade 2 and/or grade 3 embryos; and lastly if the *zpk1a* variant is a loss-of function mutation, then it will not lead to CE defects and will behave like the uninjected embryos. The distribution of the 3 clusters in uninjected wild-type fish was similar to that observed in wild-type fish injected with the vital dye fast-green (Fig.1B). As expected, the distribution of the clusters obtained with wild-type *zpk1a* was significantly different from uninjected wild-type fish ($P<0.05$) and from wild-type fish injected with the vital dye fast-green ($P<0.05$) (Fig.1B). When comparing each of the 5 *zpk1a* variants to wild-type *zpk1a*, overexpression of each of four variants, *zpk1a*^{I75T}, *zpk1a*^{N87H}, *zpk1a*^{T282M} and *zpk1a*^{R682C}, significantly perturbed CE movements with larger numbers of intermediate and severely-affected embryos (grades 2 and 3 respectively) ($P<0.01$ for *zpk1a*^{I75T}, $P<0.001$ for *zpk1a*^{N87H} and *zpk1a*^{R682C}, and $P<0.0001$ for *zpk1a*^{T282M} as compared to wild-type *zpk1a*) (Fig.1B), suggesting that these

variants could act as hypermorphs. For the variant, *zpk1a*^{V545M}, a high level of mortality of ~50% was observed at a dose of 400pg and hence its overexpression was carried out at a lower dose of 300pg. At this lower dose, this variant behaved like the wild-type *zpk1*, causing severe but not statistically-significant reduction in axial length (Fig.1B).

To test whether any of the *pk1a* variants could antagonize the effects of overexpressed wildtype *zpk1a* and hence could act in a dominant negative fashion, we co-injected 200 pg of each of these variants and the wild-type *zpk1a* RNA and studied the resulting phenotype (Fig. 1C-G). If a variant antagonizes the effect of overexpressed wild-type *zpk1a*, a reduction in phenotype severity would be observed. On the contrary, if there is no antagonizing effect, an increase in phenotype severity would be expected as both the variant and wild-type *zpk1a* would be acting jointly in the same pathway to cause CE defects. Only one variant, *zpk1a*^{R682C}, seemed to antagonize the wild-type *zpk1a* in a dominant fashion because its co-injection with the wild-type *zpk1* rescued the phenotype produced when either the wild-type or variant was injected alone (*P* was significant at <0.05 only when compared to the variant alone) (Fig.1G). In contrast, the phenotype of wild-type *zpk1a* was not rescued but significantly enhanced with each of the two variants, *zpk1a*^{I75T}, and *zpk1a*^{N87H}, suggesting that they do not antagonize the wild-type *zpk1a* at the injected dose (*P*<0.0001 and *P*< 0.025 respectively) (Fig.1C,D). Interestingly, two variants, *zpk1a*^{T282M} and *zpk1a*^{V545M}, seem to be antagonized by the wildtype, since their co-injection with the wild-type *zpk1a* rescued the phenotype produced with the variant alone (*P*<0.001 and *P*<0.01 respectively) (Fig.1E,F).

In PCP signaling, knockdown of PCP core genes by antisense morpholino oligos as well as their overexpression leads to similar CE defects, indicating a finely-tuned and dosage sensitive pathway. We consequently did dose-response experiments to assess the effect of higher doses (300 and 400 pg) of each of the 5 variants when co-injected with 200 pg of wild-type *zpk1a* respectively. A significant reduction in phenotype severity was observed only for the variant *zpk1a*^{I75T} when coinjected with the wild-type *zpk1a* at 300 pg and 400 pg respectively (*P*<0.0001) (Fig.1C,H), suggesting that this variant could

antagonize the effect of the wild-type *zpk1a* at higher doses . A reduction in phenotype severity was observed for the variant *zpk1a*^{N87H} but was not significant (Fig.1D,H). For each of the two variants, *zpk1a*^{T282M}, *zpk1a*^{V545M}, co-injection of higher doses of either 300 pg or 400 pg with 200 pg of wild-type *zpk1a* did not change significantly the phenotypes obtained with co-injection of 200 pg (Fig.1E,F,H). The variant *zpk1a*^{R682C} manifests a complex dose response when co-injected with wild-type *zpk1a* at higher doses. At 300 pg, this variant continues to antagonize the wild-type as manifested by a smaller percentage of affected phenotypes ($P < 0.05$); this antagonistic activity seems to peak at 300 pg and then levels off at a higher dose of 400 pg where we observe an increase in CE phenotype severity (Fig.1H). This could be interpreted as an excess of the variant (at a dose of 400 pg) that is exerting its hypermorphic activity. In conclusion, our basic validation data in zebrafish suggest that 4 variants, *zpk1a*^{I75T}, *zpk1a*^{T282M}, *zpk1a*^{V545M}, and *zpk1a*^{R682C}, act antagonistically with the wildtype *zpk1a*, at different doses. Of these, only one variant, *zpk1a*^{R682C}, seems to antagonize wild-type *zpk1a* in a dominant negative fashion in this model. No significant antagonistic effect was observed between the variant *zpk1a*^{N87H} and the wild-type *zpk1a* at any dose of co-injection.

Additional experiments in cellular or animal models are needed to further validate the “hypothesized” pathogenicity of *PRICKLE1* variants detected in our study. In *Drosophila*, it was shown that upon binding of an unknown ligand to the Fz receptor, several PCP proteins become localized asymmetrically in the plane of the epithelium in a mutually interdependent manner, forming different subsets of PCP proteins at the proximal (Vang/Pk) and distal (Fz/Dsh) sides of adjacent cells. Fmi interacts with both Dsh/Fz and Vang/Pk complexes for stabilizing and propagating the polarity signals across adjacent cells. Dgo competes with Pk for Dsh binding ensuring tight control over PCP signaling. In particular, Pk was shown to interact with three other PCP core proteins: Dsh through its PET/LIM domains, Vang and Dgo through a stretch of 131 amino acids close to, but not including, its very C terminus (Supp.Fig.S1) (Jenny et al., 2003). The Vang/Dgo binding domain of Pk overlaps with 6 amino acids of its PKH domain. Three variants (p.Ile69Thr,

p.Asn81His and p.Thr275Met) map to the PET/LIM Dsh-binding domains and three variants (p.Arg682C, p. Ser739Asn, p.Asp771Asn) map to or close to the Vang/Dgo binding domain (Supp.Fig.S1). Any of these mutations could affect the interaction of PRICKLE1 with its binding partner(s) and interfere with the polarized protein distribution required for PCP signalling. One other variant, p.Val550Met, maps close to a Destruction box (D-box motif) implicated in Dvl3 ubiquitination/degradation in canonical Wnt/Fz β -catenin signalling in human hepatocellular carcinoma (Chan et al., 2006) (Supp.Fig.S1). In zebrafish, it was shown that pk1a blocks the Fz7-dependent membrane localization of Dsh by down-regulating levels of Dsh protein; however the mechanisms of such degradation are not determined yet. One could hypothesize that the variant p.Val550Met could affect the ability of PRICKLE1 to down-regulate DVL levels and negatively regulate the PCP pathway.

In humans, a homozygous missense mutation in *PRICKLE1* was identified in an autosomal recessive form of progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. This mutation disrupts the interaction of PRICKLE1 with REST *in vitro* and the function of Pk1 in convergent extension in a zebrafish model (Bassuk et al., 2008). Mouse Prickle 1 was discovered independently in a yeast two hybrid screen based on its ability to functionally interact with a transcriptional repressor called REST/NRSF (RE-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor) that is an essential regulator of neural genes. It was hypothesized that the disruption of this interaction caused by the epilepsy mutation in *PRICKLE1* would lead to constitutive activation of REST and consequently inappropriate silencing of REST target genes in neuronal and nonneuronal cells. A recent study showed that mutations in *prickle* genes are associated with seizures in humans, mice, and flies (Tao et al., 2011). Our results led us to hypothesize that either interactions of PRICKLE1 with various interacting proteins (PCP members or REST) could be differently affected by PRICKLE1 variations, thus resulting in distinct alterations of downstream pathways or processes and therefore explaining the phenotypic diversity of the PRICKLE1-related spectrum. Transgenic animal models bearing variations in *PRICKLE1* will be necessary in

future to dissect the multifaceted role of this gene in development and maintenance of the central nervous system.

The cohort used in this study was previously screened for mutations in two other PCP genes, *VANGL1* and *VANGL2*. To date, all known variations of the PCP genes are missense; however, the presence of pathogenic copy number variants in these genes in NTDs cannot be excluded by our screening strategies. All mutations are heterozygous, partially penetrant and present in sporadic and familial cases of NTDs. The majority of these mutations are private. The phenotype of *VANGL1* and *VANGL2*, and *PRICKLE1* mutations is variable including open and closed forms of NTDs. No patient carried potentially pathogenic mutations in more than one of these 3 PCP genes. It will be interesting to screen other PCP genes in NTDs and examine digenic combinations of mutations since variants at PCP loci might act in combination to confer a high risk for developing NTDs, as may be the case with a multifactorial threshold model for NTDs in humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all participants who made this study possible. We thank Dr. Masazumi Tada for providing the *zpk1* pCSDest construct. We also thank Farida Kibar for her help in statistical analyses and Edna Brustein for the technical support on zebrafish experiments.

REFERENCES

- Bassuk AG, Kibar Z. 2009. Genetic basis of neural tube defects. *SeminPediatrNeurol* 16:101-110.
- Bassuk AG, Wallace RH, Buhr A, Buller AR, Afawi Z, Shimojo M, Miyata S, Chen S, Gonzalez-Alegre P, Griesbach HL, et al. 2008. A homozygous mutation in human *PRICKLE1* causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *Am J Hum Genet* 83:572-581.

- Carreira-Barbosa F, Concha ML, Takeuchi M, Ueno N, Wilson SW, Tada M. 2003. Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development* 130: 4037-4046.
- Chan DW, Chan C, Yam JW, Ching Y, Ng IO. 2006. Prickle-1 Negatively Regulates Wnt/[beta]-Catenin Pathway by Promoting Dishevelled Ubiquitination/Degradation in Liver Cancer, *Gastroenterology* 131:1218-1227.
- Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. 2004. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development* 131:4467-4476.
- Domené S, Roessler E, El-Jaick KB, Snir M, Brown JL, Ve'lez JI, Bale S, Lacbawan F, Muenke M, Feldman B. 2008. Mutations in the human *SIX3* gene in holoprosencephaly are loss of function. *Hum Mol Genet*, 17:3919–3928.
- Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M. 2003. Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J* 22:4409-4420.
- Katoh M, Katoh M. 2003. Identification and characterization of human PRICKLE1 and PRICKLE2 genes as well as mouse Prickle1 and Prickle2 genes homologous to *Drosophila* tissue polarity gene prickle. *Int J Mol Med* 11:249-256.
- Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, Salem S, Finnell RH, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P. 2009. Novel mutations in *VANGL1* in neural tube defects. *Hum Mutat* 30:E706-715.
- Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, Pauwels E, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P. 2011. Contribution of *VANGL2* mutations to isolated neural tube defects. *Clin Genet*. 80:76-82.
- Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, Kirillova I, De Marco P, Merello E, Hayes JM, et al. 2007. Mutations in *VANGL1* associated with neural-tube defects. *N Engl J Med* 356:1432-1437.

- Rossi A, Cama A, Piatelli G, Ravegnani M, Biancheri R, Tortori-Donati P. 2004. Spinal dysraphism: MR imaging rationale. *J. Neuroradiol* 31: 3-24.
- Simons M, Mlodzik M. 2008. Planar cell polarity signaling: From fly development to human disease. *Annu Rev Genet* 42:517-540.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS, Cooper DN. 2009. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med* 1:13.
- Takeuchi M, Nakabayashi J, Sakaguchi T, Yamamoto TS, Takahashi H, Takeda H, Ueno N. 2003. The *prickle*-Related Gene in Vertebrates Is Essential for Gastrulation Cell Movements. *Curr Biol* 13:674-679.
- Tao H, Suzuki M, Kiyonari H, Abe T, Sasaoka T, Ueno N. 2009. Mouse *prickle1*, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14426-14431.
- Tao H, Manak JR, Sowers L, Mei X, Kiyonari H, Abe T, Dahdaleh NS, Yang T, Wu S, Chen S, Fox MH, Gurnett C, Montine T, Bird T, Shaffer LG, Rosenfeld JA, McConnell J, Madan-Khetarpal S, Berry-Kravis E, Griesbach H, Saneto RP, Scott MP, Antic D, Reed J, Boland R, Ehaideb SN, El-Shanti H, Mahajan VB, Ferguson PJ, Axelrod JD, Lehesjoki AE, Fritsch B, Slusarski DC, Wemmie J, Ueno N, Bassuk AG. 2011. Mutations in *prickle* orthologs cause seizures in flies, mice, and humans. *Am J Hum Genet* 88:138-149.
- Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. 2003. Zebrafish *Prickle*, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Curr Biol* 13:680-685.

FIGURE LEGEND

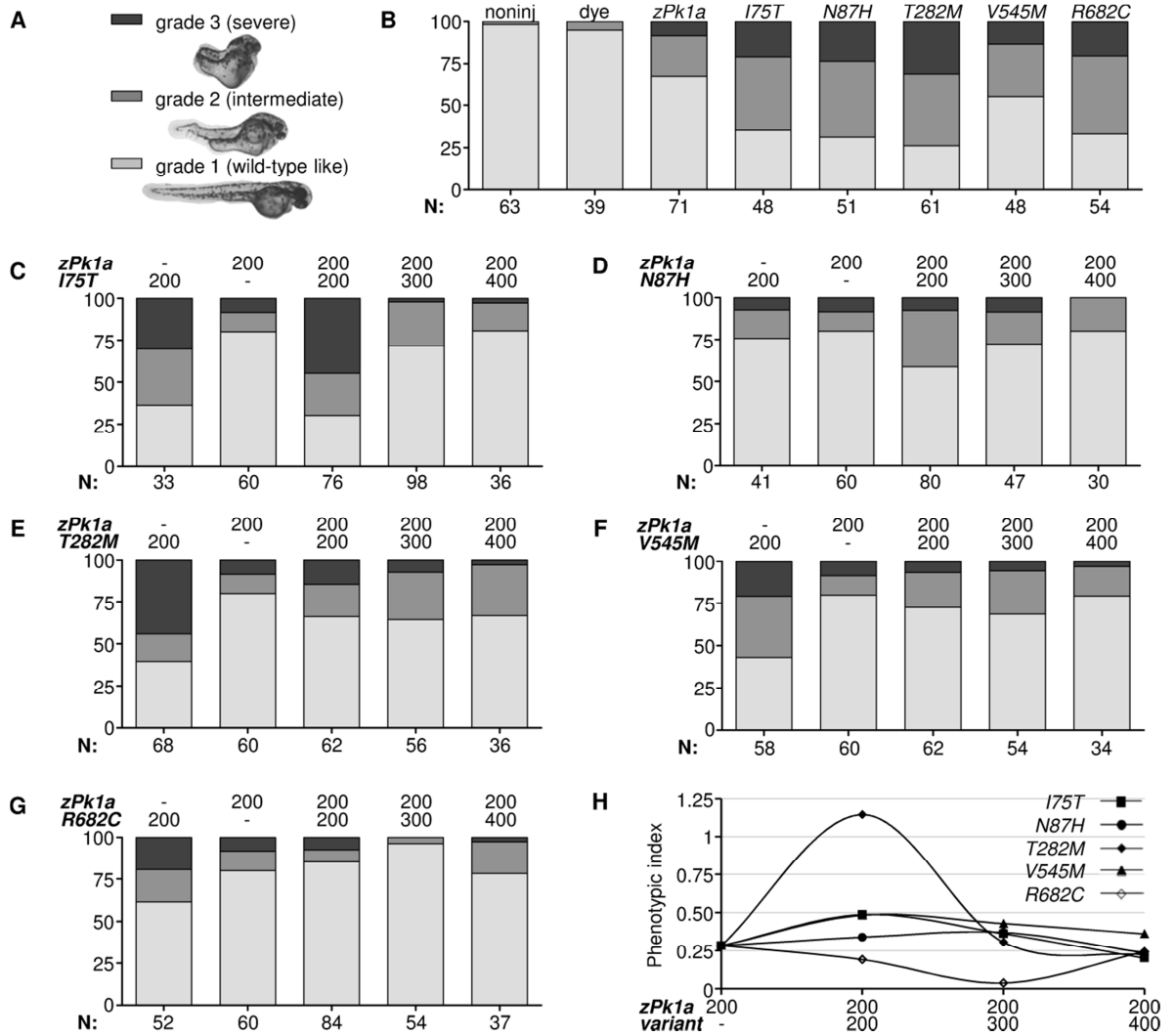


Figure 1. (A) Lateral views of 2 days post fertilization zebrafish illustrating the 3 clusters identified based on phenotype severity. (B) The distribution of the 3 clusters in each of the experimental groups: uninjected, injected with vital dye, and injected with each of wild-type *zpk1a* and of the 5 *zpk1a* variants. All injections were done at 400 pg except for the variant V545M that was injected at 300 pg. (C-G) The distribution of the 3 clusters in each of the experimental groups injected with 200pg of each of the *zpk1a*, *I75T*, *N87H*, *T282M*,

V545M and *R682C* mRNA as well as in the experimental groups where 200 pg, 300pg and 400pg of the mutant *zpk1a* was co-injected respectively with 200 pg of the wild-type *zpk1a*. The Y-axis represents the percentages of the 3 clusters. (H) A dose-response curve for the co-injection assay of 200 pg wild-type *zpk1a* with 200 pg, 300 pg and 400 pg of each of the 5*zpk1a* variants respectively. The Y-axis represents the phenotypic index that measures the distribution of phenotypic classes described in panel A and that is determined by multiplying the number of embryos in each grade by an assigned value (grade 1 = 0, grade 2 = 1, grade 3 = 2) and dividing the sum by the total number of embryos (see Supp. Materials and Methods).

Table 1. Rare missense variants (<1%) identified in *PRICKLE1* in human neural tube defects.^a

Amino acid change	Nucleotide change	Freq. in patients ^b	Freq. in controls ^b	Exon	Domain	PolyPhen prediction	SIFT prediction
<i>Potentially damaging</i>							
p.Ile69Thr	c.206T>C	1	0	2	PET	Probably damaging	Intolerant
p.Asn81His	c.241A>C	1	0	2	PET	Possibly damaging	Intolerant
p.Thr275Met	c.824C>T	1	0	6	LIM3	Probably damaging	Intolerant
p.Val550Met	c.1648G>A	1	0	7	Close to D-Box1	Benign	Intolerant
p.Arg682Cys	c.2044C>T	1	0	7	Vangl/Dgo binding	Benign	Intolerant
p.Ser739Phe	c.2216C>T	1	0	7	Vangl/Dgo binding	Probably damaging	Intolerant
p.Asp771Asn	c.2311G>A	1	0	7	PKH	Benign	Intolerant
<i>Benign</i>							
p.Val121Ile	c.361G>A	1	0	3	Close to LIM1	Benign	Tolerant
p.Ala124Thr	c.370G>A ^c	6	40	3	LIM1	Benign	Tolerant
p.Ser799Cys	c.2396C>G	1	0	7		Benign	Tolerant

^aThe position of the mutations is given with reference to sequence accession NM_001144881 for the *PK1* cDNA and NP_001138353.1 for the protein.

^bThe patients' group included 421 Italian patients and 389 American patients; the control group included 346 Italian controls and 1050 HGDP individuals (www.cephb.fr/)

^cthe variant c.370G>A is reported in the dbSNP as rs79087668 and was not considered for further evaluation

Supplementary MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

The cohort consisted of 421 Italian patients recruited at the Spina Bifida Center of the Gaslini Hospital in Genova, Italy and 389 patients recruited at the Children's Memorial Hospital in Chicago, IL, United States. Detailed clinical information on both cohorts is as presented in Supp. Table S1. The folate status is known only for mothers of Italian patients who all lacked periconceptional folic acid supplementation. The control group included in this study consisted of 346 unrelated, randomly selected children admitted to the Gaslini Children's Hospital for miscellaneous illnesses and healthy young adults who had contributed samples to the blood bank of the Gaslini Institute as well as 1050 individuals from The Human Genome Diversity Project originating from 51 world populations throughout the world(www.cephb.fr/). All samples from patients and controls were collected with the approval of the local ethics committee and written informed consent was obtained from all patients, parents, and control individuals.

Sequencing of *PRICKLE1*

The genomic structure of *PRICKLE1* was determined using the NCBI (GeneID: 144165) and Ensembl (transcript ID: ENST00000345127) databases. Primers flanking the exon–intron junctions were developed manually and used to amplify the coding region and the exon–intron junctions of *PRICKLE1* from genomic DNA. The entire coding region of *PRICKLE1* of 2493 bp was amplified in a total of nine amplicons. PCR was carried out as previously described (Kibar et al., 2009). Primers' sequences and PCR conditions are available upon request. Direct dye terminator sequencing of PCR products was carried out using the ABI Prism Big Dye Systems at the Genome Quebec Innovation Center (Montréal, Québec, Canada). Samples were run on ABI 3700 automated sequencer and analysed using the SeqMan[®] sequence assembly and SNP discovery software (from DNASTAR[®]). Variants were confirmed by PCR from resampled patients and were tested in other family

members. Genotyping of the Italian controls and the HGDP panel was done by direct sequencing or the Sequenom iPLEX Gold technology respectively.

Bioinformatics

Mutations nomenclature was given following the Human Genome Variation Society guidelines (<http://www.hgvs.org>) and sequence variant description was checked by Mutalyzer – sequence variant nomenclature check V1.0.1. program (<http://www.LOVD.nl/mutalyzer/>). Two public databases were queried for the occurrence of the identified mutations in *PRICKLE1*: dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) and the 1000 genome project (<http://www.1000genomes.org>). The potential pathogenic effect of the identified mutations on protein function was predicted using the two software programs: PolyPhen (Polymorphism Phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>). Default conditions were used for the programs. Multiple alignments of the Pk proteins were performed using the MegAlign software (CLUSTAL W method).

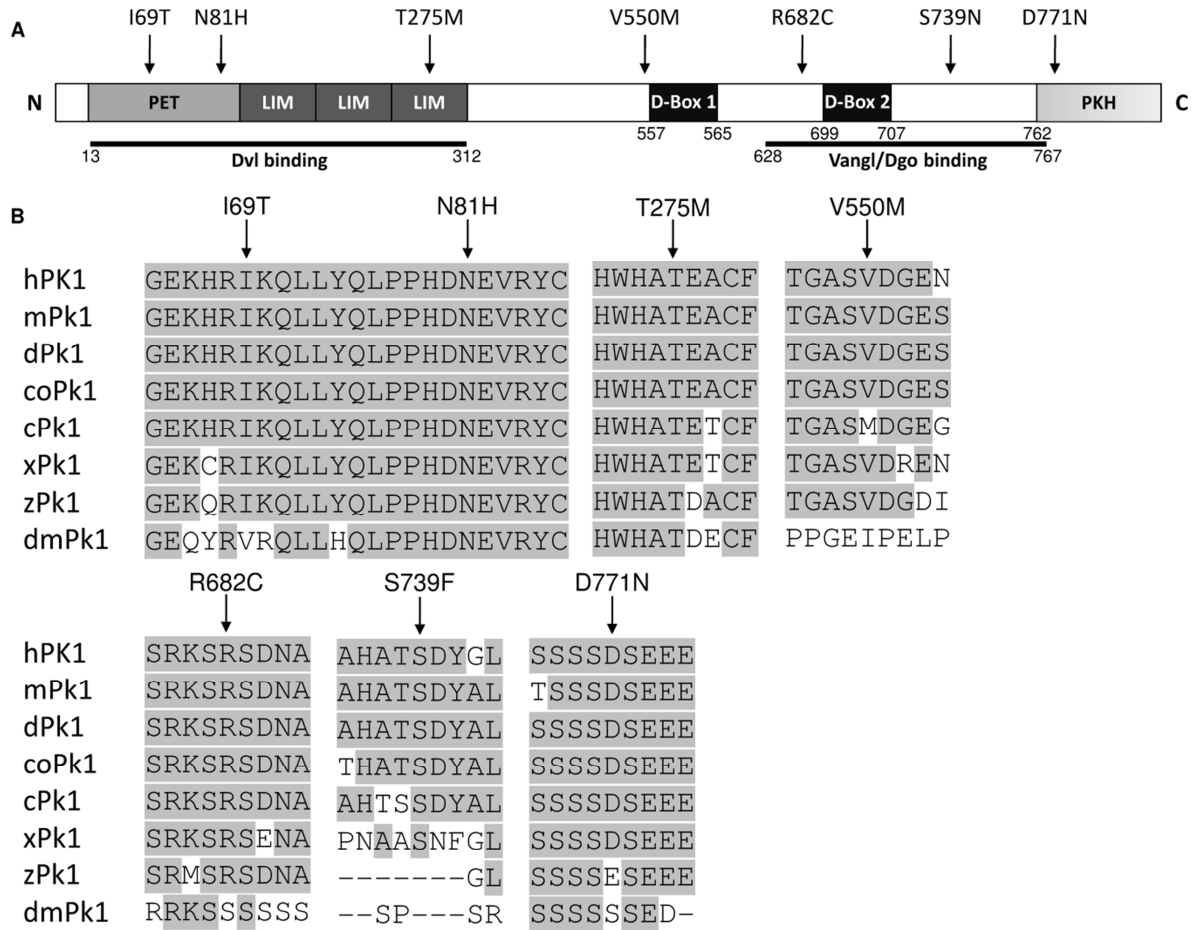
Zebrafish validation

Zebrafish experiments were conducted with a pCSDest clone containing the *zpk1a* ORF that was a gift from Dr. Masazumi Tada. The *PRICKLE1* mutations were introduced in the *zpk1a* ORF by site-directed mutagenesis. Primers' sequences for this assay are described in Supp.Table S2. All constructs were verified by sequencing. Sense capped RNA was synthesized using the mMMESSAGE mMACHINE transcription kit (Ambion) as described by the manufacturer. Injections were performed in Longfin zebrafish oocytes at the one to four cell stage. The vital dye fast-green was incorporated to the injection vehicle to monitor injection quality (0.1%; Sigma). For the overexpression assay, 300–400 pg of zebrafish *prickle1a* mRNA was used. For the genetic interaction study, we used a 400 pg dose of an equimolar mix of wild-type *zpk1a* mRNA and mutated *zpk1a* mRNA. For dose-response experiments, we co-injected 300 pg or 400 pg of the mutated *zpk1a* with 200 pg of the wild-type *zpk1a* respectively. Body length was assessed at 2 days post fertilization.

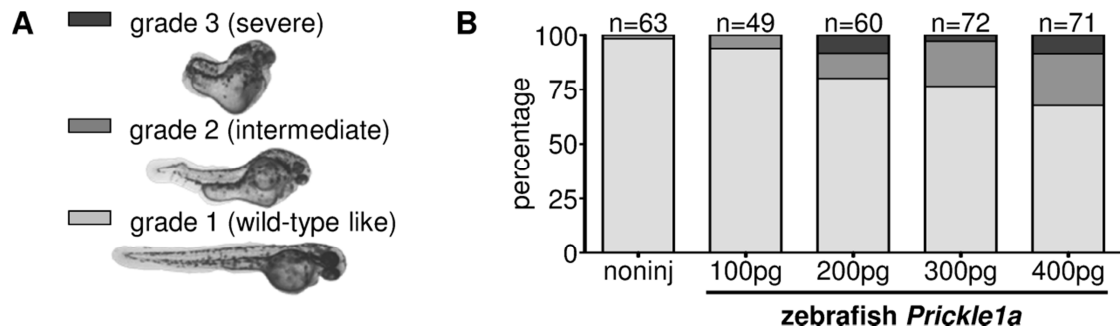
Measures were conducted using ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009). A body length ratio was calculated by dividing each individual body length of the injected fish by the mean body length of all corresponding non-injected fish. For quantification of the *zpk1a* activity alone or co-injected with the mutant *zpk1a* in the dose response experiment, we determined a Phenotypic Index as previously described (Domené et al, 2008). Each grade has been assigned a score as follows: grade 1 (wild-type like) = 0, grade 2 (intermediate) = 1, grade 3 (severe) = 2. PI was determined by multiplying the number of embryos in each grade by the corresponding assigned value and dividing the sum by the total number of embryos. So if we consider N_g as the number of embryos (N) in each phenotypic grade (g), PI was calculated using the formula: $(N_1 \times 0 + N_2 \times 1 + N_3 \times 2)/(N_1 + N_2 + N_3)$.

Statistical analyses

Cluster analysis was done using the SSPS statistics software. To define the 3 grades of zebrafish phenotypes, the body length ratios of a total of 71 embryos injected with 400 pg wild-type *zpk1a* were subjected to k-means clustering analysis with the number of centroids set at 3. Three cluster centroids were identified with mean body length ratios of 0.9618 (grade 1: wild-type like), 0.7289 (grade 2: intermediate) and 0.4373 (grade 3: severe) respectively. Then k-means clustering with classification was used to classify all additional cases from other experimental groups based on the original cluster centroids. A Chi-square test was used to analyse the difference in distribution of the clusters among the experimental groups.



Supp. Figure S1. *PRICKLE1* mutations in neural tube defect (NTD) patients. (A) A topological model of *PRICKLE1* is shown with the approximate positions of the seven potentially pathogenic mutations identified in NTD patients. (B) A partial alignment of human *PRICKLE1* with seven other Prickle sequences. Residues conserved between *PRICKLE1* and other family members are highlighted. The *PRICKLE1* variants found in NTD patients affect conserved residues (indicated by arrows). Accession numbers: human *PRICKLE1* (hPK1), NP_001138353.1; mouse *Prickle1* (mPk1), NP_001028389.1; dog *Prickle1* (dPk1), XM_534833.2; cow *Prickle1* (coPk1), NP_001096004.1; chicken *Prickle1* (cPk1), XP_416036.2; frog *Prickle1* (xPk1), NP_001016939.1; zebrafish-*Prickle1* (zPk1), NP_899185.2 and *Drosophila Prickle* (dmPk), NP_724535.1.



Supp. Figure S2. (A) Lateral views of 2 days post fertilization zebrafish illustrating the 3 clusters identified based on phenotype severity. (B) The distribution of the 3 clusters in the non-injected group and in each of the four experimental groups injected with 100, 200, 300 and 400pg of wild-type *zpkl1a* RNA, respectively (χ^2 test, $P < 0.05$ for groups injected with 200pg, 300pg and 400pg of RNA as compared to the uninjected fish). The Y bar represents the percentages of the 3 clusters.

Supp. Table S1. Characteristics of patients with neural tube defects.

	Group and Finding	
	Italian ^a	American ^b
No of patients	421	389
Ethnic origin	420 Caucasian white, 1 Hispanic	258 Caucasian white, 72 Hispanic, 32 African Americans, 9 Asian, 2 Asian white, 11 Hispanic white, 3 African white, 1 Asian Indian, 1 unknown
Male sex (%)	37	46.7
Mean age (yr)	11.8	ND
Familial type (%)	10.8	21
Clinical Diagnosis (no of patients)		
<i>Cranial dysraphisms</i>	(11)	(4)
Anencephaly	1	
Cephalocele	10	4
<i>Open spinal dysraphisms</i>	(211)	(325)
Myelomeningocele	208	325
Myelocele	3	
<i>Closed spinal dysraphisms</i>	(199)	(60)
<i>With subcutaneous mass</i>		
Lipomyelomeningocele	26	4
Lipomyelocele	17	
Terminal myelocystocele	3	4
Lipomyelocystocele		1
Lipomyeloschisis	15	
Meningocele	5	3
<i>Without subcutaneous mass</i>		
<i>(Simple forms)</i>		
Lipoma	38	4
Tight filumterminale	12	30
Dermal sinus	1	2
<i>(Complex forms)</i>		
Diastematomyelia	13	3
Caudal regression syndrome	69	3
<i>Unknown type</i>		6

^aThe Italian cohort was recruited at the Spina Bifida Center of the Gaslini Hospital in Genova, Italy. All mothers of Italian patients lacked periconceptual folic acid supplementation. ^bThe American Cohort was recruited at the Children's Memorial Hospital in Chicago, Illinois, United States. The folate status of mothers in this cohort is not known. ND: not determined.

Supp. Table S2.

Primers (5' -3') used for site-directed mutagenesis in the zebrafish *Prickle1a* open reading frame.^a

<i>Prickle1a</i>		
p.Ile75Thr	Forward	CGGAGAGAAACAGCGCA <u>C</u> TAAACAGCTCCTGTACC
	Reverse	GGTACAGGAGCTGTTTA <u>G</u> TGCGCTGTTTCTCTCCG
p.Asn87His	Forward	GCTGCCTCCTCACGAT <u>C</u> ATGAAGTGCGGTACT
	Reverse	AGTACCGCACTTCAT <u>G</u> ATCGTGAGGAGGCAGC
p.Thr282Met	Forward	CTTCACTGGCACGCCA <u>TG</u> GACGCGTGTTTCAGCT
	Reverse	AGCTGAAACACGCGTCC <u>CA</u> TGGCGTGCCAGTGAAG
p.Val545Met	Forward	TCCAACATCACAGGTGCTTCA <u>ATG</u> GATGGCGATATTAAAGACAAG
	Reverse	CTTGTCTTTAATATCGCCATCC <u>CA</u> TTGAAGCACCTGTGATGTTGGA
p.Arg682Cys	Forward	AGAAGAAGAAGAAGCCGCATGTCT <u>TG</u> TTCGGATAACGCAC
	Reverse	GTGCGTTATCCGA <u>ACA</u> AGACATGCGGCTTCTTCTTCTCT

^aAll substitutions are noted in bold, underlined. All constructs were verified by sequencing.

4. Discussion

La présente étude a permis l'identification de nouvelles mutations rares, spécifiques aux patients atteints par les ATN, dans le gène de la polarité planaire cellulaire *PRICKLE1*. C'est le troisième gène, après *VANGL1* et *VANGL2*, faisant partie de la voie non-canonique qui est ainsi impliqué dans la pathogenèse de ce spectrum de malformations congénitales.

Effets potentiels des mutations de PK1 sur les interactions spécifiques avec Vangl, DVL et DIVERSIN

PRICKLE1 a une fonction centrale dans l'établissement de l'asymétrie moléculaire qui se produit dans la signalisation par la PCP. Elle a été prouvée essentielle pour la bonne initiation de cette asymétrie et surtout pour la boucle de rétroaction qui amplifie et maintient un équilibre très précis entre les complexes multiprotéiques impliqués. *PRICKLE1* a été prouvée d'avoir des multiples interactions avec des autres protéines membres de la PCP, (*VANGL*, *DISHEVELLED*, *DIVERSIN*) et des protéines effecteurs (comme la *JNK*)^{124,127,128,131}. Ça nous donne un aperçu de la complexité des mécanismes qui sont mis en place pour établir et maintenir un équilibre très précis et à la fois délicat entre tous les composants de la signalisation par la PCP. Étant donnée cette complexité, on devrait s'attendre que des différents défauts au niveau d'une protéine modulaire tel que *PRICKLE1* vont probablement engendrer des différents effets aux différents niveaux fonctionnelles qui caractérisent la signalisation par la PCP. Les études effectués jusqu'à maintenant dans les organismes modèles ont démontré les rôles différentes et complémentaires des domaines fonctionnelles de *Prickle1*. Les domaines PET et LIM sont responsables de l'interaction avec *Dishevelled* et la région C-terminale contient le domaine d'interaction à *Vang* et *Dgo*. Le manque des domaines PET/LIM affecte dans une manière dominant-négative le phénotype d'extension convergente chez le poisson zèbre et le *Xenopus* tandis que ces domaines, seules, semblent reproduire la fonction de la protéine de type sauvage¹²⁷.

Trois des mutations identifiées dans cette étude sont situées au niveau des domaines PET/LIM de *PRICKLE1* et ainsi ont le potentiel d'affecter son interaction avec *DISHEVELLED* qui, comme déjà décrit, joue un rôle crucial dans l'établissement et la modulation de l'asymétrie des complexes multi-protéiques de la PCP. La surexpression de ces variantes chez le poisson zèbre nous a permis de conclure qu'elles ne causent pas une perte de fonction de *Prickle1* puisqu'elles sont toujours capables de reproduire le phénotype de la CE généré par la protéine de type sauvage. En ce qui concerne l'interaction génétique de ces variantes avec *Prickle1* sauvage, p.Asn81His ne semble pas agir de façon dominante négative comme on a pu observer en co-injectant de l'ARN de *Prickle1* contenant la mutation avec de l'ARN de *Prickle1* de type sauvage. La mutation p.Ile75Thr, quand co-injectée avec le gène de type sauvage dans un rapport de 3:2 et 4:2 sauve de façon significative le phénotype causé par le gène sauvage suggérant qu'elle pourrait, à des doses plus grandes, antagoniser la fonction du gène sauvage. En ce qui concerne les autres mutations, trois, p.Arg682C, p. Ser739Asn, p.Asp771Asn sont situées dans le domaine de liaison à Vangl et Dgo ou proche de ce domaine, et une quatrième, la p.Val550Met, dans la proximité d'un des motifs D-box impliqué dans le processus de dégradation de Dsh par ubiquitination. L'étude de surexpression de ces variantes a démontré qu'il n'y a toujours pas de perte de fonction de Pk causée par ces mutations. Par contre, la co-injection des variantes avec le gène de type sauvage nous a montré que la mutation p.Arg682C agit de façon dominant-négative, prouvant que, en effet, des mutations pathogéniques dans *PRICKLE1* soient associées aux défauts du tube neural chez l'humain. Le mécanisme exact par lequel la mutation p.Arg682C pourrait causer un comportement dominant-négatif de *PRICKLE1* nous échappe. Sa présence dans le domaine de liaison à Vangl et Dgo pourrait faire en sorte que le fonctionnement de ce domaine soit affecté. Étant donné que l'injection de cette variante chez le poisson zèbre avait montré un comportement hypermorphique nous permet de proposer un gain de fonction du domaine de liaison à Vang/Dgo. Comme il est connu que le manque des domaines PET/LIM de *PRICKLE1* génère une protéine dominant-négative, on pourrait aussi conclure qu'un gain de fonction du domaine de liaison à Vang/Dgo en présence des domaines PET/LIM ayant une fonction normale va aussi

déterminer un comportement dominant-négative de la protéine PRICKLE1. Une évaluation de cette hypothèse pourrait être réalisée par exemple en testant le caractère hypermorphique d'une construction $\Delta PET/LIM-PRICKLE1^{R682C}$ injectée chez le poisson zèbre.

Des études futures de validation des mutations de PK1 sur les interactions spécifiques avec les membres de la PCP

Étant donnée l'importance des modules fonctionnelles de PK1 et le haut degré de conservation de ces domaines à travers l'évolution il serait nécessaire de poursuivre les études afin d'identifier le mécanisme par lequel ces mutations pourraient affecter les interactions de PRICKLE1 avec ses partenaires dans la voie PCP. Une direction qui permettrait cela serait l'investigation de la capacité des variantes d'affecter le recrutement de Dishevelled par Frizzled à la membrane cellulaire de même que le recrutement de Prickle lui-même à la membrane cellulaire par Vangl. Cette approche serait appropriée pour mettre en évidence de manière différentielle l'impact des mutations sur des fonctions spécifiques des deux modules fonctionnelles de Prickle. On s'attend qu'une affectation de l'interaction de Pk avec Dsh (résultat de la fonction normale des domaines PET/LIM) ait comme résultat la persistance du recrutement de Dsh par Fz à la membrane cellulaire. Il est déjà démontré qu'en présence de Pk de type sauvage ce recrutement est diminué¹²⁷. Le même principe est valable dans le cas du recrutement de Pk à la membrane cellulaire par Vangl (réalisé grâce au domaine d'interaction avec Vangl et Dgo)¹²⁸. Comme dans le cas de Dsh, un trouble dans cette interaction ferait en sorte que Pk resterait dans le cytoplasme et ne serait pas localisée à la membrane. L'affectation de ces interactions, qui sont essentielles pour la signalisation par la PCP, pourrait entraîner le processus d'extension convergente et ainsi expliquer les ATN chez ces patients.

Alternativement, on pourrait tester l'effet des mutations de PK1 sur son interaction avec ses partenaires Dvl, Vangl2 ou Diversin, en utilisant le système double-hybride en levure. Ce système avait déjà été utilisé pour tester l'effet des mutations au niveau de *VANGLI* sur les interactions avec Dvl permettant ainsi de conclure l'effet pathogénique d'une de ces mutations (p.Val239Ile).

Le rôle de PK1 dans l'épilepsie chez l'humain

Prickle1 a été identifié dans un criblage double-hybride en levure étant un partenaire d'interaction de REST (RE-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor), un régulateur essentiel des gènes neuraux, et avait été nommé Rilf (REST/NRSF interacting LIM domain protein)¹⁴⁹.

PRICKLE1 est exprimé dans les neurones des régions cérébrales impliquées dans les convulsions épileptiques. La mutation c.311G/A [R104Q] a été identifiée dans des familles avec épilepsie myoclonique progressive et ataxie. C'est une mutation récessive qui cause une perte de fonction de la protéine et dans une expérience de surexpression dans le poisson zèbre a été prouvée de ne pas générer en entier le phénotype de l'extension convergente causé normalement par le gène de type sauvage. On a émis l'hypothèse que cette mutation affecterait l'interaction de PK1 avec REST et ainsi ce dernier serait constitutivement activé. Cela résulterait dans une activation anormale des cibles de REST dans des cellules neuronales et non-neuronales¹⁴⁹.

Le fait que la perte de fonction même des deux allèles de *PRICKLE1* n'a pas causé une anomalie du tube neural mais plutôt une forme d'épilepsie chez l'humain, démontre les multiples fonctions de cette protéine. D'un point de vue moléculaire, la mutation R104Q étant située dans le domaine PET de *PRICKLE1* et connaissant qu'une perte de fonction spécifiquement de ce domaine engendre une activité dominante négative de la protéine, c'est intéressant de constater que dans des cas comme celui-ci, une mutation située dans un des domaines fonctionnelles de *PRICKLE1* cause une perte de fonction et non une protéine dominant négative. La modularité fonctionnelle de *PRICKLE1* doit dépendre ainsi des scénarios dans lesquels cette protéine participe aux différentes voies de signalisation, fait qui suggère l'existence de différents cofacteurs qui ne sont pas encore connus et qui interagissent avec *PRICKLE1* dans ces voies.

La puissance des animaux modèles pour les études génétiques des ATN humains

La voie PCP constitue dernièrement un champ d'étude très attrayant pour déchiffrer les bases génétiques et moléculaires des défauts de la neurulation. La découverte du gène responsable pour le phénotype de craniorachischisis chez la souris Lp, *Vangl2*⁹², n'a fait que marquer le début d'une série d'études sur des modèles murins des ATN. Ceux-ci ont permis d'ajouter d'autres gènes de la voie PCP sur la liste de facteurs essentiels pour la fermeture du tube neural chez les vertébrées. En effet, sur les 14 gènes connus pour générer un phénotype de craniorachischisis chez la souris, 13 affectent la voie PCP et sont capables de générer ce phénotype soit seuls soit en association avec d'autres membres de la PCP⁵⁸. Les études sur la PCP chez la Drosophile et sur le rôle de la PCP dans la neurulation chez la souris, le poisson zèbre et le *Xenopus* ont démontré une haute conservation des gènes et phénomènes qui y sont impliqués. Dans ce contexte, investiguer le rôle de la PCP dans les ATN humaines a été un choix tout à fait naturel. Le gène *VANGLI* est devenu ainsi le premier gène humain faisant partie de la voie PCP qui a été impliqué dans les ATN^{146,147}. Les preuves pour le rôle de son homologue *VANGL2* ont suivi après¹⁴⁸. Les mutations identifiées dans ces deux gènes dans des patients avec ATN étaient des mutations rares, suggérant que leur contribution au total des cas d'ATN était plutôt mineure. En même temps, ça suggérerait que la voie PCP dans son ensemble aurait le potentiel d'expliquer une proportion significative des cas d'ATN.

Futures directions et défis

Les études génétiques basées sur une approche de gènes-candidats restent encore un outil très puissant dans la compréhension des ATN et elles nous permettront de tirer profit de la richesse de données issues des études sur les animaux modèles. Pourtant, avec le développement des nouvelles technologies, des approches génomiques ont le potentiel de nous offrir une image à une plus large échelle des gènes et possiblement, des interactions gène-environnement qui jouent un rôle dans la pathogenèse des ATN. Une première de ces approches le représente l'étude des variations du nombre de copies par hybridation génomique comparative sur puces à ADN (array-CGH) qui pourrait détecter les variations

non-balancées dans le nombre de copies d'un gène. Des larges délétions et insertions qui ne sont pas détectables au niveau microscopique avaient été impliquées dans d'autres classes d'anomalies congénitales telles que le retard mental¹⁵⁰ et auraient le potentiel d'identifier des nouveaux gènes avec une implication pathologique dans les ATN. Une duplication de 19.8 mégabases sur le chromosome 16 et provenant du chromosome 11 a même été identifiée dans une patiente avec spina bifida quoique ça n'avait permis l'identification du gène causatif¹⁵¹.

Pour les gènes qui avaient été re-séquencés dans l'étude de notre cohorte on s'est concentré sur les régions codantes et les jonctions intron-exon. Cela fait que des possibles modifications non-codantes dans les régions régulatrices de ces gènes, qui pourraient affecter leurs niveaux de transcription, ont été ignorées. Leur investigation serait une prochaine étape nécessaire dans cette série d'études, en ayant comme point de départ l'identification et la caractérisation des éléments régulateurs qui, jusqu'à maintenant, restent méconnus.

L'effet de la méthylation de l'ADN sur la régulation de la transcription génétique pourrait avoir une importance particulière dans les ATN étant donné le rôle reconnu que les folates jouent dans leur prévention. Ainsi, les cibles des futures études dans les ATN seront les modifications épigénétiques qui pourront être investiguées à l'échelle génomique par l'utilisation de l'immunoprécipitation de chromatine sur puce à ADN (ChIP-chip). La limitation majeure de ce type d'étude est le manque de tissus des patients affectés mais on peut anticiper la puissance que les souris modèles pourraient avoir dans les études de la méthylation dans les ATN.

Finalement, il est maintenant possible d'utiliser des technologies de séquençage de prochaine génération pour séquencer les exomes entiers des patients atteints des ATN. Le séquençage de tous les exons du génome d'un patient serait ainsi très rentable du point de vue des coûts et, en même temps, fournira des informations très complètes sur les modifications dans les régions codantes des gènes. Les mutations identifiées dans ces études permettront potentiellement l'identification des nouveaux gènes pertinents pour la

pathogénèse des ATN ainsi qu'offrir une vue d'ensemble sur les interactions génétiques et les interactions entre les gènes et l'environnement qui ont lieu dans ces malformations congénitales.

5. Conclusion

Nous avons identifié dans cette étude 9 nouvelles mutations hétérozygotes, spécifiques aux patients, dans le gène de la polarité planaire cellulaire *PRICKLE1*. Sept de ces mutations avaient été prédites par des méthodes bioinformatiques d'être pathogéniques. Nous avons démontré par la suite que la mutation p.Arg682Cys, agit de façon dominant-négative, étant capable d'antagoniser la fonction normale du gène de type sauvage dans un modèle poisson zèbre, *in vivo*. Cela suggère qu'elle est, fort probablement, pathogénique et indique la nécessité des études supplémentaires pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels cette mutation et les autres identifiées dans notre étude peuvent être prédisposantes, pour les anomalies du tube neural dans la population humaine.

Nos résultats font de *PRICKLE1* le troisième gène humain de la voie PCP, après *VANGL1* et *VANGL2*¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, qui soit impliqué dans la pathogenèse des ATN et confirment notre hypothèse. En plus, la même cohorte a été utilisée pour le re-séquençage de ces trois gènes. Les 7 mutations de *PRICKLE1* comptent pour une proportion de 0.8% de cette cohorte et considérées ensemble, les mutations identifiées jusqu'à présent dans ces trois gènes pourraient justifier une partie allant à plus de 4% des anomalies du tube neural chez l'humain. De cette perspective, l'analyse génétique et moléculaire des autres membres de la voie PCP sera un excellent outil pour mieux comprendre la pathogenèse de ce spectre de malformations congénitales.

Bibliographie

1. *Gray's Anatomy*. Thirtieth Edition. Churchill Livingstone
2. Gilbert SF. *Developmental Biology*. Eighth Edition. Sinauer Associates Inc. 2006.
3. Rossi A, Biancheri R, Cama A, et al. Imaging in spine and spinal cord malformations. *European Journal of Radiology*. 2004;50(2):177-200.
4. Wallingford JB. Neural tube closure and neural tube defects: Studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2005;135C(1):59-68.
5. Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev. Dyn*. 1999;215(3):273-283.
6. Hildebrand JD. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J. Cell. Sci*. 2005;118(Pt 22):5191-5203.
7. Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, et al. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development*. 2007;134(17):3203 -3211.
8. Eom DS, Amarnath S, Fogel JL, Agarwala S. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development*. 2011;138(15):3179 -3188.
9. Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development*. 2002;129(10):2507 -2517.
10. Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. *J. Pathol*. 2009;n/a-n/a.
11. Camerer E, Barker A, Duong DN, et al. Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo. *Dev. Cell*. 2010;18(1):25-38.
12. Greene NDE, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(4):303-311.
13. Holmberg J, Clarke DL, Frisén J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature*. 2000;408(6809):203-206.
14. Copp AJ, Greene NDE. Defining a PARTICULAR pathway of neural tube closure. *Dev. Cell*. 2010;18(1):1-2.

15. Copp AJ, Greene NDE, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet.* 2003;4(10):784-793.
16. O’Rahilly R, Müller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology.* 2002;65(4):162-170.
17. Mahalik SK, Vaze D, Lyngdoh TS, Tewari MK, Narasimhan KL. Embryogenesis of triple neural tube defects: sonic hedgehog--a key? *Journal of Pediatric Surgery.* 2011;46(2):e5-e8.
18. Catala M. Genetic control of caudal development. *Clinical Genetics.* 2002;61(2):89-96.
19. Lowery LA, Sive H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech. Dev.* 2004;121(10):1189-1197.
20. Blaas H-GK, Eik-Nes SH. Sonoembryology and early prenatal diagnosis of neural anomalies. *Prenat. Diagn.* 2009;29(4):312-325.
21. Bassuk AG, Kibar Z. Genetic Basis of Neural Tube Defects. *Seminars in Pediatric Neurology.* 2009;16(3):101-110.
22. Cohen Jr. MM. Malformations of the craniofacial region: Evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *American Journal of Medical Genetics.* 2002;115(4):245-268.
23. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *New England Journal of Medicine.* 1999;341(20):1509.
24. Deraut ER, George TM, Etchevers HC, et al. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27(3):515-524.
25. Rufener SL, Ibrahim M, Raybaud CA, Parmar HA. Congenital Spine and Spinal Cord Malformations--Pictorial Review. *Am. J. Roentgenol.* 2010;194(3_Supplement):S26-37.
26. Naidich TP, McLone DG, Mutluer S. A new understanding of dorsal dysraphism with lipoma (lipomyeloschisis): radiologic evaluation and surgical correction. *AJR Am J Roentgenol.* 1983;140(6):1065-1078.
27. Tortori-Donati P, Rossi A, Biancheri R, Cama A. Magnetic resonance imaging of spinal dysraphism. *Top Magn Reson Imaging.* 2001;12(6):375-409.
28. Finn MA, Walker ML. Spinal lipomas: clinical spectrum, embryology, and treatment. *Neurosurg Focus.* 2007;23(2):E10.
29. Elton S, Oakes WJ. Dermal sinus tracts of the spine. *Neurosurg Focus.* 2001;10(1):e4.

30. Conti P, Tenenbaum R, Capozza M, Mouchaty H, Conti R. Diastematomyelia and Tumor in Adults. *Spine*. 2010;35(24):E1438-E1443.
31. Pang D. Sacral agenesis and caudal spinal cord malformations. *Neurosurgery*. 1993;32(5):755-778; discussion 778-779.
32. Lynch SA, Wang Y, Strachan T, Burn J, Lindsay S. Autosomal dominant sacral agenesis: Currarino syndrome. *J Med Genet*. 2000;37(8):561-566.
33. Rossi A, Cama A, Piatelli G, et al. Spinal dysraphism: MR imaging rationale. *J Neuroradiol*. 2004;31(1):3-24.
34. Tortori-Donati P, Fondelli MP, Rossi A, et al. Segmental Spinal Dysgenesis: Neuroradiologic Findings with Clinical and Embryologic Correlation. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999;20(3):445-456.
35. Mitchell LE. Epidemiology of neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2005;135C(1):88-94.
36. Blom HJ, Shaw GM, Heijer M den, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(9):724-731.
37. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N. Engl. J. Med*. 2007;357(2):135-142.
38. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, et al. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N. Engl. J. Med*. 2004;350(2):134-142.
39. Molloy AM, Quadros EV, Sequeira JM, et al. Lack of association between folate-receptor autoantibodies and neural-tube defects. *N. Engl. J. Med*. 2009;361(2):152-160.
40. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):R113-R129.
41. Cogram P, Hynes A, Dunlevy LPE, Greene NDE, Copp AJ. Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(1):7-14.
42. Lynch SA. Non-multifactorial neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2005;135C(1):69-76.
43. Khoury MJ, Beaty TH, Liang KY. Can familial aggregation of disease be explained by familial aggregation of environmental risk factors? *Am. J. Epidemiol*. 1988;127(3):674-683.

44. Manning SM, Jennings R, Madsen JR. Pathophysiology, prevention, and potential treatment of neural tube defects. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2000;6(1):6-14.
45. Stamm DS, Rampersaud E, Slifer SH, et al. High-density single nucleotide polymorphism screen in a large multiplex neural tube defect family refines linkage to loci at 7p21.1-pter and 2q33.1-q35. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.* 2006;76(6):499-505.
46. Rampersaud E, Bassuk A, Enterline D, et al. Whole genomewide linkage screen for neural tube defects reveals regions of interest on chromosomes 7 and 10. *J Med Genet.* 2005;42(12):940-946.
47. van der Put NMJ, Trijbels FJM, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *The Lancet.* 1995;346(8982):1070-1071.
48. van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ. Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *QJM.* 1997;90(2):111-115.
49. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998;62(5):1044-1051.
50. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(5):433-443.
51. van der Linden IJM, Afman LA, Heil SG, Blom HJ. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proc Nutr Soc.* 2006;65(2):204-215.
52. Franke B, Vermeulen SHH., Steegers-Theunissen RPM, et al. An association study of 45 folate-related genes in spina bifida: Involvement of cubilin (CUBN) and tRNA aspartic acid methyltransferase 1 (TRDMT1). *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.* 2009;85(3):216-226.
53. Swanson DA, Liu ML, Baker PJ, et al. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(4):1058-1065.
54. Elmore CL, Wu X, Leclerc D, et al. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol Genet Metab.* 2007;91(1):85-97.
55. Hol FA, van der Put NM, Geurds MP, et al. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase,

methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin. Genet.* 1998;53(2):119-125.

56. Brody LC, Conley M, Cox C, et al. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71(5):1207-1215.

57. De Marco P, Merello E, Calevo MG, et al. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. *J. Hum. Genet.* 2006;51(2):98-103.

58. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.* 2010;88(8):653-669.

59. Kim T-H, Goodman J, Anderson KV, Niswander L. Phactr4 regulates neural tube and optic fissure closure by controlling PP1-, Rb-, and E2F1-regulated cell-cycle progression. *Dev. Cell.* 2007;13(1):87-102.

60. Ruland J, Duncan GS, Elia A, et al. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell.* 2001;104(1):33-42.

61. Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Verma IM. Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* 2000;14(14):1729-1733.

62. Miner JH, Cunningham J, Sanes JR. Roles for Laminin in Embryogenesis: Exencephaly, Syndactyly, and Placentopathy in Mice Lacking the Laminin α 5 Chain. *J Cell Biol.* 1998;143(6):1713-1723.

63. De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E. Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development.* 1999;126(17):3957-3968.

64. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, et al. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes & Development.* 1995;9(24):3136-3148.

65. Hirata H, Tomita K, Bessho Y, Kageyama R. Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J.* 2001;20(16):4454-4466.

66. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, et al. Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(14):1432-1437.
67. Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, et al. Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects. *Hum. Mutat.* 2009;30(7):E706-715.
68. Kibar Z, Salem S, Bosoi C, et al. Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clin. Genet.* 2011;80(1):76-82.
69. Reynolds A, McDearmid JR, Lachance S, et al. VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish. *Mech. Dev.* 2010;127(7-8):385-392.
70. Strutt D, Johnson R, Cooper K, Bray S. Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the *Drosophila* eye. *Curr. Biol.* 2002;12(10):813-824.
71. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 1998;12(16):2610-2622.
72. Axelrod JD. Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev.* 2001;15(10):1182-1187.
73. Usui T, Shima Y, Shimada Y, et al. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell.* 1999;98(5):585-595.
74. Bastock R, Strutt H, Strutt D. Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development.* 2003;130(13):3007-3014.
75. Tree DRP, Shulman JM, Rousset R, et al. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell.* 2002;109(3):371-381.
76. Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development.* 2004;131(18):4467-4476.
77. Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S. The Ankyrin Repeat Protein Diego Mediates Frizzled-Dependent Planar Polarization. *Developmental Cell.* 2001;1(1):93-101.
78. Goodrich LV. The Plane Facts of PCP in the CNS. *Neuron.* 2008;60(1):9-16.
79. Wu J, Mlodzik M. The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev. Cell.* 2008;15(3):462-469.

80. Chen W-S, Antic D, Matis M, et al. Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin Flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell*. 2008;133(6):1093-1105.
81. Axelrod JD. Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009;20(8):964-971.
82. Casal J, Lawrence PA, Struhl G. Two separate molecular systems, Dachsous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity. *Development*. 2006;133(22):4561-4572.
83. Ma D, Yang C-hui, McNeill H, Simon MA, Axelrod JD. Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature*. 2003;421(6922):543-547.
84. Lawrence PA, Casal J, Struhl G. Towards a model of the organisation of planar polarity and pattern in the Drosophila abdomen. *Development*. 2002;129(11):2749-2760.
85. Park WJ, Liu J, Sharp EJ, Adler PN. The Drosophila tissue polarity gene inturned acts cell autonomously and encodes a novel protein. *Development*. 1996;122(3):961-969.
86. Collier S, Gubb D. Drosophila tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. *Development*. 1997;124(20):4029-4037.
87. Lee H, Adler PN. The function of the frizzled pathway in the Drosophila wing is dependent on inturned and fuzzy. *Genetics*. 2002;160(4):1535-1547.
88. Jenny A, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt. Sinai J. Med.* 2006;73(5):738-750.
89. Wang Y, Nathans J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*. 2007;134(4):647-658.
90. Vladar EK, Antic D, Axelrod JD. Planar Cell Polarity Signaling: The Developing Cell's Compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(3).
91. Ybot-Gonzalez P, Savery D, Gerrelli D, et al. Convergent extension, planar cell polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development*. 2007;134(4):789-799.
92. Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, et al. Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat. Genet.* 2001;28(3):251-255.
93. Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev. Dyn.* 2011;240(3):616-626.

94. Lu X, Borchers AGM, Jolicoeur C, et al. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 2004;430(6995):93-98.
95. Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, et al. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev. Cell*. 2008;15(1):23-36.
96. Simons M, Mlodzik M. Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu Rev Genet*. 2008;42:517.
97. McNeill H. Planar Cell Polarity: Keeping Hairs Straight Is Not So Simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(2).
98. Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, et al. Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development*. 2003;130(11):2375-2384.
99. Wang Y, Guo N, Nathans J. The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neurosci*. 2006;26(8):2147-2156.
100. Montcouquiol M, Sans N, Huss D, et al. Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J. Neurosci*. 2006;26(19):5265-5275.
101. Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, et al. Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum. Mol. Genet*. 2003;12(2):87-98.
102. Paudyal A, Damrau C, Patterson V, et al. The novel mouse mutant, chuzhoi, has disruption of Ptk7 protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Developmental Biology*. 2010;10(1):87.
103. Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, et al. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*. 2000;405(6782):76-81.
104. Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J, Shi D. Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development*. 2000;127(14):3091-3100.
105. Kilian B, Mansukoski H, Barbosa FC, et al. The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech. Dev*. 2003;120(4):467-476.
106. Gong Y, Mo C, Fraser SE. Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature*. 2004;430(7000):689-693.

107. Rooryck C, Lacombe D. Le syndrome de Bardet-Biedl. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 2008;69(6):463-471.
108. Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, et al. Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* 2005;37(10):1135-1140.
109. Park TJ, Haigo SL, Wallingford JB. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturnd or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat. Genet.* 2006;38(3):303-311.
110. Park TJ, Mitchell BJ, Abitua PB, Kintner C, Wallingford JB. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet.* 2008;40(7):871-879.
111. Humbert PO, Dow LE, Russell SM. The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends in Cell Biology.* 2006;16(12):622-630.
112. Wada H, Iwasaki M, Sato T, et al. Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. *Development.* 2005;132(10):2273 -2285.
113. Devenport D, Fuchs E. Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nat Cell Biol.* 2008;10(11):1257-1268.
114. Kestler HA, Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1495):1333-1347.
115. Bienz M, Clevers H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell.* 2000;103(2):311-320.
116. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science.* 2004;303(5663):1483 -1487.
117. Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Is Stimulated by Wnt and Frizzled Homologs and Promotes Ventral Cell Fates in *Xenopus*. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(17):12701 -12711.
118. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature.* 1997;390(6658):410-413.
119. Heasman J, Crawford A, Goldstone K, et al. Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell.* 1994;79(5):791-803.

120. Miller JR, Rowning BA, Larabell CA, et al. Establishment of the Dorsal–Ventral Axis in *Xenopus* Embryos Coincides with the Dorsal Enrichment of Dishevelled That Is Dependent on Cortical Rotation. *The Journal of Cell Biology*. 1999;146(2):427–438.
121. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human PRICKLE1 and PRICKLE2 genes as well as mouse Prickle1 and Prickle2 genes homologous to *Drosophila* tissue polarity gene prickle. *Int. J. Mol. Med*. 2003;11(2):249–256.
122. Zheng Q, Zhao Y. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein–protein interaction. *Biol. Cell*. 2007;99(9):489.
123. Dawid IB, Breen JJ, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends in Genetics*. 1998;14(4):156–162.
124. Tree DRP, Shulman JM, Rousset R, et al. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell*. 2002;109(3):371–381.
125. Chan DW, Chan C-Y, Yam JWP, Ching Y-P, Ng IOL. Prickle-1 Negatively Regulates Wnt/[beta]-Catenin Pathway by Promoting Dishevelled Ubiquitination/Degradation in Liver Cancer. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1218–1227.
126. Carreira-Barbosa F, Concha ML, Takeuchi M, et al. Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development*. 2003;130(17):4037–4046.
127. Takeuchi M, Nakabayashi J, Sakaguchi T, et al. The prickle-Related Gene in Vertebrates Is Essential for Gastrulation Cell Movements. *Current Biology*. 2003;13(8):674–679.
128. Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M. Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J*. 2003;22(17):4409–4420.
129. Maurer-Stroh S, Eisenhaber F. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biol*. 2005;6(6):R55–R55.
130. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Current Biology*. 2003;13(8):680–685.
131. Das G, Jenny A, Klein TJ, Eaton S, Mlodzik M. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development*. 2004;131(18):4467–4476.

132. Jenny A, Reynolds-Kenneally J, Das G, Burnett M, Mlodzik M. Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat. Cell Biol.* 2005;7(7):691-697.
133. Wallingford JB, Goto T, Keller R, Harland RM. Cloning and expression of *Xenopus* Prickle, an orthologue of a *Drosophila* planar cell polarity gene. *Mechanisms of Development.* 2002;116(1-2):183-186.
134. Crompton LA, Du Roure C, Rodriguez TA. Early embryonic expression patterns of the mouse Flamingo and Prickle orthologues. *Developmental Dynamics.* 2007;236(11):3137-3143.
135. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics.* 1992;195(4):231-272.
136. Cooper O, Sweetman D, Wagstaff L, Münsterberg A. Expression of avian prickle genes during early development and organogenesis. *Developmental Dynamics.* 2008;237(5):1442-1448.
137. Sweetman D, Wagstaff L, Cooper O, Weijer C, Munsterberg A. The migration of paraxial and lateral plate mesoderm cells emerging from the late primitive streak is controlled by different Wnt signals. *BMC Developmental Biology.* 2008;8(1):63.
138. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Current Biology.* 2003;13(8):680-685.
139. Yin C, Kiskowski M, Pouille P-A, Farge E, Solnica-Krezel L. Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. *J Cell Biol.* 2008;180(1):221-232.
140. Goto T, Davidson L, Asashima M, Keller R. Planar Cell Polarity Genes Regulate Polarized Extracellular Matrix Deposition during Frog Gastrulation. *Current Biology.* 2005;15(8):787-793.
141. Capelluto DGS, Kutateladze TG, Habas R, et al. The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature.* 2002;419(6908):726-729.
142. Kane DA, Kimmel CB. The zebrafish midblastula transition. *Development.* 1993;119(2):447-456.
143. Tao H, Suzuki M, Kiyonari H, et al. Mouse prickle1, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106(34):14426-14431.

144. Deraut ER, George TM, Etchevers HC, et al. Human Neural Tube Defects: Developmental Biology, Epidemiology, and Genetics. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27(3):515-524.
145. Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clinical Genetics.* 2007;71(4):295-310.
146. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, et al. Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(14):1432-1437.
147. Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, et al. Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects. *Hum. Mutat.* 2009;30(7):E706-715.
148. Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, et al. Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clin. Genet.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738329>. Accessed January 14, 2011.
149. Bassuk AG, Wallace RH, Buhr A, et al. A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;83(5):572-581.
150. Vissers LELM, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14 Spec No. 2:R215-223.
151. Gustavsson P, Schoumans J, Staaf J, et al. Duplication 16q12.1-q22.1 characterized by array CGH in a girl with spina bifida. *Eur J Med Genet.* 2007;50(3):237-241.