

Faculté de Médecine

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 18 octobre 2024

Par Ophélie Boutfol

Description d'une cohorte de patients atteints d'holoprosencéphalie avec des variants du gène *SHH* : focus sur les microformes

Thèse dirigée par le Professeur Sylvie ODENT

Examineurs :

Mme le Professeur Catherine YARDIN, PU-PH, CHU de Limoges
Mme le Docteur Françoise ESCLAIRE, MCU-PH, CHU de Limoges
Mme le Professeur Sylvie ODENT, PU-PH, CHU de Rennes
Mme le Docteur Christèle DUBOURG, MCU-PH, CHU de Rennes
Mme le Docteur Lyse RUAUD, PH, CHU de Limoges

Présidente
Juge
Directrice
Juge
Membre invité





Faculté de Médecine

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 octobre 2024

Par Ophélie Boutfol

Description d'une cohorte de patients atteints d'holoprosencéphalie avec des variants du gène *SHH* : focus sur les microformes

Thèse dirigée par le Professeur Sylvie ODENT

Examineurs :

Mme le Professeur Catherine YARDIN, PU-PH, CHU de Limoges
Mme le Docteur Françoise ESCLAIRE, MCU-PH, CHU de Limoges
Mme le Professeur Sylvie ODENT, PU-PH, CHU de Rennes
Mme le Docteur Christèle DUBOURG, MCU-PH, CHU de Rennes
Mme le Docteur Lyse RUAUD, PH, CHU de Limoges

Présidente
Juge
Directrice
Juge
Membre invité



Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur **Pierre-Yves ROBERT**

Assesseurs

Madame le Professeur **Marie-Cécile PLOY**

Monsieur le Professeur **Jacques MONTEIL**

Monsieur le Professeur **Laurent FOURCADE**

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
AUBRY Karine	O.R.L.
BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE
CLAVERE Pierre	RADIOETHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE D'ADULTES
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
HUETO Jean-Luc	NEUROLOGIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
JOUAN Jérôme	CHIRURGIE THORACIQUE ET VASCULAIRE
LABROUSSE François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MAGNE Julien	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARCHEIX Pierre-Sylvain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE

MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
STURTZ Franck	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
YERA Hélène	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

Professeurs Associés des Universités à mi-temps des disciplines médicales

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
KARAM Henri-Hani	MEDECINE D'URGENCE
MOREAU Stéphane	EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE
VANDROUX David	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION

Maitres de Conférences des Universités – Praticiens Hospitaliers

COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
COUVE-DEACON Elodie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE/CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
GEYL Sophie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SALLE Laurence	ENDOCRINOLOGIE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

Maitre de Conférences des Universités associé à mi-temps

BELONI Pascale	SCIENCES INFIRMIERES
-----------------------	----------------------

Professeur des Universités de Médecine Générale

DUMOITIER Nathalie (Responsable du département de Médecine Générale)

Professeur associé des Universités à mi-temps de Médecine Générale

HOUDARD Gaëtan (du 01-09-2019 au 31-08-2025)

LAUCHET Nadège (du 01-09-2023 au 31-08-2026)

Maitres de Conférences associés à mi-temps de médecine générale

BAUDOT Pierre-Jean (du 01-09-2023 au 31-08-2026)

BUREAU-YNIELA Coralie (du 01-09-2022 au 31-08-2025)

SEVE Léa (du 01-09-2021 au 31-08-2024)

Professeurs Emérites

ALDIGIER Jean-Claude du 01-09-2023 au 31-08-2024

LACROIX Philippe du 01-09-2024 au 31-08-2026

MABIT Christian du 01-09-2022 au 31-08-2024

MOREAU Jean-Jacques du 01-09-2019 au 31-08-2024

NATHAN-DENIZOT Nathalie du 01-09-2022 au 31-08-2024

TREVES Richard du 01-09-2023 au 31-08-2024

VALLAT Jean-Michel du 01-09-2023 au 31.08.2025

VIROT Patrice du 01-09-2023 au 31-08-2024

Assistants Hospitaliers Universitaires

ABDALLAH Sahar	ANESTHESIE REANIMATION
BOYER Claire	NEUROLOGIE
CHAZELAS Pauline	BIOCHIMIE
CUSSINET Lucie	ORL
FERRERO Pierre-Alexandre	CHIRURGIE GENERALE
FRAY Camille	PEDIATRIE
GRIFFEUILLE Pauline	IPR
HERAULT Etienne	PARASITOLOGIE
JADEAU Cassandra	HEMATOLOGIE BIOLOGIE
KHAYATI Yasmine	HEMATOLOGIE
LAIDET Clémence	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION
MEYER Sylvain	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE HYGIENE
PERANI Alexandre	GENETIQUE
PLATEKER Olivier	ANESTHESIE REANIMATION
SERVASIER Lisa	CHIRURGIE OPHTHOPEDIQUE

Chefs de Clinique – Assistants des Hôpitaux

ABDELKAFI Ezedin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
AGUADO Benoît	PNEUMOLOGIE
ANNERAUD Alicia	HEPATOLOGIE GASTROENTEROLOGIE
AUBOIROUX Marie	HEMATOLOGIE TRANSFUSION
BAUDOUIN Maxime	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
BEAUJOUAN Florent	CHIRURGIE UROLOGIQUE
BERENGER Adeline	PEDIATRIE

BLANCHET Aloïse	MEDECINE D'URGENCE
BONILLA Anthony	PSYCHIATRIE
BOUTALEB Amine Mamoun	CARDIOLOGIE
BURGUIERE Loïc	SOINS PALLIATIFS
CAILLARD Pauline	NEPHROLOGIE
CATANASE Alexandre	PEDOPSYCHIATRIE
CHASTAINGT Lucie	MEDECINE VASCULAIRE
CHROSCIANY Sacha	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
COLLIN Rémi	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
COUMES-SALOMON Camille	PNEUMOLOGIE ALLERGOLOGIE
DELPY Teddy	NEUROLOGIE
DU FAYET DE LA TOUR Anaïs	MEDECINE LEGALE
FESTOU Benjamin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
FRACHET Simon	NEUROLOGIE
GADON Emma	RHUMATOLOGIE
GEROME Raphaël	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
GOURGUE Maxime	CHIRURGIE
LADRAT Céline	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
LAPLACE Benjamin	PSYCHIATRIE
LEMACON Camille	RHUMATOLOGIE
LOPEZ Jean-Guillaume	MEDECINE INTERNE
MACIA Antoine	CARDIOLOGIE
MEYNARD Alexandre	NEUROCHIRURGIE
MOI BERTOLO Emilie	DERMATOLOGIE
NASSER Yara	ENDOCRINOLOGIE
PAGES Esther	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE

PARREAU Simon	MEDECINE INTERNE
ROCHER Maxime	OPHTALMOLOGIE
TALLIER Maïa	GERIATRIE
TRAN Gia Van	NEUROCHIRURGIE
VERNIER Thibault	NUTRITION

Chefs de Clinique – Médecine Générale

HERAULT Kévin

CITERNE Julien

VANDOOREN Maïté

Praticiens Hospitaliers Universitaires

DARBAS Tiffany	ONCOLOGIE MEDICALE
HARDY Jérémie	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
LAFON Thomas	MEDECINE D'URGENCE

A ma maman, mon papa, mon frère et ma sœur,
sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.
« *Dans la vie de famille, l'amour est l'huile qui soulage les frictions, le ciment qui rapproche
les cœurs et la musique qui apporte l'harmonie.* » – Friedrich Nietzsche.

A mon copain et à notre futur ensemble.

A la mémoire de mon papi, parti trop tôt.

Remerciements

Remerciements aux membres du jury :

A **Madame le Professeur Catherine YARDIN**, je vous remercie de présider le jury de ma thèse. Merci également pour votre gentillesse durant ses années passées dans votre service. Soyez certaine de mon respect.

A **Madame le Docteur Françoise ESCLAIRE**, merci infiniment pour ton soutien sans faille depuis que je suis interne à Limoges, pour ton aide avisée à de multiples reprises (que ce soit pour ma thèse ou pour d'autres choses), pour ton oreille attentive à mes tracas, et pour ta capacité à me remonter le moral dans les bas (et à maintenir le moral dans les hauts, c'est aussi important). Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et te remercie d'avoir acceptée d'être dans le jury de ma thèse.

A **Madame le Professeur Sylvie ODENT**, je vous remercie du fond du cœur d'avoir accepté de m'encadrer durant ma thèse, c'est un honneur pour moi de travailler avec vous sur ce sujet qu'est l'HPE et de vous avoir comme directrice de thèse. Merci pour votre présence tout au long de l'élaboration de ma thèse et de mes stages à Rennes, pour m'avoir donné l'opportunité de faire mes preuves et mes armes, pour votre soutien constant et votre bienveillance. Je vous en suis infiniment reconnaissante.

A **Madame le Docteur Christèle DUBOURG**, je te remercie sincèrement de ton soutien et de ton aide durant mon stage en biologie moléculaire et lors de l'écriture de ma thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour l'écriture de cet article sur l'HPE et d'avoir apporté ton expertise, d'avoir pris le temps de me corriger et de m'apprendre de nombreuses choses. Merci également de ta gentillesse authentique, des très bons moments que j'ai passé en ta compagnie (notamment avec nos discussions sur le stade rennais et nos baignades à la fraîche), et des nouvelles que tu me donnais régulièrement de Bretagne. Je suis très honorée que tu aies accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A **Madame le Docteur Lyse RUAUD**, merci de ton encadrement, de ta disponibilité, et de ta bonne humeur durant mon stage en génétique clinique à Limoges. Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Remerciements au service de génétique de Limoges :

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du service de génétique de Limoges, les médecins, Marion, les techniciens et les secrétaires, pour leur gentillesse et leur disponibilité durant l'ensemble de mes stages, notamment :

Sandrine, merci pour ton soutien et ta bonne humeur, j'ai beaucoup apprécié nos discussions à refaire le monde autour d'un verre ;

Alexandre, le meilleur des co-internes/assistants, merci infiniment pour ton soutien inébranlable, surtout lors de nos soirées studieuses, pour ta pédagogie, ton aide et tes conseils précieux (que ce soit pour ma thèse mais également pour ma pratique future), je te suis reconnaissante de ta disponibilité et de ta gentillesse, tu es un modèle de résilience et d'altruisme.

Remerciements au service de génétique de Rennes :

Je remercie les membres du service de génétique de Rennes, les médecins, les conseillères en génétique, les infirmières, Amandine, Emmanuelle, Elisabeth, et les secrétaires, pour leur accueil, merci de m'avoir intégré aussi spontanément dans votre équipe et de m'avoir fait encore plus aimer la génétique.

Paul, merci de m'avoir appris tant de choses, pour ton aide et tes conseils avisés, de m'avoir transmis ta passion de la génétique mais également ta rigueur, d'avoir fait preuve de patience et de bienveillance à mon égard, tu as contribué au médecin que je suis devenue ;

Alinoé, merci de ta gentillesse et de ton soutien, merci également de m'avoir proposé ce sujet de thèse qui est passionnant.

Merci à mes **co-internes** pour tous les bons moments que nous avons partagé, qu'ils soient studieux ou non.

Remerciements au laboratoire de Génétique Moléculaire et Génomique de Rennes :

Je remercie les membres du laboratoire de Génétique Moléculaire de Rennes, les médecins, les techniciens, les bio-informaticiens, et les secrétaires, pour leur accueil et pour m'avoir donné goût à la biologie moléculaire.

Houda, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien, ta bienveillance et ta bonne humeur, j'ai appris beaucoup de choses à tes côtés ;

Marie F, merci pour ta gentillesse et pour tes nombreux enseignements durant mon stage, les ACPA et les exomes n'ont presque plus de secrets pour moi ;

Marie B, merci beaucoup pour ta bienveillance et ta jovialité, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi.

Remerciements à ma famille :

Il est difficile pour moi de savoir par où commencer. Ou plutôt comment car je sais à qui dédier mes remerciements les plus profonds et les plus sincères.

Papa et Maman, je n'aurai jamais assez de mots pour vous exprimer mon amour et ma fierté envers vous, pour vous remercier de votre éducation, de tout ce que vous m'avez inculqué. Vous avez fait ce que je suis aujourd'hui, je ne serai jamais arrivée là où j'en suis sans vous. Ce n'est pas moi qui ai fait médecine mais c'est Nous. Car, sans votre soutien inébranlable durant toutes ses années, aucune de ces lignes n'aurait vu le jour. Sans vous, jamais je n'aurai eu la force de me relever à chaque échec, de développer une détermination sans faille. C'est vous qui m'avez soutenu dans les moments les plus difficiles, afin que je ne baisse pas les bras. Mais c'est aussi avec vous que j'ai vécu les plus beaux moments, la réussite de la PACES, et maintenant la consécration avec cette thèse, notre thèse. Je vous aime infiniment. Merci Papa pour m'avoir poussé dans mes retranchements, pour m'avoir fait prendre conscience qu'on n'avait rien sans rien et que la détermination payait toujours. Merci de m'avoir emmené à la faculté de médecine de nombreuses fois en première année, même si tu te demandais parfois ce que je faisais là au milieu de toutes ces personnes. Merci à toi Maman pour ta douceur, tes encouragements réconfortants, ton amour inconditionnel. Merci de m'avoir emmené à mes concours de premières années, d'avoir enduré avec moi toute la

pression de ces études difficiles, de m'avoir toujours supporté même quand je me plaignais. Désolé de t'avoir donné des cheveux blancs. Je vous remercie du fond du cœur d'avoir toujours été là pour moi, même encore aujourd'hui avec les tracasseries que cette thèse a pu engendrer. Vous m'avez apporté la plus importante des choses : votre amour et le bonheur d'une famille unie.

Merci à mon frère, **Pierre**, pour toutes les aventures que nous avons vécues ensemble, merci de me supporter à chaque épreuve alors que je sais à quel point je peux être pénible, merci pour ta gentillesse incroyable qui ne justifie pas tout ce que j'ai pu te faire vivre (notamment ce concert de kpop de 2016, on s'en souvient toujours). Tu es sans aucun doute la personne la plus sage, la plus intelligente et la plus bienveillante que je connaisse. Je suis fière de t'avoir comme frère et je t'aime de tout mon cœur.

Merci à ma sœur, **Angèle**, pour m'accompagner dans toutes mes folies en dépit de son jeune âge, merci d'avoir toujours été là pour me soutenir. Je sais que je suis parfois dure avec toi mais tu ne m'en tiens jamais rigueur. Tu as le cœur sur la main. Je suis très fière de la jeune fille que tu es devenue et de t'avoir comme sœur. Je suis persuadée que tu feras de grandes choses dans ta vie. Je t'aime infiniment.

Papi, je sais qu'il est un peu tard pour te remercier, mais je suis sûre que tu aurais été très heureux et ému de lire ces quelques lignes et peut-être que tu vois tout ça de là où tu es. Tu as toujours été présent, depuis mes premiers babilllements jusqu'à l'ébauche de ma thèse. Tu m'as toujours soutenue ardemment, tu as toujours cru en moi, en me présentant au moindre de tes amis avec fierté. J'aurai tant aimé que tu sois là pour cette consécration que nous aurions pu fêter ensemble. Le plus important, c'est que tu ne souffres plus. Tu m'as apporté tellement et à contribuer à la personne que je suis devenue aujourd'hui. Merci pour tout, je t'aime pour toujours.

Alex, le meilleur des copains, merci de me supporter à toute heure du jour et de la nuit, d'être toujours à mon écoute même si je suis un Ralopteraptor. Merci de m'apaiser dans les moments de colères, de me soutenir dans les moments de doutes, de m'aimer tout simplement. Je suis la plus chanceuse de t'avoir dans ma vie. Je nous souhaite de vivre encore plein de beaux moments ensemble, j'ai hâte de découvrir notre futur et d'avancer à tes côtés. Je t'aime.

Minho, mon petit chat d'amour, merci de m'avoir aidé à combattre la solitude lors de mes années d'externat, de m'avoir honoré de ton amour et de tes câlins mais aussi de ton mauvais caractère qui nous fait beaucoup rire avec ton papa d'adoption, d'être là et de rendre mon quotidien plus doux. Tu es le plus mignon des chats (en tout objectivité).

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

ACMG : American College of Medical Genetics
ADN (DNA en anglais) : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN circulaire
BMP : Bone Morphogenetic Protein
CGH : Comparative Genomic Hybridization
CMV : Cytomégalovirus
DISP1 : *Dispatched-1*
DLL1 : *Delta Like canonical notch Ligand 1*
EvC : Ellis Van Creveld
FGF : Fibroblast Growth Factor
GH : Growth Hormone
GLI-A : GLI activée
GLI-FL : Full Length GLI
GLI-R : GLI réprimée
HHAT : Hedgehog acyltransferase
HH domain : Hedgehog amino-terminal signalling domain
Hint : Hedgehog intein
HPE : Holoprosencéphalie
HPO : Human Phenotype Ontology
hSHH-N : domaine N-terminal Hedge
hSHH-C : domaine C-terminal Hog
IRM (MRI en anglais) : Imagerie par Résonance Magnétique
KIF7 : Kinésine 7
MBOAT : O-acyltransférase liée à la membrane
MIH : Middle Interhemispheric Variants
MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MNX1 : *Motor Neuron and pancreas homeobox 1*
NGS : Next-Generation Sequencing
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
PFMG : Plan France Médecine Génomique
PKA : Protéine Kinase A
PTCH : Patched

RNAseq : séquençage de l'ARN

SCRIB : *Scribble planar cell polarity protein*

SCUBE2 : Signal Peptide, CUB Domain And EGF Like Domain Containing 2

SHH : *Sonic HedgeHoc*

SIX3 : *SIX homeobox 3*

SMMI : Incisive Médiane Maxillaire Unique (Single Maxillary Median Incisor)

SNC : Système Nerveux Central

SMO : Smoothened

SNV : Single Nucleotide Variant

SRR : Région de Reconnaissance des Stéroïdes

SUFU : Suppresseur de Fusion

VUS : Variant of Uncertain Significance

WES : Whole Exome Sequencing

WGS : Whole Genome Sequencing

ZIC2 : *Zic Family Member 2*

Table des matières

I. Introduction	22
I.1. Qu'est-ce-que l'holoprosencéphalie ?	22
I.1.1. Phénotype clinique de cette maladie	22
I.1.2. Chromosomes et gènes impliqués dans l'HPE, concept d'oligogénisme	23
I.1.3. Syndromes associées..	24
I.1.4. Contexte de la maladie	24
I.2. Gène <i>SHH</i> (<i>Sonic Hedgehog</i>) et protéine SHH	25
I.2.1. Généralités.....	25
I.2.2. Voie de signalisation SHH.....	25
I.2.3. Maturation de la protéine SHH.....	27
I.2.4. Pathologies associées au gène <i>SHH</i>	28
I.3. Physiopathologie de l'HPE	29
I.3.1. Anomalie du développement embryologique du Système Nerveux Central (SNC).....	29
I.3.2. Dérégulation des voies de signalisation, dont la voie SHH.....	30
I.4. Description de l'étude et de ces objectifs	31
II. Article : Description of cohort of holoprosencephaly cases with variants in the <i>SHH</i> gene: focus on microforms	32
II.1. Abstract	33
II.2. Introduction	34
II.3. Patients and methods	35
II.3.1. Cytogenetic and molecular analyses.....	35
II.3.2. Clinical data.....	36
II.3.1. Statistical analysis.....	36
II.4. Results.....	36
II.4.1. Cohort characteristics.....	36
II.4.2 Description of phenotypes of HPE microforms, comparison with other forms of HPE.....	38
II.4.3. Genotype-phenotype analysis.....	41
II.4.4. Comparison of phenotype severity between patients with a single hit in <i>SHH</i> and patients with one hit in <i>SHH</i> and other genetic events, family with oligogenism.....	44
II.5. Discussion	45
II.6. Conclusion	48
II.7. Acknowledgments.....	48
II.8. Supplementary data.....	48
III. Conclusion et perspectives.....	51
III.1. Hypothèses de corrélations génotype-phénotype.....	51
III.2. Etudes fonctionnelles du gène <i>SHH</i>	52
III.3. Biais de l'étude : évolution des techniques de biologie moléculaire.....	53
Références bibliographiques	56
Serment d'Hippocrate.....	63

Table des illustrations

<u>Figure 1</u> : Principaux types d'HPE, IRM avec anomalies cérébro-faciales associées, et sévérité clinique de l'HPE	23
<u>Figure 2</u> : Transcrit canonique du gène <i>SHH</i> ENST00000297261.7.....	25
<u>Figure 3</u> : Voie de signalisation SHH.	26
<u>Figure 4</u> : Etapes de maturation de la protéine SHH.....	28
<u>Figure 5</u> : Développement embryologique physiologique du SNC en vésicules.....	29
<u>Figure 6</u> : Modélisation dorso-ventrale du cerveau antérieur et physiopathologie de l'HPE.	30
<u>Figure 7</u> : Distribution of different forms of HPE.....	37
<u>Figure 8</u> : Distribution of the different possible results of genetic analyzes..	37
<u>Figure 9</u> : Comparisons of abnormal brain morphology (other than HPE) and adrenal involvement between microforms and lobar, semilobar and lobar forms of HPE.	39
<u>Figure 10</u> : Comparisons of cleft, ears, orbital, nasal, dental and nasal cavity malformation between microforms and lobar, semilobar and lobar forms of HPE.....	40
<u>Figure 11</u> : Mutational landscape of <i>SHH</i> gene according to the form of HPE (asymptomatic carriers, microforms, lobar forms, semilobar forms and alobar forms)..	42
<u>Figure 12</u> : Family tree with segregation of variants and clinical phenotype.....	45
<u>Figure 13</u> : Venn diagram representing the different genetic tests carried out our patient.....	48
<u>Figure 14</u> : Isoformes de <i>SHH</i>	51
<u>Figure 15</u> : Profil de tolérance à la substitution de <i>SHH</i>	52
<u>Figure 16</u> : Evolution des techniques et des taux diagnostiques au cours du temps.....	53

Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Comparison of extracraniofacial features between microforms and other forms of HPE.....	38
<u>Tableau 2</u> : Comparison of craniofacial damage between microforms and other forms of HPE	39
<u>Tableau 3</u> : Families with the same mutation and associated HPE type.	43
<u>Tableau 4</u> : Severity of HPE according to the number of variants found in patients	44
<u>Tableau 5</u> : The different extracraniofacial clinical signs depending on the organs affected .	49

I. Introduction

I.1. Qu'est-ce-que l'holoprosencéphalie ?

I.1.1. Phénotype clinique de cette maladie

L'holoprosencéphalie (HPE, OMIM #236100) est une maladie génétique congénitale caractérisée par un défaut de clivage des hémisphères cérébraux aboutissant à des anomalies cérébrales et crâniofaciales, qui surviennent très tôt lors du développement embryonnaire du cerveau. C'est une maladie rare, c'est-à-dire qu'il existe moins de 1/2000 personnes qui est atteinte en population générale. En effet, la prévalence de naissances vivantes s'élève à 1/8000 à 1/16000 naissances. Toutefois, le nombre de grossesses avec fœtus atteints d'HPE est beaucoup plus important, de l'ordre de 1 grossesse sur 250¹. Cette différence de prévalence s'explique par l'interruption d'un nombre important de grossesses, spontanément de part la gravité de l'atteinte cérébrale, ou volontairement dans le cadre d'une interruption médicale de grossesse devant le pronostic péjoratif de cette maladie (à mettre en perspective des malformations cérébrales retrouvées chez le fœtus)².

Le spectre phénotypique est large³, pouvant aller de l'hypotélisme isolé jusqu'à la cyclopie. Cette pathologie cérébrale est très souvent sévère entraînant le décès de l'enfant, et les formes moins sévères peuvent conduire à des déficiences intellectuelles⁴. Ainsi, différentes formes d'HPE existent, selon l'atteinte cérébrale. La forme alobaire est la plus sévère : elle résulte de l'absence complète de séparation hémisphérique conduisant à un ventricule large unique avec lobes frontaux fusionnés, thalami fusionnés et ganglions basaux fusionnés. La forme semilobaire est une forme intermédiaire : le clivage interhémisphérique est partiel, avec séparation partielle en régions postérieures alors que les régions antérieures sont fusionnées. La forme lobaire est moins sévère : la séparation hémisphérique est presque complète sauf pour les lobes frontaux et la partie la plus antérieure du cerveau. Dans les microformes, il n'y a pas de défaut de clivage interhémisphérique. L'incisive médiane maxillaire unique (SMMI) et l'hypotélisme isolé font partie de ces microformes, définies par des atteintes crâniofaciales sans atteinte cérébrale (Figure 1)⁵. L'ensemble des formes d'HPE est à l'origine d'un continuum phénotypique, allant donc de phénotypes très sévères associant cyclopie, proboscis (absence de développement du nez au profil d'une structure tubaire) et fente labiopalatine médiane ou bilatérale, à des phénotypes paucisymptomatiques à type de microformes. En dehors des atteintes cérébrales nécessaires à la classification de la forme d'HPE du patient, il existe également des signes cliniques crâniofaciaux tels que la microcéphalie, l'hypotélisme, les fentes labiopalatines, une hypoplasie du nez voire une narine unique dans les formes sévères (pouvant aller jusqu'au proboscis). Des comorbidités peuvent se surajouter au phénotype clinique des patients, notamment un retard neurodéveloppemental, un retard de croissance staturo-pondérale, des troubles endocriniens (diabète insipide), des malformations dentaires (incisive médiane unique) et des anomalies ophtalmologiques (colobome).

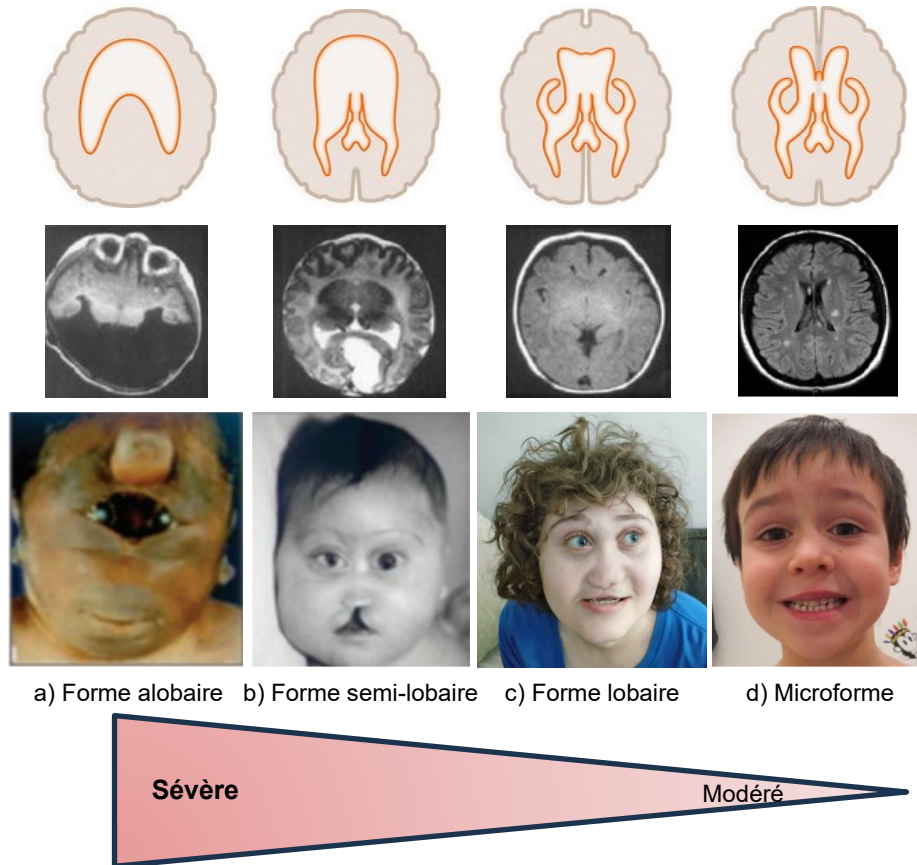


Figure 1 : Principaux types d'HPE, IRM avec anomalies cérébro-faciales associées et sévérité clinique de l'HPE⁴ :

- a) Synophtalmie (2 yeux fusionnés dans une orbite) et proboscis (appendice médian pseudonasal sus oculaire) ;
- b) Hypotélorisme sévère, racine nasale plate, colobome bilatéral, et fente labiopalatine médiane ;
- c) Hypotélorisme, racine du nez plate et narines rapprochées, fente labiale ;
- d) Hypotélorisme, racine nasale pointue, incisive centrale maxillaire unique.

I.1.2. Chromosomes et gènes impliqués dans l'HPE, concept d'oligogénisme

L'HPE est une pathologie qui présente une hétérogénéité moléculaire importante. Elle peut être secondaire à une anomalie chromosomique : trisomie 13 notamment, mais également trisomie 18 et triploïdie⁶. Par ailleurs, les causes non chromosomiques sont nombreuses. Il existe 4 gènes principaux : *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* et *TGIF1*, dans lesquels on retrouve le plus fréquemment des SNVs (Single Nucleotide Variant) associés à l'HPE. De nombreux autres gènes peuvent également aboutir au développement d'une HPE, mais de façon moins fréquente : *FGF8*, *DISP1*, *GLI2*, *FOXH1*, *PTCH*, *TDGF1*, *GAS*, *CDON*, *NODAL*, *DLL1*, et *STIL*. L'ensemble de ces gènes interviennent dans les voies de signalisation de SHH et de FGF, impactant ainsi le développement du neur ectoderme et, de fait, le développement précoce du cerveau⁷.

D'autre part, son mode de transmission est complexe. La variabilité phénotypique importante et l'expressivité variable ont contribué à mettre en évidence la nécessité de survenue de plusieurs événements génétiques afin de développer une HPE. Ce phénomène se nomme l'oligogénisme⁸. L'HPE n'est donc pas une maladie mendélienne avec une

transmission autosomique dominante ou récessive stricte. Des patients peuvent être paucisymptomatiques s'ils ne présentent qu'un seul variant dans un gène, et avoir des apparentés atteints d'HPE sévère si un autre variant est apparu dans un autre gène, pouvant expliquer cette variabilité phénotypique et l'expressivité variable de certains variants. Ceci s'illustre avec la faible pénétrance de *SHH*, *SIX3* et *TGIF1* notamment, dont le SNV est hérité d'un parent pauci voire asymptomatique dans 70% des cas (contre 30% pour *ZIC2* car sa pénétrance est beaucoup plus importante, donc moins de patients avec ces SNVs sont peu symptomatiques)^{9,10}.

I.1.3. Syndromes associés

L'HPE peut être associée, dans 25% des cas, à d'autres syndromes malformatifs⁶ :

- syndrome de Smith-Lemli-Opitz, associant syndactylie 2-3, retard neurodéveloppemental, malformations des organes génitaux externes, et possible malformations cérébrales à type d'HPE, causé par des variants dans *DHCR7*,
- syndrome de Hartsfield, manifestation combinée d'HPE et d'ectrodactylie, avec ou sans fente labiopalatine, causé par des variants dans *FGFR1*,
- syndrome CHARGE, associant colobome, malformations cardiaques, atrésie choanale, retard de croissance, hypoplasie génitale et anomalies des oreilles avec possible surdité, causé par des variants dans *CHD7*,
- syndrome de Pallister Hall, comprenant hamartome hypothalamique, dysfonctionnement hypophysaire, épiglote bifide et polydactylie, causé par des variants dans *GLI3*,
- syndrome de Rubinstein-Taybi, associant retard de croissance et de développement, hypertrophie des pouces et gros orteils, déficience intellectuelle, malformations des yeux et du cœur, anomalies du système digestif, causé par des variants dans *CREBBP*,
- syndrome velo-cardio-facial, comprenant cardiopathie, hypoparathyroïdie, hypocalcémie, et hypoplasie du thymus, causé par des variants dans *TBX1*.

I.1.4. Contexte de la maladie

Actuellement, seulement 30% des patients ont un diagnostic moléculaire, 70% des patients atteints d'HPE n'ont donc pas de diagnostic étiologique^{10,11}. Ce faible rendement s'explique par la difficulté d'interprétation des variants retrouvés dans les gènes. En effet, de nombreux variants sont classés en VUS (variants génétiques de signification inconnue pour lesquels le lien de causalité avec la pathologie n'est pas établi) car l'HPE est une maladie qui présente une importante variabilité phénotypique inter et intrafamiliale, ainsi qu'une expressivité très variable, rendant complexe la classification des variants retrouvés. Une des explications qui peut être apportée à cette différence d'expression phénotypique repose sur l'oligogénisme. Ce mécanisme de transmission complexe, retrouvé dans l'HPE, consiste en l'accumulation de variants de faible pénétrance dans plusieurs gènes : si un seul variant est présent, la maladie ne se développe pas ou de façon moins sévère, il faut donc transmettre l'ensemble des variants pour avoir le phénotype complet de la maladie^{11,12}.

Par ailleurs, il existe des causes environnementales pouvant aboutir au développement de l'HPE, notamment le diabète gestationnel insulino-requérant (1% de risque d'HPE)¹³,

l'alcoolisme associée au tabagisme maternel¹⁴, l'exposition prénatale à des médicaments tels que l'acide rétinoïque et les inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol, et certaines infections materno-fœtales (CMV, toxoplasmose, rubéole)⁶.

I.2. Gène *SHH* (*Sonic Hedgehog*) et protéine SHH

I.2.1. Généralités

Le gène *SHH* est un homologue du gène hedgehog de la drosophile. Il appartient ainsi à la famille des gènes de signalisation hedgehog. C'est un gène qui est très conservé au cours de l'évolution des vertébrés. Il se situe sur le bras long du chromosome 7, en 7q36.33. Il est exprimé dans la notochorde notamment et va être à l'origine de la sécrétion de la protéine SHH qui régule la dorsoventralisation du cerveau antérieur. Il est également exprimé dans les bourgeons des membres afin de réguler leur croissance par le biais d'une boucle de rétroaction positive¹⁵.

Le transcrit principal canonique de *SHH* est ENST00000297261.7 (NM_000193.4). Il se compose de 3 exons, comportant 462 acides aminés et 4 650 paires de base (Figure 2).

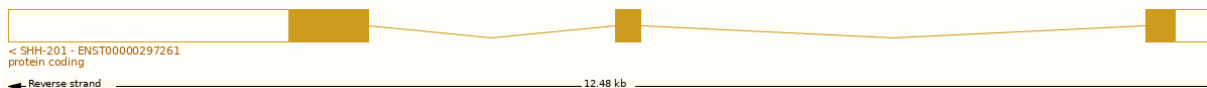


Figure 2 : Transcrit canonique du gène *SHH* ENST00000297261.7.

Source : Ensembl.

Le poids moléculaire de la protéine SHH est de 49 607 Da. Elle possède 2 domaines fonctionnels : le domaine N-terminal Hedge (hSHH-N) de 19 kDa et le domaine C-terminal Hog (hSHH-C) de 25 kDa composé du repli Hint (Hedgehog intein) et de la région de reconnaissance des stéroïdes (SRR)³. Ces domaines vont contribuer à la modification de la conformation de la protéine SHH afin d'obtenir le ligand mature qui sera reconnu par son récepteur dans la voie de signalisation SHH (Figures 3A et 4).

I.2.2. Voie de signalisation SHH

Le gène *SHH* est exprimé dans la corde et le plancher du tube neural, puis au sein du télencéphale ventral ; il code pour une protéine de signalisation sécrétée, SHH. Elle est initialement synthétisée sous la forme d'un précurseur de 45 kDa, qui subit ensuite des modifications moléculaires dans le réticulum endoplasmique¹⁶. Après élimination du peptide signal, SHH est clivé en deux peptides : SHH-N qui est à l'origine du ligand mature car il possède l'activité de signalisation, et SHH-C qui est responsable du traitement et de la maturation de la protéine¹¹.

La voie de signalisation SHH repose sur les interactions au niveau des cils primaires entre le ligand SHH mature et son récepteur transmembranaire principal PTCH (Patched). Le cil primaire est une extension du cytoplasme retrouvée à la surface de nombreuses cellules, dont les progéniteurs des neurones. Il agit comme une antenne car il possède de nombreux récepteurs qui interagissent avec l'environnement extracellulaire et permet, ainsi, la

transduction du signal. Les acteurs principaux de la voie de signalisation SHH (Smo, PTCH et GLI) sont situés dans cette entité¹⁷. PTCH est une protéine possédant 12 domaines transmembranaires qui va ensuite interagir avec la protéine transmembranaire à 7 hélices SMO (Smoothened). Cette protéine appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et interagit elle-même avec les protéines SUFU (suppresseur de fusion) et PKA (protéine kinase A), qui influencent à leur tour les facteurs de transcription GLI (figure 3B)¹⁸.

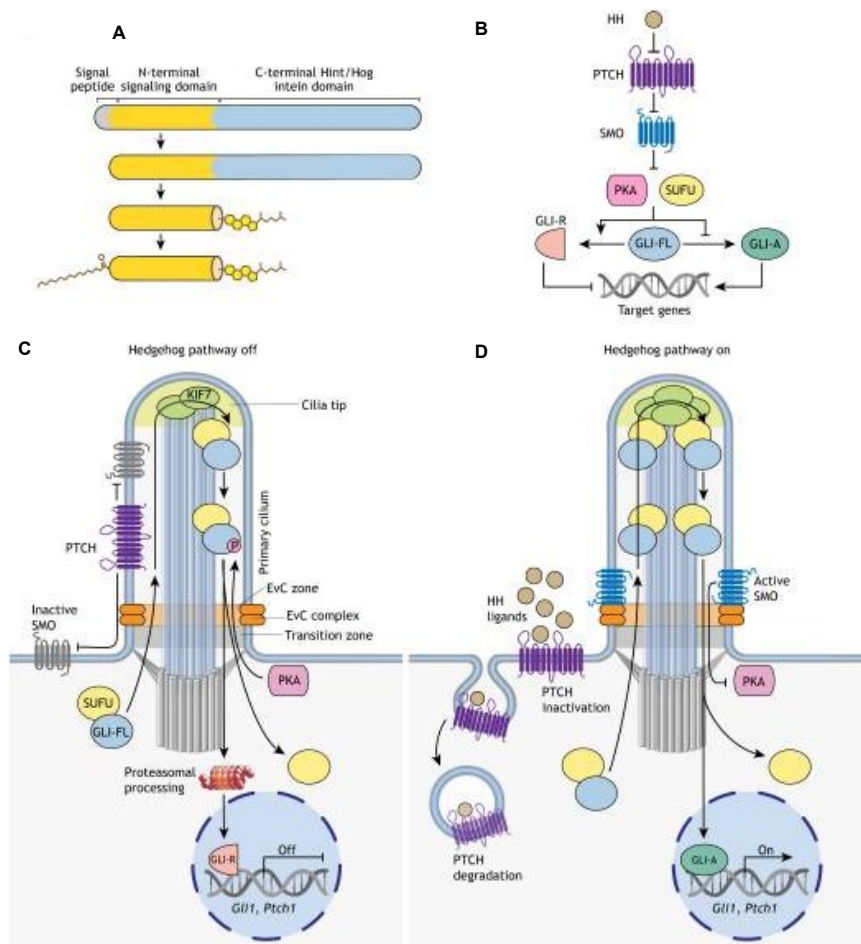


Figure 3 : Voie de signalisation SHH¹⁸ :

A) Etapes de maturation de la protéine SHH.

B) Les différents acteurs de la voie de signalisation SHH.

C) Cascade de signalisation sans le ligand SHH, activité transcriptionnelle de Gli1 et Ptch1 réprimée par les protéines GLI.

D) Activation de la cascade de signalisation par le ligand SHH, transcription de Gli1 et Ptch1 activée par les protéines GLI.

Lorsque les ligands SHH ne sont pas présents, PTCH est enrichi dans les cils primaires. Il inhibe SMO, permettant à SUFU d'agir directement sur les protéines GLI (possédant la totalité de leur longueur, GLI-FL) et à PKA de les phosphoryler, induisant leur protéolyse. Les protéines GLI pénètrent dans le noyau avec leur nouvelle conformation (GLI-R). Leur activité transcriptionnelle est alors réprimée, les gènes cibles Gli1 et Ptch1 ne sont pas transcrits (Figure 3C)¹⁸.

La présence des ligands SHH induit une inhibition de PTCH et son élimination des cils primaires. SMO est alors activé et s'accumule dans les cils. Il s'associe avec le complexe Ellis Van Creveld (EvC) au niveau de la base des cils, ce qui lui permet de se structurer correctement afin de transmettre le signal SHH à travers la membrane et d'inhiber les protéines PKA et SUFU. Ainsi, PKA ne peut plus phosphoryler les GLI-FL et SUFU se dissocie de ces protéines. Les GLI-FL ne sont pas convertis en GLI-R car ils ne sont pas protéolysés ici mais deviennent des GLI-A : leur présence dans le noyau permet la transcription des gènes cibles. La kinésine KIF7 régule par ailleurs les protéines GLI au niveau de l'extrémité des cils (Figure 3D)¹⁸.

La voie de signalisation SHH repose donc sur des interactions inhibitrices tout au long de la cascade de signalisation, mais également sur des boucles de rétrocontrôle négatif. En effet, les ligands SHH inactivent PTCH, permettant à SMO de s'exprimer. Cette activation de SMO entraîne une augmentation de la production de PTCH, induisant une inhibition réactionnelle de SMO et une diminution de ligand SHH.

D'autre part, la protéine transmembranaire DISP1 (Dispatched-1) va également lier SHH au niveau de son fragment cholestérol. Elle possède 12 domaines transmembranaires, comme PTCH. Cette liaison permet de mobiliser SHH à travers la membrane puis de le transférer à la protéine chaperonne SCUBE2 afin de le libérer en extracellulaire. Ainsi, DISP1 est à l'origine de la signalisation longue portée de la voie SHH. Elle induit un blocage de la protéine SHH dans son site de synthèse lorsqu'elle est défectueuse¹⁹.

I.2.3. Maturation de la protéine SHH

La protéine SHH ne peut être utilisée dans la voie de signalisation SHH telle qu'elle est synthétisée. Elle doit subir des modifications afin d'obtenir le morphogène SHH-N mature. Ainsi, la protéine initialement synthétisée subit un clivage auto-catalysé qui se produit via le transfert intramoléculaire de N-acyle vers S-acyle (entre G197 et C198), transfert permis par le repli Hint²⁰.

Ce réarrangement génère un thioester G197-C198 (Figure 4A(i)) dans SHH (apo). Le cholestérol se lie alors de manière non covalente au domaine Hog de SHH (complex, Figure 4A(ii)), puis de manière covalente en interagissant avec le thioester G197-C198 (adduct, Figure 4A(iii)). La liaison SHH-cholestérol est permise par la région SRR. Cette interaction aboutit à la dissociation de la protéine en 2 unités (Figure 4A(iv)) : le morphogène SHH-N dont le dernier résidu du fragment N-terminal a été estérifié par le cholestérol, et le SHH-C²⁰. Par la suite, un fragment palmitoyl est ajouté à l'extrémité N-terminale de SHH-N par la HHAT (Hedgehog acyltransferase)¹⁸. Cette enzyme est une palmitoylacyltransférase appartenant à la famille de protéines transmembranaires multipasses MBOAT (O-acyltransférase liée à la membrane), protéines permettant le transfert d'acides gras et autres lipides sur des groupes hydroxyles de lipides membranaires²¹.

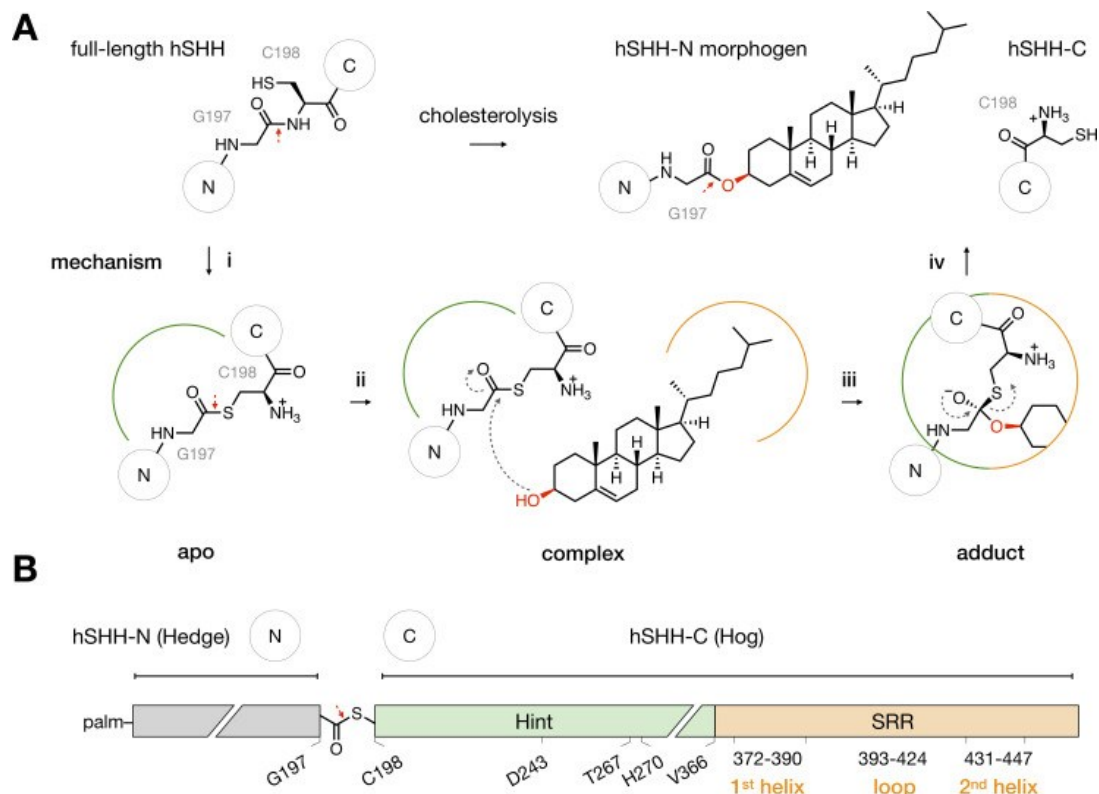


Figure 4 : Etapes de maturation de la protéine SHH²⁰ :

A) Mécanisme de cholestérololyse.

B) Domaines fonctionnels de SHH.

hSHH : protéine humaine SHH. Flèches rouges : liaison amide G197-C198 d'origine puis liaison thioester G197-C198. Palm : palmitoylation. Domaine Hedge en gris (B).

Domaine Hint en vert (A et B). Domaine SRR en orange (A et B).

La protéine SHH subit donc de nombreuses transformations afin d'obtenir le morphogène actif, constitué du domaine N-terminal Hedge (C24-G197), après ajout des motifs cholestérol et palmitoyl. Le domaine C-terminal Hog permet, quant à lui, l'ajout du motif cholestérol essentiel à l'obtention du ligand SHH mature. Il est composé du repli Hint (C198-1365) et du SRR (V366-S462) (Figure 4B).

I.2.4. Pathologies associées au gène *SHH*

Le Gène *SHH* OMIM#600725 est associé à 4 pathologies :

- holoprosencéphalie OMIM #142945,
- microphthalmie avec colobome OMIM #611638,
- schizencéphalie OMIM #269160, malformation cérébrale se manifestant par une fente hémisphérique unilatérale ou bilatérale avec une connexion directe entre les espaces limbiques interne et externe, associée à une polymicrogyrie, résultant d'une altération de la migration neuronale ; cette pathologie peut également être retrouvée avec des variants dans *SIX3* et *EMX2*²²,
- incisive centrale maxillaire médiane unique (SMMI) OMIM #147250, appartenant au spectre des microformes d'holoprosencéphalie.

I.3. Physiopathologie de l'HPE

I.3.1. Anomalie du développement embryologique du Système Nerveux Central (SNC)

Le neur ectoderme est un tissu constitué de cellules dérivées de l'ectoderme, feuillet externe de l'embryon à l'origine de la formation de la peau, des muqueuses, des organes sensoriels et du système nerveux : il donne l'ensemble des structures constituant le système nerveux chez l'homme (du tronc cérébral à la moelle épinière)²³. C'est le premier tissu touché dans l'HPE.

Lors de ses différentes différenciations, le neur ectoderme répond à 2 axes : antéropostérieur et dorsoventral. C'est l'axe dorsoventral qui est perturbé dans l'HPE. Physiologiquement, à 4 semaines d'aménorrhée, le stade dit 5 vésicules succède au stade 3 vésicules, avec la segmentation du prosencéphale en diencephale et en 2 cavités télencéphaliques. 2 expansions antérolatérales apparaissent au niveau du prosencéphale : les 2 vésicules télencéphaliques ou hémisphères cérébraux primitifs. Le reste du prosencéphale devient le diencephale ou cerveau intermédiaire au niveau duquel naissent les vésicules optiques, l'épiphyse (au niveau du toit), le thalamus, l'hypothalamus et la post hypophyse (au niveau du plancher)²⁴ (Figure 5). Dans l'HPE, c'est une anomalie de la segmentation en 2 cavités télencéphaliques associée à un défaut de rotation dans l'axe antéropostérieur qui explique les anomalies cérébrales mais également crâniofaciales car cette anomalie de clivage est aussi à l'origine de la perturbation du développement du bourgeon fronto-nasal²⁵.

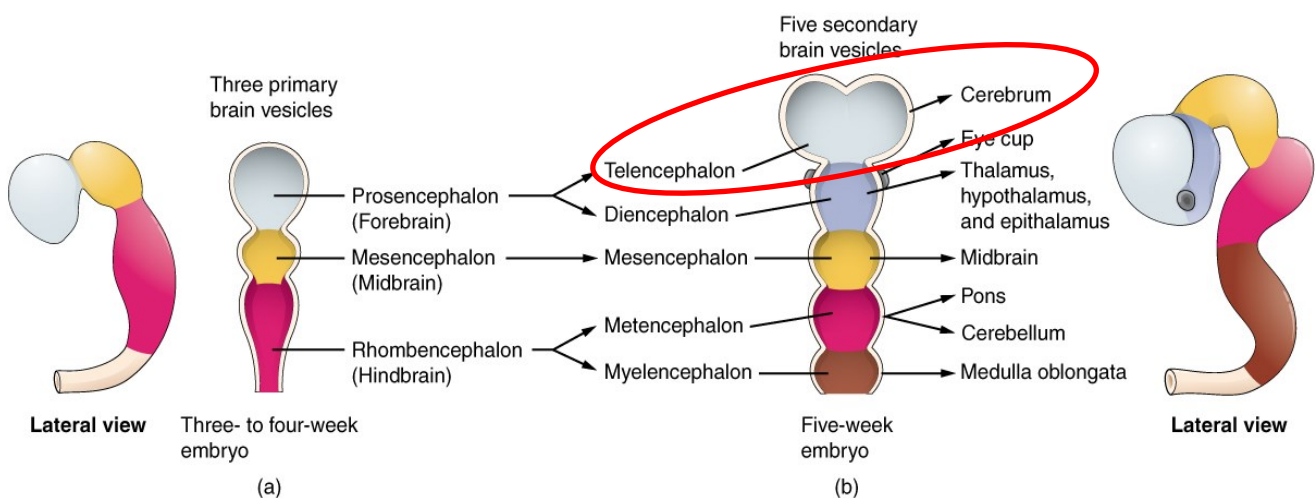


Figure 5 : Développement embryologique physiologique du SNC en vésicules :

- a) Stade 3 vésicules (vésicules primaire).
- b) Stade 5 vésicules (vésicules secondaires).

Ellipse rouge : vésicule secondaire dont l'anomalie de développement est à l'origine de l'HPE, le télencéphale.

Source : <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/14-1-embryonic-development/>

I.3.2. Dérégulation des voies de signalisation, dont la voie SHH

La voie de signalisation SHH joue un rôle crucial dans le développement du télencéphale. Produite dans la notochorde et la plaque préchordale, la protéine SHH est ensuite sécrétée au niveau de la ligne médiane ventrale du prosencéphale. Son caractère hydrophobe permet la mise en place de gradients de concentration au sein du neur ectoderme²⁶. Ainsi, la sécrétion de SHH régule la dorsoventralisation du cerveau antérieur

en permettant la ventralisation du cerveau embryonnaire d'une manière dépendante du morphogène²⁷ (Figure 6). Un morphogène est une molécule qui spécifie le devenir de différents types cellulaires ou différentes régions d'un organisme selon sa concentration. Ici, le gradient impliqué est celui de la protéine SHH. Les morphogènes jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire pour communiquer une information de position aux cellules et former des axes de polarité, ici l'axe dorsoventral du cerveau antérieur. D'autre part, plusieurs protéines morphogéniques osseuses des voies de signalisation BMP et WNT agissent comme des morphogènes dorsalisants, avec une sécrétion de ces protéines au niveau de la face dorsale du cerveau antérieur (Figure 6).

Par ailleurs, la voie de signalisation FGF est impliquée non pas dans la mise en place de l'axe dorsoventral mais plutôt dans la spécification de cet axe. Par ce fait, la signalisation FGF contribue à la séparation des hémisphères cérébraux antérieurs (Figure 6), avec notamment le récepteur FGFR1 et son ligand FGF8 qui sont exprimés au niveau de la ligne médiane antérieure^{7,28}.

Ainsi, les protéines SHH, WNT et BMP sont à l'origine de la mise en place d'un gradient dorsoventral contrôlant la bonne structuration du prosencéphale en télencéphale par le biais d'une expression spatio-temporelle précise, alors que les protéines FGFR1 et FGF8 contrôlent la séparation hémisphérique du cerveau antérieur.

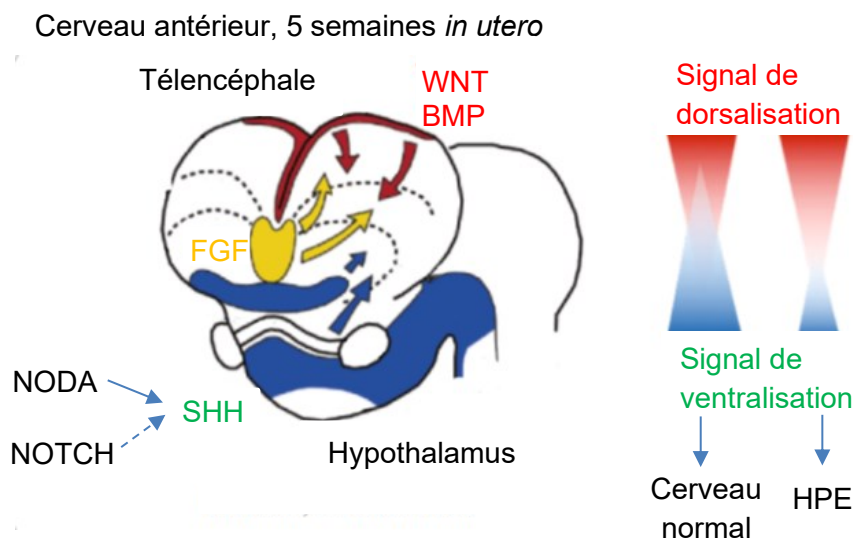


Figure 6 : Modélisation dorsoventrale du cerveau antérieur et physiopathologie de l'HPE³.
Les voies de signalisation SHH, WNT et BMP jouent un rôle crucial dans le développement du télencéphale à partir du prosencéphale.

L'inactivation partielle ou complète des membres de ces voies de signalisation provoquent diverses manifestations d'HPE chez des modèles animaux^{29,30,31} et chez l'Homme^{1,8,28} : des pertes de fonction du gène *SHH* et des travaux sur des embryons de souris *Shh*^{-/-} ont notamment démontré l'importance de ce morphogène pour l'expression de marqueurs du télencéphale ventral tels que *Dlx2*, *Gsh2* ou *Nkx2-1*^{25,32,33}.

I.4. Description de l'étude et de ces objectifs

De nombreux aspects de l'HPE sont encore méconnus, notamment en ce qui concerne les microformes, peu décrites dans la littérature^{34,35}. De même, *SHH* est le gène le plus fréquemment retrouvé dans l'HPE mais les variants associés à des phénotypes sévères sont indéterminés, peu de corrélations génotype-phénotype ont été publiées^{9,35,36}.

Cette étude se focalise donc d'une part sur la description des microformes d'HPE chez des patients porteurs d'altérations du gène *SHH*, avec notamment des comparaisons phénotypiques entre les patients atteints de microformes et les patients atteints de formes plus sévères d'HPE (lobaire, semilobaire et alobaire). D'autre part, une correspondance entre sévérité clinique et position génique des variants a été étudiée dans ce travail, afin de mettre en lumière de possibles corrélations génotype-phénotype. Le phénotype entre les patients porteurs seulement d'une altération dans *SHH* et les patients porteurs d'un autre événement génétique dans un autre gène a également été comparé afin de rechercher une différence de sévérité et d'expliquer les variabilités phénotypiques intrafamiliales. A ce titre, la description d'une fratrie avec oligogénisme a été réalisée, pouvant expliquer les différentes formes d'HPE diagnostiquées.

Une base de données européenne HPE a été créée en 1996 à Rennes. Elle agrège les données cliniques et biologiques des patients atteints d'HPE en Europe pour lesquels les hôpitaux demandent des avis. Actuellement, plus de 2000 patients figurent dans cette base. Seuls ceux présentant une altération génétique dans le gène *SHH* ont été retenus (recueil jusqu'à janvier 2024) : 77 cas index et 96 apparentés soit 173 patients au total. Concernant les différentes formes d'HPE, 82 patients étaient atteints d'une microforme, 9 d'une forme lobaire, 16 d'une forme semilobaire, 32 d'une forme alobaire, et 17 personnes étaient asymptomatiques. 17 patients pour lesquels il manquait des informations sur la présence ou le type d'HPE n'ont pas été inclus dans les statistiques. 158 patients présentaient un SNV, 11 une délétion emportant *SHH*, et 4 une duplication de *SHH*. 60 SNV de *SHH* différents ont été mis en évidence dans notre cohorte.

Ainsi, les objectifs de ce travail portent sur :

- la description des signes cliniques des microformes d'HPE au sein de cette cohorte européenne comparés à ceux des autres formes d'HPE,
- l'analyse génotype-phénotype des variants retrouvés dans la cohorte,
- la comparaison de la sévérité de l'HPE entre les patients porteurs d'un hit dans *SHH* isolé (155 patients) et les patients porteurs de hit dans d'autres gènes (18 patients) ainsi que l'illustration de l'oligogénisme dans l'HPE associé à *SHH*.

II. Article : Description of cohort of holoprosencephaly cases with variants in the *SHH* gene: focus on microforms

Ophélie BOUTFOL^{1,2}, Paul ROLLIER^{1,2}, Valérie DUPE³, Alinoé LAVILLAUREIX^{1,3}, Wilfrid CARRE², Christèle DUBOURG^{2,3}, Sylvie ODENT^{1,3}.

Affiliations :

¹Service de Génétique Clinique, Centre de Référence CLAD-Ouest, ERN ITHACA, CHU, Rennes, France

²Laboratoire de Génétique Moléculaire et Génomique, CHU, Rennes, France

³Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR6290, Rennes, France.

Keywords : Holoprosencephaly, *SHH*, microforms, organs malformations, craniofacial malformations, genotype, oligogenism.

II.1. Abstract

Background: Holoprosencephaly (HPE) is a congenital genetic disease characterized by a cleavage defect of the cerebral hemispheres leading to cerebral and craniofacial abnormalities, which occur very early during embryonic development of the brain. There are 5 types of HPE: alobar, semilobar, lobar, middle interhemispheric (MIH/syntelencephaly) and microform. The phenotypic spectrum is therefore very broad, ranging from cyclopia with intrauterine death to paucisymptomatic forms with midline defects such as isolated hypotelorism and/or single maxillary incisor. The *Sonic Hedgehog* gene (*SHH*) was the first gene to be identified in relation to HPE and it is also the one most commonly associated with genetic variants. This gene codes a morphogen that creates a concentration gradient along the neural tube to allow its ventralization.

Objectives: Describe, with a focus on the clinical signs related to HPE microforms, of a large cohort of individuals with pathogenic variant in *SHH*. Search for an association between microforms and position of variants. Compare families with only one genetic event found in *SHH* with families in which there are other genetic events in addition to that found in *SHH*.

Methods: This report presents a cohort of 77 probands with HPE and 96 relatives with a variant in the *SHH* gene. The data of these individuals were collected from the HPE database which lists patients suffering from HPE in Europe for which advice has been requested in Rennes. The database comiles clinical and genetic data. 60 different variants have been reported. HPO terms have been used to describe clinical phenotypes of patients.

Results: This article describes the characteristics of a cohort of 173 patients or relatives with a variant in the *SHH* gene. The vast majority of cases (47.4%) exhibited microformes of HPE, following by alobar forms (18.5%), semilobar forms (9.2%), lobar forms (5.2%), and without MIH/syntelencephaly. A significant percentage of people were asymptomatic (9.8%), all of them were relatives. Brain anomalies other than typical HPE were significantly more frequent in severe forms of HPE than in microforms ($p < 0.05$). The same is true for malformations of the orbits, nose, ears, the presence of clefts and adrenal abnormalities ($p < 0.02$). Conversely, dental malformations and nasal cavity abnormalities were significantly more frequent in microforms than in severe forms of HPE ($p < 0.01$). Moreover, one region included in the intermediate protein sequence appears to be devoid of pathogenic variants (between amino acids 275 and 330). Oligogenism partly explains the phenotypic variability for the same variant and the difficulties in finding genotype-phenotype correlations by looking only at variants in the *SHH* gene.

Conclusions: The description of microforms, compared to other forms of HPE, has highlighted the predominance of certain clinical signs in microforms but also new disorders not previously known in HPE. The study of genotypes has led to the discovery of a specific region of the *SHH* gene in which no variant has been reported in our cohort. It is linked to variants reported as benign, which is important to take into account in the interpretation of variants diagnosed in this area. The description of families with oligogenism underlines the complexity of genetic counseling in families with HPE and the importance of seeking genetic explanations for intra- and inter-familial variability.

II.2. Introduction

Holoprosencephaly (HPE, OMIM #236100) is a congenital genetic disease characterized by a cleavage defect of the cerebral hemispheres leading to cerebral and craniofacial anomalies, which occur very early during embryonic development of the brain, between the 18th and 28th day of gestation^{4,32}. Given a prevalence of 1/250 conceptuses, HPE is not extremely rare in pregnancies. However, the prevalence of live births is much lower, on the order of 1/8,000 to 1/16,000¹.

The clinical spectrum is broad and depends on the different types of HPE. Indeed, HPE is divided into 3 major brain disorders: alobar (complete absence of hemispheric separation), semilobar (partial inter-hemispheric splitting) and lobar (almost complete hemispheric separation apart from the forebrain). Additionally, there is a closely related entity but touching the midline connection of the cerebral hemispheres between the posterior frontal and parietal regions: middle interhemispheric variants (MIH) or syntelencephaly. HPE microforms represent patients with midline facial defect without cerebral hemispheric separation abnormalities: as single maxillary median incisor (SMMI #147250) and isolated hypotelorism^{6,25,34}. It is the study of familial forms of HPE that has allowed the identification of these microforms and the condition remains undiagnosed in many cases because the affected individuals do not display the distinctive brain malformation that would indicate the presence of the disorder.

The most common non-chromosomal genetic abnormalities found in HPE are variants of the *Sonic Hedgehog* gene (*SHH*). This is the first gene involved in HPE³⁷. It is located on chromosome 7 at position 7q36³⁸ and is composed of 3 exons for its reference transcript (NM_000193.4). It is expressed in the floor plate of the neural tube with a SHH concentration gradient along the neural tube to enable ventralization. The initially synthesized protein is a precursor composed of two functional protein domains, the N-terminal domain Hedge, which is the signaling domain, and the C-terminal domain Hog, which allow the maturation of the ligand. It undergoes an autoproteolytic cleavage so that Hedge accommodates a cholesterol molecule and a palmitoyl motif and becomes the mature SHH morphogen²⁰. Other genes are also implicated, as *SIX3*, *ZIC2*, *GLI2* and *DISP1*^{9,12,19}.

70% of *SHH* variants are inherited from pauci or asymptomatic carriers, which is also the case for *SIX3* and *TGIF1* variants, in contrast to *ZIC2* variants for which 70% of the pathogenic variants are *de novo*^{9,10}. This suggests that the penetrance of *ZIC2* pathogenic variants much stronger than for the other genes mentioned above. Severe forms seem more often associated with variants in *SIX3* and *ZIC2*^{15,39}, whereas microforms which are more commonly linked to with variants in *SHH* and *DISP1*^{15,19}.

Recently, it has been demonstrated that the transmission mechanism of HPE is complex and most likely oligogenic^{8,12}. This mechanism is thought to result from the accumulation of low penetrance variants in *SHH*, as well as other genes associated with HPE, such as *SIX3* and *DISP1*. In these families, several variants segregate, making genotype-phenotype correlations linked to *SHH* variants more difficult to establish.

In this study, we describe the phenotypic and molecular characteristics of a cohort of 173 patients with variants in the *SHH* gene, including 77 probands and 96 relatives. In contrast to the studie previously published by our team, in 2011⁹ on clinical data from HPE individuals carrying variants in the most 5 frequent HPE-related genes (i.e. *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *GLI2*, *TGIF*),

and the study published by other team, in 2012¹⁵ on the clinical and genetic description of HPE cerebral forms linked to *SHH*, this cohort focuses on microforms.

The objective of this work is to focus the clinical signs of HPE microforms, which remain poorly understood, and try to correlate specific SHH protein domains with these microforms. The severity of the phenotype of patients presenting a single alteration in *SHH* was also compared with that of patients with multiple variants or deletions in others HPE genes. We also illustrated oligogenism by taking the example of a family with variants in several genes, including *SHH*, and with different HPE phenotypes.

This work significantly improves our knowledge of *SHH*-related phenotypes. In the context of a complex genetic disease, it provides new information on the clinical heterogeneity of the HPE-spectrum, including the pattern of inheritance, the prevalence of clinical features and the presence of additional genetic factors.

II.3. Patients and methods

A database compiling patients with HPE was set up in 1996 in Rennes, to collect clinical and molecular data from HPE individuals and their relatives. More than 2,000 individuals with HPE are described in this database. Among them, 173 individuals have at least one variant, deletion or duplication involving the *SHH* gene: the DNA of 77 HPE probands and 96 relatives has been analyzed (sequencing from blood samples or extracted DNA), accompanied by clinical reports and additional examinations for each patient. All this information was stored in the secure HPE database. All patients gave their consent for their genetic analysis and did not object to the use of their data in this study. The Ethics Committee of Rennes Hospital approved the protocol for our work.

II.3.1. Cytogenetic and molecular analyses

Patients in our cohort underwent various genetic tests (distribution of the different genetic analyses in the cohort visible in Supplementary data, Figure 13).

Array-Comparative Genomic Hybridization (aCGH) was performed with the Agilent Human Genome Microarray 180K kits (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed with the kits MLPA P036 and P070 Human Telomere (MRC-Holland) for a search for subtelomeric microrearrangements and with the kit MLPA SALSA P187 Holoprosencephaly (MRC-Holland) (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF1*, *GLI2*, *TMEM1*, *FBXW11*) for a search for genomic microrearrangements of 7 genes. Variants in the *SHH* gene alone and variants in the 4 most frequent HPE genes (*SHH*, *SIX2*, *ZIC3* and *TGIF1*) were searched by Sanger sequencing. HPE panel using targeted next-generation sequencing (NGS), including 20 genes (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF1*, *GLI2*, *PTCH1*, *GAS1*, *TDGF1*, *CDON*, *DISP1*, *FOXH1*, *NODAL*, *FGF8*, *HHAT*, *DLL1*, *SUFU*, *SOX2*, *RBM33*, *LMBR1* and *FGFR1*)⁷, and whole exome sequencing (WES) were also carried out in the cohort.

The techniques used to determine the genetic etiology of HPE have evolved over time¹⁰. Genetic diagnosis was initially based on Sanger sequencing⁹ and MLPA, with a diagnostic yield of 25%^{10,35}. Then array-CGH made it possible to highlight deletions and duplications that could, in some cases, explain HPE, and increased the percentage of genetic diagnosis to 35%. Finally, the Next-Generation Sequencing (NGS) has developed, with the creation of panels

containing numerous HPE genes and with WES to study all the genes of an individual and discover new genes involved in HPE.

II.3.2. Clinical data

Clinical information as well as additional examinations were collected for all patients registered in the HPE database having an alteration in the *SHH* gene.

83 HPO terms have been used, divided into 10 categories, to describe clinical phenotypes of patients, in order to be as exhaustive as possible : 23 terms for craniofacial anomalies, 3 for dental abnormalities, 8 for ophthalmological abnormalities, 6 for hypothalamic-pituitary and endocrine abnormalities, 12 for brain abnormalities, 4 for cardiopulmonary abnormalities, 7 for nephrological and genital abnormalities, 10 for neurodevelopmental and neurological abnormalities, 4 for digestive malformations, and 6 for extremities malformations (all HPE terms are available in the Supplementary data, Table 5).

II.3.3. Statistical analysis

The statistical test used to compare the characteristics of different types of HPE was χ^2 test, or Fisher's exact test when the previous test could not be used. Significant phenotypic differences were sought by first comparing microforms and severe forms of HPE defined as alobar, semilobar and lobar HPE, then by comparing microforms with alobar forms, in order to compare the less severe forms with the most severe forms. The same is true for genotypic comparisons by adding asymptomatic carriers to the microform group.

II.4. Results

II.4.1. Cohort characteristics

Our cohort includes 173 probands and asymptomatic relatives carrying a variation in *SHH*, with a M/F sex ratio of approximately 1 (84/87). We observe 26.6% fetuses, 42.8% children and 30.6% adults. The distribution of the different forms of HPE is shown in Figure 7. Microforms are mainly represented in this cohort, with a percentage of 47.4%, in contrast to lobar form which is the least common, with a percentage of 5.2%. Semilobar and alobar forms accounted for 9.2% and 18.5%, respectively. The percentage of asymptomatic carriers is relatively high, at 9.8%.

Individuals categorized as asymptomatic are all adults, with a variant discovered during family segregation following the discovery of HPE in the proband. We consider asymptomatic all individuals who do not present any symptoms relevant to the HPE spectrum (no microcephaly, no hypotelorism, no single median incisor, and no abnormal brain morphology). The segregation of *SHH* alterations identified maternal transmission in 26.6% of cases, paternal transmission in 25.4% of cases, and *de novo* in 14.5% of cases. Family segregation was not achieved in 33.5% of cases.

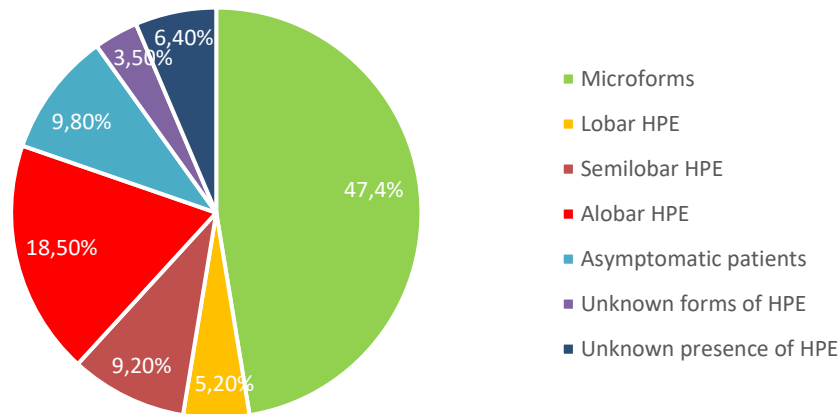


Figure 7: Distribution of different forms of HPE.

Regarding the main genetic results found in this cohort, 84.4% of individuals carried one SNV in *SHH* without other genetic alteration, 5.8% carried one SNV in *SHH* with SNV in other gene, 2.3% carried a duplication of *SHH* entire, 1.7% carried a 7q deletion alone and 1.7% carried a 7q deletion with a duplication in other loci. The distribution of the different cases is shown in Figure 8.

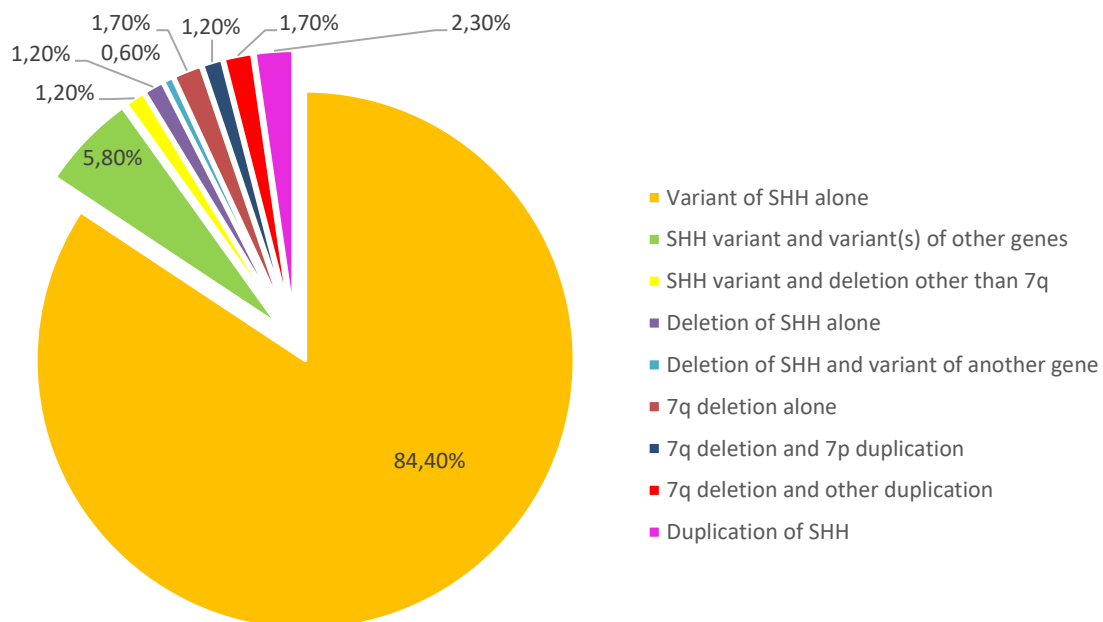


Figure 8: Distribution of the different possible results of genetic analyzes.

The most frequent clinical signs in our cohort are craniofacial malformations: hypotelorism (45.1%), nasal hypoplasia or aplasia (23.7%), microcephaly (57.2%) and cleft lip and palate (23.7%). Dental anomalies such as a single maxillary median incisor were observed in 20.2%, (29.7% if we exclude fetuses and early deaths before 6 months of life where the anomaly cannot be detected i.e. 118 patients instead of 173 in the cohort). Furthermore, we have identified intrauterine growth delays (15%) and then growth delays in height (15%) and weight (15%). Anomalies of the anterior pituitary gland are not sufficient to explain these growth abnormalities, as only 3 patients were diagnosed with GH deficiency. Feeding difficulties are

not severe enough to explain the extent of statural and weight growth retardation. Intellectual disability and neurodevelopmental delay in general are logically present, at 21% and 13.3% respectively, taking into account the whole cohort. Excluding fetuses and early deaths before 6 months, the percentages reach 30.5% and 19.5% respectively.

All forms of HPE combined, there are respectively 4% of patients who have a digestive malformation, 4.6% who have a cardiopulmonary malformation, 5.8% who have malformations of the extremities, 8.1% who have renal/genital malformations, 7.5% who have abnormal eye morphology and 13.3% who have a cerebral malformation unrelated to HPE. Hypothalamic-pituitary and adrenal glands abnormality was observed in 12.1% of patients in the cohort. Neurological disorders are reported in 11% of living individuals, including neurodevelopmental delay, epilepsy, and axial hypotonia.

II.4.2. Description of phenotypes of HPE microforms, comparison with other forms of HPE

The 82 patients with HPE microforms came from 41 families. The M/F sex ratio is 1.4 (48/34). Among the microforms, there are 30 probands (i.e. 39% of the probands in our cohort), the remaining 52 carriers being relatives diagnosed following the diagnosis of the proband and the genetic result. Transmission is paternal in 30.5% of microform cases, maternal in 28% of cases and *de novo* in 7.3% of cases. Compared to alobar HPE, there is significantly less *de novo* transmission in microforms ($p=0.0007$).

Table 1: Comparison of extracraniofacial features between microforms and other forms of HPE.

Asymptomatic carriers and patients for whom the form of HPE was not known were not included.

	Microforms	Alobar HPE	Semilobar HPE	Lobar HPE
Total	82	32	16	9
Digestive system	2 (2.4%)	2 (6.25%)	1 (6.25%)	2 (22.2%)
Heart and lungs	3 (3.7%)	4 (12.5%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)
Kidneys and urinary tract	2 (2.4%)	3 (9.4%)	1 (6.25%)	0 (0.0%)
Pelvis	8 (9.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)
Eyes	8 (9.8%)	3 (9.4%)	1 (6.25%)	0 (0.0%)
Brain (other than HPE)	6 (7.3%)	9 (28.1%)	3 (18.8%)	4 (44.4%)
Neural tube	4 (4.9%)	1 (3.1%)	1 (6.25%)	0 (0.0%)
Adrenal	0 (0.0%)	4 (12.5%)	1 (6.25%)	0 (0.0%)
Hypothalamus and pituitary gland	5 (6.1%)	2 (6.25%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

The extracraniofacial malformations (Table 1) most frequent in patients with microforms of HPE are pelvic malformations (9.8%), including 3 patients with a micropenis, 2 patients with inguinal hernias and 2 patients with hypospadias, as well as ophthalmological malformations (9.8%) with mainly colobomas, 3 patients with chorioretinal coloboma and 1 patient with iris and chorioretinal coloboma. Brain abnormalities other than HPE are also quite common in patients with microforms (7.3%), including cerebellar hypoplasia present in 4 patients and ventricular dilatation present in 3 patients. Hypothalamic-pituitary abnormalities are observed in 6.1% of patients with microforms, 3 had hypoplasia of the pituitary gland and 3 had an ectopic pituitary gland.

Comparing the extracraniofacial involvement of microforms of HPE with those of other forms of HPE, there is a significant difference regarding brain abnormal morphology (other than HPE)

and adrenal involvement. Indeed, a correlation between the severity of HPE and the presence of other cerebral involvement is demonstrated ($p < 0.05$, Figure 9): patients with lobar, semilobar and alobar forms of HPE were at greater risk of having other brain abnormal morphology (including hypoplasia of the cerebellum and lateral ventricle dilatation) but also of developing adrenal hypoplasia or even agenesis ($p < 0.01$).

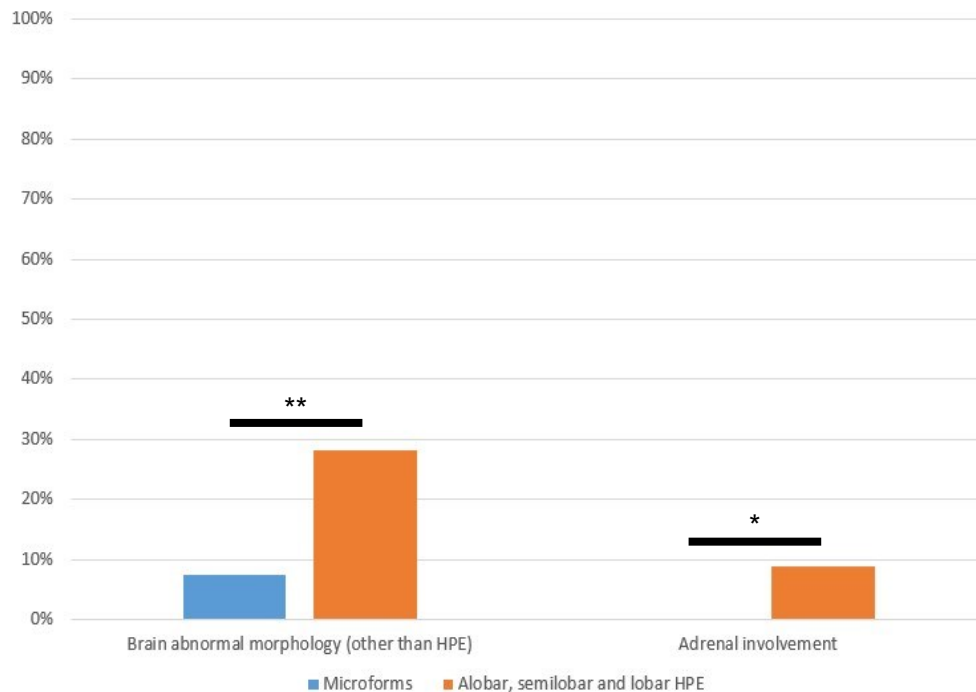


Figure 9: Comparisons of abnormal brain morphology (other than HPE) and adrenal involvement between microforms and lobar, semilobar and lobar forms of HPE.

Abnormal brain morphology: Chi-square test, $p = 0,0033$.

Adrenal involvement: Fisher's exact test, $p = 0,01$.

Craniofacial malformations are much more frequent than organ malformations in patients with microforms of HPE, but also in patients with other forms of HPE for certain facial malformations (Table 2).

Table 2: Comparison of craniofacial damage between microforms and other forms of HPE.

Asymptomatic carriers and patients for whom the form of HPE was not known were not included.

	Microforms	Alobar HPE	Semilobar HPE	Lobar HPE
Total	82	32	16	9
Malformations of :				
Nose	12 (14.6%)	23 (72.0%)	10 (62.5%)	5 (55.6%)
Skull	55 (67.1%)	20 (62.5%)	12 (75.0%)	7 (77.8%)
Nasal cavities	22 (26.8%)	2 (6.25%)	0 (0.0%)	3 (33.3%)
Orbits	41 (50.0%)	27 (84.4%)	11 (68.8%)	6 (66.7%)
Oral sphere	5 (6.1%)	1 (3.1%)	1 (6.25%)	1 (11.1%)
Chin	4 (4.9%)	5 (15.6%)	0 (0.0%)	2 (22.2%)
Cleft	14 (17.1%)	19 (59.4%)	13 (81.6%)	5 (55.6%)
Ears	2 (2.4%)	9 (28.1%)	4 (25.0%)	2 (22.2%)
Teeth	36 (43.9%)	7 (21.9%)	0 (0.0%)	4 (44.4%)

Skull anomalies represent the most often frequently occurring cranial abnormality in microforms of HPE (67%), with microcephaly in the vast majority of cases. Craniostenoses are also

represented at a lower frequency in microforms compared to alobar and semilobar forms. These anomalies are not correlated with the severity of HPE ($p=0.8$). Orbits malformations are the second most frequent craniofacial features in microforms with hypotelorism (50%). Unlike microcephaly, it is correlated with the clinical severity of HPE, and is all the more severe as the form of HPE is severe, including severe hypotelorisms which can go as far as cyclopia in alobar forms ($p<0.01$, Figure 10). The same is true of ear malformations which are correlated with the severity of the form of HPE ($p<0.001$; Figure 10).

Tooth malformations, mainly with a single median incisor, and nasal cavity malformations (stenoses of the pyriform sinuses and choanal atresia) are significantly more reported in microforms than in more severe forms of HPE (43.9% and 26.8% respectively, $p<0.01$, Figure 10).

Regarding dental abnormality, only premaxillary agenesis can be evaluated in fetuses and infant ; dental agenesis and single median incisor cannot be assessed at this stage. 80% of alobar forms and more than 65% of semilobar forms are fetuses having undergone a medical termination of pregnancy. The limited lifespan of individuals who are born with alobar or semilobar HPE often precludes the observations of dental malformations. This contributes to the relatively low prevalence of dental abnormalities reported in alobar and semilobar forms.

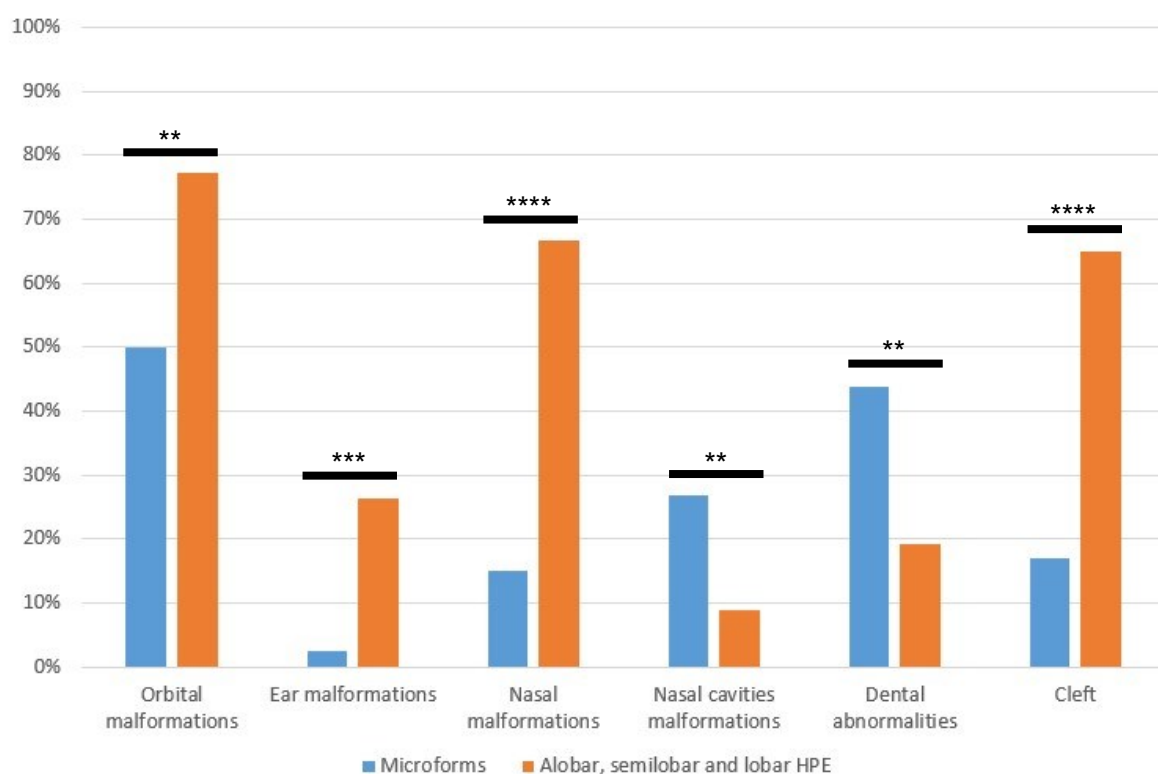


Figure 10: Comparisons of cleft, ears, orbital, nasal, dental and nasal cavity malformation between microforms and lobar, semilobar and lobar forms of HPE.

Orbital malformations: Chi-square test, $p = 0.0072$. Nasal lesions: Chi-square test, $p<0.0001$.

Dental damage: Chi-square test, $p = 0.0024$. Nasal cavity damage: Chi-square test, $p = 0.0098$.

Cleft: Chi-square test, $p<0.0001$. Ear malformations: Chi-square test, $p = 0.0004$.

The same explanation applies to nasal cavity malformations in our cohort: stenoses of the pyriform sinuses and choanal atresia are most often diagnosed following breathing difficulties at birth, which cannot be the case in these fetuses, and the autopsy only assesses choanal

permeability, when it is performed. The 2 fetal cases reported were complete stenoses of the choana (choana impassable at autopsy). Nasal malformations are, as for them, significantly less frequent in microforms than in more severe forms of HPE (14.6% in microform versus 72% in alobar HPE, $p<0.0001$, Figure 10). It is the same for cleft (17.1% in microform versus 59.4% in alobar HPE, $p<0.0001$, Figure 10). The significant differences found for each craniofacial feature are also highlighted when comparing microform and alobar form: orbital malformations, nasal malformations, clefts and ear malformations are significantly more present in alobar forms than in microforms ($p<0.001$), while dental abnormalities and nasal cavity malformations are significantly more present in microforms than in alobar forms ($p<0.05$).

Craniofacial anomalies are generally more common in alobar, semilobar and lobar forms of HPE because the anomalies identified in the microforms can be discreet and not always observed, while the anomalies are much more severe for alobar and semilobar forms, including nasal aplasia, single nostrils, proboscis, cyclopia, complete clefts (lip, palate, nostrils).

The severity of craniofacial malformation therefore reflects the severity of the brain damage. Indeed, craniofacial malformations, particularly damage to the nose and orbits, is all the more frequent and severe as the form of HPE is severe, which is not necessarily the case for organ malformations. There is no significant difference for most organs except the brain and adrenals, and some organs seem to be more affected in the microforms without the difference with the severe forms being significant (genital and ophthalmological malformations, malformations of the neural tubes).

Other clinical elements should be mentioned in patients affected by microform: neurodevelopmental delays and neurological manifestations of the disease. Indeed, in the most severe forms, live births are very rare, questions about neurodevelopment therefore do not arise, unlike microforms for which the vital prognosis is, in general, not committed. Among patients with microform HPE, 37.8% presented neurodevelopmental delay and/or intellectual disability, mild to moderate. This percentage is even higher in lobar forms of HPE: of the 6 affected children, 5 presented neurodevelopmental disorders (83.3%), and these delays were all severe. Conversely, few neurological manifestations (epilepsy, hypotonia) are present in microforms (6.1%), they are rather identified once again in lobar forms (66.6%) and in the few live births of severe forms.

II.4.3. Genotype-phenotype analysis

Our cohort includes 60 different SNVs in the *SHH* gene distributed among 158 patients (15 patients have *SHH* deletions/duplications), interpreted as class 4 or 5 (ACMG classification), represented in Figure 11 depending on the forms of HPE with which they are associated : 13 variants in asymptomatic carriers, 35 variants for microforms, 8 variants for lobar forms, 12 variants for semilobar forms and 25 variants for alobar forms. 19 variants (31.7%) have not been previously reported.

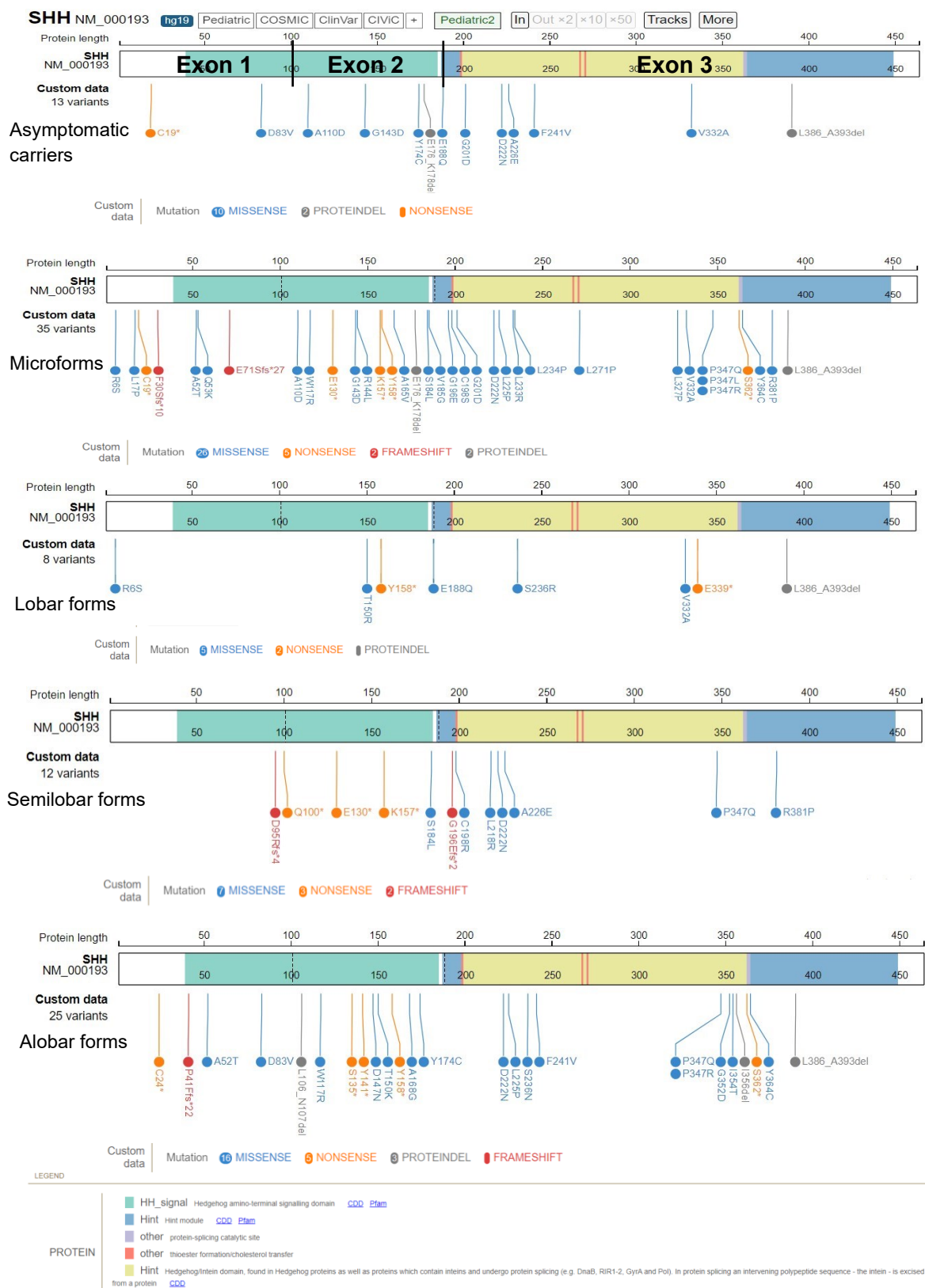


Figure 11: Mutational landscape of *SHH* gene according to the form of HPE (asymptomatic carriers, microforms, lobar forms, semilobar forms and alobar forms). This comprehensive visualization of sequence variants was performed with ProteinPaint (<http://pecan.stjude.org>).

Variants are presented as filled circles with colors corresponding to variant type: blue for missense, orange for nonsense, brown for deletion, red for frameshift and purple for splice variants.

The GenBank reference used was NM_000193.4.

Missense variants have been identified in the majority, whatever the form of HPE, in asymptomatic carriers (76.5%) and microforms (74.3%), and also in alobar HPE (64%). For the nonsense variants, 20% of patients had alobar HPE and 25% of patients had semilobar HPE, compared to less than 15% in microforms and asymptomatic carriers. Frameshift variants were rarely present: there were none in asymptomatic carriers and in lobar forms unlike semilobar forms for which they are found in 16.7% of cases, and were present in less than 5% of cases in microforms and alobar forms. The other variants correspond to non-frameshift indels. There is no correlation between the nature of the variant and the severity of the HPE form.

Exon 3 is the exon of *SHH* in which the most variants of all forms of HPE combined are observed (45.2%). Indeed, we have identified 42.9% of variants of lobar forms, 44% of variants of alobar forms, 46.1 % of variants from asymptomatic carriers and 50% of variants from semilobar forms and microforms in this exon. Exon 3 brings together the Hint protein domain and an intermediate protein sequence (which will be excised by the Hint domain in order to make the SHH molecule active in the signaling pathway). This is the largest exon of SHH. 38.7% of the variants are in exon 2 and 16.1% in exon 1. The 3 exons have different sizes, so we studied the number of variants per 100 bp in each exon to see if an exon has more variants proportionally to its size: 5 variants per 100 bp in exon 1, 13 variants per 100 bp in exon 2, and 5 variants per 100 bp in exon 3. Thus, there are more variants in exon 2 proportionally to its size, regardless of the phenotype of the patients.

This exon contains part of the HH domain which, after maturation, constitutes the mature ligand. It is the most conserved exon, present in all isoforms. No exon is significantly more correlated with microforms/asymptomatic carriers or severe forms.

The variants are mainly found in the HH signal protein domain (40.9% of all variants, all forms of HPE combined), which is logical because it is this region of the protein that will become the active SHH morphogen. More precisely, 40% of the microform variants and 48% of the alobar HPE variants are observed in this domain in particular. There is no correlation between protein domain and clinical phenotypic severity. However, in the middle of intermediate protein sequence, there is a region that appears to be free of variants: in fact, from amino acids 275 to amino acids 330, no pathogenic variant has been identified in our cohort. The variants reported in the literature present at this location of the gene are most often benign (p.Gly290Asp⁴⁰, p.Asp322Asn unpublished but reported likely benign on Clinvar) or VUS.

Table 3: Families with the same mutation and associated HPE type.

Mutation	Amino Acid change	Type of mutation	Protein domain	Number of families carrying the variant	Type of HPE
c.664G>A	p.Asp222Asn	Missense	intermediate protein sequence	2	2 alobar, 2 semilobar, 5 microforms, 5 asymptomatic patients
c.674T>C	p.Leu225Pro	Missense	intermediate protein sequence	2	2 alobar, 1 semilobar, 3 microforms,
c.995T>C	p.Val332Ala	Missense	intermediate protein sequence	2	1 alobar, 1 lobar, 1 microform
c.1091A>C	p.Tyr364Cys	Missense	intermediate protein sequence	2	1 alobar, 4 microforms

Of the 60 different SNV of our cohort, 4 variants are each present in 2 different unrelated families (Table 3): c.664G>A, c.674T>C, c.995T>C, c.1091A>C. These are all missense variants. The associated forms of HPE are different depending on the affected family (Table 3). There is therefore inter- and intra-family phenotypic variability for the same genetic variants identified in *SHH*.

In addition, 1 patient had a deletion of exon 1 of *SHH*, 2 patients had a deletion of the entire *SHH* gene, 8 patients had a 7q36 deletion involving *SHH* and 4 patients had an *SHH* duplication. Only the duplication of *SHH* was classified in class 3 : the 4 patients came from the same family, with a fetus affected by a semilobar HPE, a fetus affected by a HPE not labeled on the reports (at least classical because of fusion olfactory bulbs and thalami in particular), an adult who transmitted the duplication and whose phenotype was not known but which seemed less severe (normal brain MRI), and a child still alive for whom the phenotype was also not known. Furthermore, only MLPA looking for genomic rearrangements in the main *SHH* genes was carried out, not allowing the presence of a possible other genetic factor that could lead to HPE to be eliminated. Thus, the duplication could not be classified into more than 3. The patient with the *SHH* exon 1 deletion had microform, as did 3 of the 8 patients with a 7q36 deletion. A lobar form has been observed in one of the patients with a *SHH* deletion, a semilobar form in 2 patients with a 7q deletion, and an alobar form in the remaining 3 people with 7q deletion. The last patient with *SHH* deletion had an unknown HPE status but was affected by at least one microform (microcephaly, hypotelorism, single median incisor). There are therefore as many microforms as alobar forms in patients carrying 7q36 deletion. The deletion including *SHH* does not seem sufficient to explain the clinical variability. Furthermore, 4 of the 8 patients with a 7q deletion had Currarino syndrome (2 patients with microform, 1 patient with semilobar HPE and 1 patient with alobar HPE). This is explained by the fact that the *MXN1* gene is present at 7q36 like *SHH* and that deletions at this level of the chromosome also carry *MXN1*⁴¹. The association of the two pathologies constitutes a syndrome of contiguous genes.

II.4.4. Comparison of phenotype severity between patients with a single hit in *SHH* and patients with one hit in *SHH* and other genetic events, family with oligogenism.

In order to try to explain the phenotypic variability, a second genetic event was sought in certain patients and observed in 18 patients in our cohort. It should be noted that a few patients have benefited from WES, oldest cases had only a search for variants in *SHH* alone by Sanger or 4-gene HPE panels (Supplementary data, Figure 13). The number of genetic events according to the form of HPE is described in Table 4. There is no correlation between the number of hits and the severity of HPE.

Table 4: Severity of HPE according to the number of variants found in patients

	Microforms	Alobar HPE	Semilobar HPE	Lobar HPE	Asymptomatic carriers	HPE type unknown	Total
1 hit	75 (51.7%)	28 (19.3%)	14 (9.7%)	7 (4.8%)	16 (11.0%)	5 (3.4%)	145
Multiple hits	7 (41.2%)	4 (23.5%)	2 (11.8%)	2 (11.8%)	1 (5.9%)	1 (5.9%)	17
Total	82	32	16	9	17	6	162

Oligogenism seems to explain some of the phenotypic variability encountered, at least for some variants. A family from our cohort carrying different variants with different clinical

presentations depending on the variants present has been published¹². The *SHH*:c.1040C>A variant has been identified in these 3 fetuses and was inherited from the father who had a microform of HPE (as well as the father's brother and 3 children of the father's brother). This clinical variability could be explained by the presence of a variant in another gene that can give HPE, *DISP1*:c.328T>C. It therefore seems necessary to have both variants (*SHH* and *DISP1*) to develop a severe form of HPE, whereas the presence of the variant in *SHH* alone is more likely to cause microforms and the presence of the variant in *DISP1* alone does not give any particular clinical signs.

Another family in the cohort presents several variants other than *SHH* with different phenotypes. In this family, two medical terminations of pregnancy occurred for alobar and lobar HPE, a boy was born and presented a microform and both parents were asymptomatic. The different genes with variants and their segregations are shown in Figure 12.

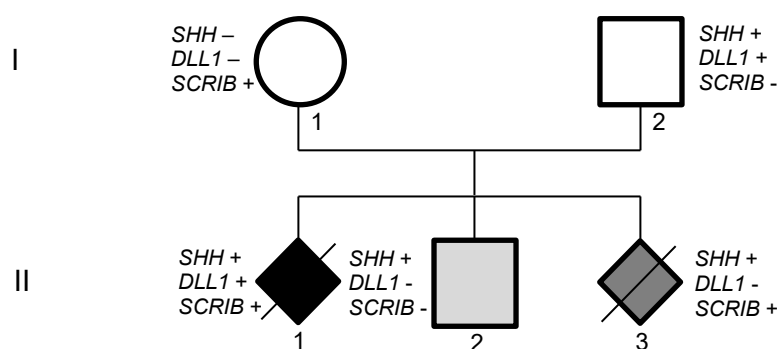


Figure 12: Family tree with segregation of variants and clinical phenotype.

Black filling refer to alobar HPE, dark gray filling refer to lobar HPE, light gray filling refer to microform and white filling refer to asymptomatic carriers.

The variant found in the *SCRIB* gene, c.1199C>T (p.Thr400Met), was not sufficient on its own to explain the occurrence of HPE because the mother which carries this variant was asymptomatic. The variant in the *SHH* gene, c.1157_1180del (p.Leu386_Ala393del), is not sufficient to explain severe forms of HPE: individual II-2 is carrier with a microform of HPE and the father, from whom the variant is inherited, is asymptomatic. The two fetuses with the presence of HPE (alobar and lobar) were carriers of both the *SHH* variant and the *SCRIB* variant. It would therefore seem that the segregation of the variant in these two genes was at the origin of the severe forms of HPE. The fetus with the alobar HPE also had the variant in *DLL1* gene, c.2117C>T (p.Ser706Leu), therefore the 3 variants in total. The addition of the *DLL1* variant, which, with the *SHH* variant, did not give a particular phenotype, may perhaps play a role in the severity of this phenotype when it was associated with the variants of both *SCRIB* and *SHH*.

II.5. Discussion

We describe a cohort of 77 HPE probands and 96 relatives, all carrying *SHH* alteration, the first gene identified as causing HPE³⁷. However, HPE is a complex disease, making genotype-phenotype correlations challenging, particularly with *SHH* variants. Previous studies have shown that *SHH* variants are more often correlated with milder HPE phenotypes, such as microforms, and sometimes even asymptomatic relatives, compared to other HPE-related genes like *ZIC2* and *SIX3*^{9,35,42}. We have confirmed this with our cohort as 47.4% of the 173

patients have microforms, and 9.8% are asymptomatic (all related). We therefore have a majority of patients with mild phenotypes.

Microforms of HPE are underrepresented in the literature^{34,35}, which prompted us to focus on them by comparing the clinical features of these individuals with those of patients with alobar, semilobar, and lobar HPE. There are few extracraniofacial features that show a significant difference in prevalence between microforms and the more severe forms of HPE (alobar, semilobar and lobar combined). Organ malformations are generally rare in HPE, regardless of the type. However, brain abnormalities (outside of the HPE spectrum) and adrenal malformations are significantly more frequent in severe forms of HPE compared to microforms. Notably, adrenal glands hypoplasia/agenesis in the context of HPE with *SHH* variants are previously undocumented, with only one case report of a 21q22 deletion linked to HPE and renal agenesis⁴³, but factors upstream of *SHH* seem to influence adrenal development⁴⁴. *Shh*^{+/−} mice models have highlighted the consequences of *SHH* haploinsufficiency on the development of the pituitary gland: in fact, these mice presented an abnormal pituitary morphology without alteration of its function⁴⁵. Interestingly, no case of syntelencephaly were observed in our cohort (nor in other cohorts of HPE patients with variants in *SHH*^{9,35}), with regard to brain malformations, whereas it is observed with other HPE genes (*ZIC2* in particular)⁴⁶.

Craniofacial malformations generally reflect the severity of brain abnormalities in HPE: the more serious they are, the more severe the forms of HPE are^{6,25}. The physiopathology of HPE with the anomaly of embryogenesis at the time of diverticulization of the telencephalic vesicle, explains the poor development of the frontonasal bud and facial malformations⁶, particularly of the nose but also of the orbits and the appearance of clefts. Animal models, particularly *Shh*^{+/−} mice, support these explanations: poor fenestration of the basisphenoid can cause insufficient skull growth and jaw abnormalities⁴⁵. Thus, the more severe the HPE is, the less correctly this bud has developed and the more abnormality exists in these different structures. However, we have not validated this theory with regard to dental involvement and nasal cavity malformations. Dental abnormalities are often undetectable in fetuses and infants since those with alobar and semilobar HPE typically die before and shortly after birth. Nasal cavity malformations are also rarely diagnosed prenatally, as pyriform sinus stenosis is only identifiable via a facial CT scan, which is not routinely performed on fetuses, and the permeability of the choanae is not always assessed. Additionally, 38% of patients with microforms develop neurodevelopmental delays and/or intellectual disability of varying severity⁴⁷, which is the case for all children with a lobar HPE. This risk must be clearly communicated to parents during diagnosis.

Our work also identified another syndrome associated with HPE: Currarino syndrome. This diagnosis was made in patients with a 7q36 deletion, which affects the *MXN1* and *SHH* genes^{48,49}. Thus, when a 7qter deletion is identified, it is important to consider HPE and Currarino syndrome. Note that not all patients with this deletion exhibit Currarino syndrome, as this condition has incomplete penetrance. Additionally, the form of HPE can vary: 37.5% of patients with the deletion have the microform, while another 37.5% have alobar HPE.

Furthermore, we identified a region in the *SHH* gene that does not contain pathogenic variants in our cohort and where only benign variants have been reported⁴⁰. This region, spanning amino acids 275 to 330, is located in the middle of the intermediate protein domain, which is crucial for the maturation of the SHH morphogen, enabling it to become active and initiate its signaling cascade. Since this protein sequence is eventually removed, variants in

this area are less likely to be deleterious, which could explain the rarity of pathogenic variants in this region of the *SHH* gene. While few polymorphisms have been documented in this region (gnomAD, clinvar), it generally shows tolerance to substitutions⁵⁰. Therefore, if a patient with HPE has a variant in this region, it is advisable to investigate other potential variants, either in *SHH* or in other genes associated with, as the identified variant may not be pathogenic. Additionally, functional studies, such as testing the impact of variant on protein function (e.g., functional test based on alkaline phosphatase dosage after differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts with *SHH* variants⁵¹), would help confirm this.

Regarding the types of variants, a previous study³⁵ found that patients with truncating variants had a greater susceptibility of developing severe HPE (lobar, semilobar or alobar) compared to other variants (49% and 35% respectively). In our cohort, however, we did not find a significant difference supporting this correlation. We found that 62% of patients presenting alobar, semilobar or lobar HPE among truncating mutations, and 44% among non-truncating mutations. Although there is a higher percentage of patients with severe HPE among those with truncating mutations and a lower percentage among those with non-truncating mutations, the difference is not statistically significant. This may be attributed to the larger number of patients with HPE among non-truncating mutations in our cohort compared to the previously published cohort, which may be influenced by different in the distribution of HPE and population ethnicity (American population in the previous cohort and European population in our cohort).

De novo transmission is significantly more common in alobar forms than in microforms, making it sufficient explanation for this severe phenotype. This makes sense because individuals with microforms or asymptomatic carriers are more likely to transmit the variant to their descendants than patients with severe forms. Previously studies^{9,10} found that 70% of *SHH* variants were inherited from parents with few or no symptoms. In our cohort, 52% of variants were inherited, but 33.5% had unknown transmission. Excluding those with unknown transmission, parental inheritance jumps to over 70%, aligning with previous finding. When there is inter- or intrafamilial variability with an identified *SHH* variant, this variant may not fully explain the presence of HPE and do not prejudge its severity in a large number of cases. The majority of families in our cohort only benefited from *SHH* direct sequencing or 4-gene panel, sometimes with array CGH but rarely WES, as these cases are old patients. Since the probands and their relatives underwent the recommended genetic tests at the time of diagnosis, they did not necessarily receive WES, which are recent techniques¹⁰. Ideally, WES or WGS should be performed on all individuals in the cohort, but the limiting factor is the lack of sufficient material.

The clinical variability in HPE is likely due to variants in genes not yet known as HPE-genes. In 2 families, 4 variants were identified, with significant intra and interfamilial variability. This supports oligogenism, a known transmission in HPE⁸, which could explain the different forms linked to the same variant. In the family presented above, variants in *SHH*, *DLL1* and *SCRIB* were identified, explaining the range of phenotype from severe to mild and even asymptomatic carries in the same family, illustrating the concept of oligogenic transmission. *DLL1* (*Delta like 1*), a ligand of the NOTCH pathway, is expressed in the forebrain like *SHH* and interacts with the FGF signaling pathway, which plays a major role in early brain development^{7,52}. The link between *SCRIB* and HPE is less clear. No studies have reported *SCRIB* variant in HPE patients, but this gene is involved in neural tube closure and can cause craniorachischisis with incomplete penetrance^{53,54}. Functional studies would be necessary to evaluate its involvement in brain development and in the pathology. This underscores the need to go beyond *SHH* variants and use WES/WGS in HPE diagnosis to uncover other gene

Table 5: The different extracraniofacial clinical signs depending on the organs affected.

Craniofacial malformations	Nose: Aplasia/Hypoplasia involving the nose (HP:0009924), single naris (HP:0009932), maxillo-nasal dysplasia (HP:0000327 with HP:0005280). Cranial vault: Microcephaly (HP:0000252), craniosynostosis (HP:0001363), aplasia cutis congenita over the scalp vertex (HP:0004471). Nasal cavities: Choanal stenosis (HP:0000452), pyriform aperture stenosis (HP:0025011). Eyes: Hypotelorism (HP:0000601), hypertelorism (HP:0000316), ptosis (HP:0000508), proptosis (HP:0000520), microphthalmia (HP:0000568). Oral sphere: Glossoptosis (HP:0000162), high palate (HP:0000218). Chin: Micrognathia (HP:0000347), retrognathia (HP:0000278), mandibular prognathia (HP:0000303). Cleft: Cleft lip (HP:0410030), Median cleft upper lip (HP:0000161), Orofacial cleft (HP:0000202). Ears: Abnormally folded helix (HP:0008544), low-set ears (HP:0000369), microtia (HP:0008551). Teeth: Aplasia/Hypoplasia of the premaxilla (HP:0010756), tooth agenesis (HP:0009804), solitary median maxillary central incisor (HP:0006315).
Digestive malformations	Pyloric stenosis (HP:0002021) Ileal atresia (HP:0011102) Malrotation of colon HP:0004785 Splenopancreatic fusion HP:0032075 Annular pancreas HP:0001734
Cardiopulmonary malformations	Hypoplastic aortic arch HP:0012304 Atrial septal defect HP:0001631 Ventricular septal defect HP:0001629 Abnormal lung lobation HP:0002101
Renal and pelvic malformations	Renal hypoplasia/aplasia HP:0008678 Tubular luminal dilatation HP:0032622 Abnormal ureter morphology HP:0025633 Hydroureter HP:0000072 Inguinal hernia HP:0000023 Hypospadias HP:0000047 Micropenis HP:0000054 Urethrovaginal fistula HP:0008716
Ophtalmological damages	Retinoblastoma HP:0009919 Retinal dysplasia HP:0007973 Optic atrophy HP:0000648 Coloboma HP:0000589 Dacryocystocele HP:0030752 Strabismus HP:0000486
Cerebral malformations unrelated to HPE	Aplasia/Hypoplasia of the cerebellum HP:0007360 Lateral ventricle dilatation HP:0006956 Arachnoid cyst HP:0100702
Neurological disorders	Seizure HP:0001250 Axial hypotonia HP:0008936 Spina bifida occulta HP:0003298 Currarino syndrome OMIM:176450

Malformations of extremities	Single transverse palmar crease HP:0000954 Finger clinodactyly HP:0040019 Brachydactyly HP:0001156 Syndactyly HP:0001159 Postaxial polydactyly HP:0100259 Talipes equinovarus HP:0001762
Hypothalamic-pituitary and adrenal damages	Adrenal gland agenesis HP:0011743 Small pituitary gland HP:0012506 Hypothalamic atrophy HP:0025058 Anterior hypopituitarism HP:000083 Abnormal posterior pituitary morphogenesis HP:0011751

III. Conclusion et perspectives

L'étude de notre cohorte européenne de patients atteints d'HPE avec des altérations du gène *SHH* a mis en évidence de nouveaux éléments cliniques mais également génotypiques avec des hypothèses de corrélations génotype-phénotype.

Les malformations cérébrales (autres que l'HPE) et les hypoplasies/agénésies surrénaliennes ont été significativement plus retrouvées dans les formes alobaires et globalement dans le groupe HPE sévère (comportant HPE alobaire, semilobaire et lobaire) que dans les microformes (Figure 9). Il en est de même pour les malformations des orbites, du nez, des oreilles et les fentes (Figure 10). Toutefois, les malformations des cavités nasales et dentaires sont significativement plus présentes dans les microformes que dans les formes alobaires (et que dans le groupe HPE sévère) (Figure 10).

III.1. Hypothèses de corrélations génotype-phénotype

L'analyse de la position des SNVs a mis en évidence une plus grande proportion de variants dans l'exon 3 (Figure 11). Cependant, cet exon est le plus grand, le nombre de variants pour 100 pb a donc été recherché afin d'étudier la concentration de SNVs par exon. Ainsi, c'est l'exon 2 qui concentre le plus de SNVs, 2,5 fois plus que dans les exons 1 et 3. Il est très conservé car présent dans tous les isoformes de *SHH* (Figure 14) et très intolérant à la substitution (cadre rouge, Figure 15). Concernant les domaines protéiques, aucune différence significative n'a été mise en évidence en comparant les microformes et porteurs asymptomatiques avec les HPE sévères et avec les HPE alobaires plus précisément.

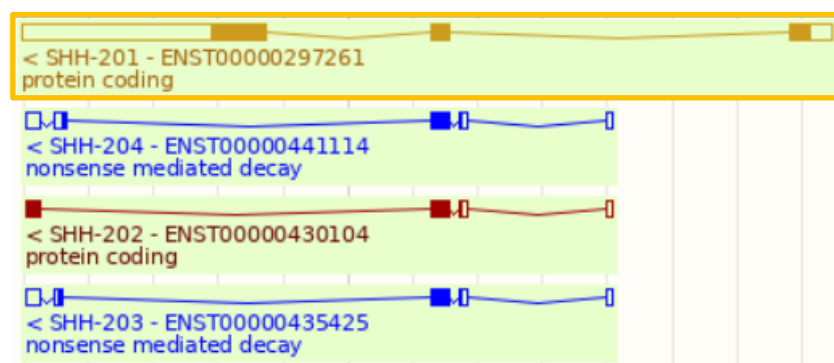


Figure 14 : Isoformes de *SHH*.

Le cadre orange met en évidence l'isoforme principal de *SHH*.

Source : Ensembl.

Toutefois, il existe une région dépourvue de variants dans notre cohorte, de 275 acides aminés à 330 acides aminés, au sein de la séquence protéique intermédiaire, pour laquelle les variants sont rapportés bénins dans Clinvar, GnomAD et la littérature⁴⁰. Peu de polymorphismes ont été décrits dans cette zone de l'exon 3, mais elle présente une tolérance à la substitution (cadre vert, Figure 15) et des variants à l'état homozygote ont déjà été rapportés (p.Gly290Asp⁴⁰, p.Gly297Asp par exemple). L'interprétation des variants dans cette région doit prendre en compte ces informations, afin de ne pas conclure hâtivement à la causalité du variant de *SHH* dans l'HPE, d'autant plus que l'oligogénisme rajoute de la complexité dans le diagnostic génétique de cette maladie. Aucune étude fonctionnelle des variants de cette région précise n'a été entreprise jusqu'alors. En dehors de cette zone de la

séquence protéique intermédiaire, ce domaine comporte de nombreux SNVs à ses extrémités, notamment associés à des microformes et à des HPE alobaires, ce qui est cohérent avec l'intolérance à la substitution retrouvée (cadres orange, Figure 15). Des études fonctionnelles ont confirmé les conséquences protéiques de ces variants : les SNVs au niveau de l'extrémité N-terminale de SHH-C ont abouti à une modification de la structure tertiaire de la protéine induisant une diminution du clivage auto-catalysé de *SHH*, et les SNVs au niveau de l'extrémité C-terminale de SHH-C ont empêché la liaison SHH-cholestérol. La production de SHH-N, fraction de la protéine possédant la fonction de signalisation une fois maturée, a ainsi été réduite^{51,55}.

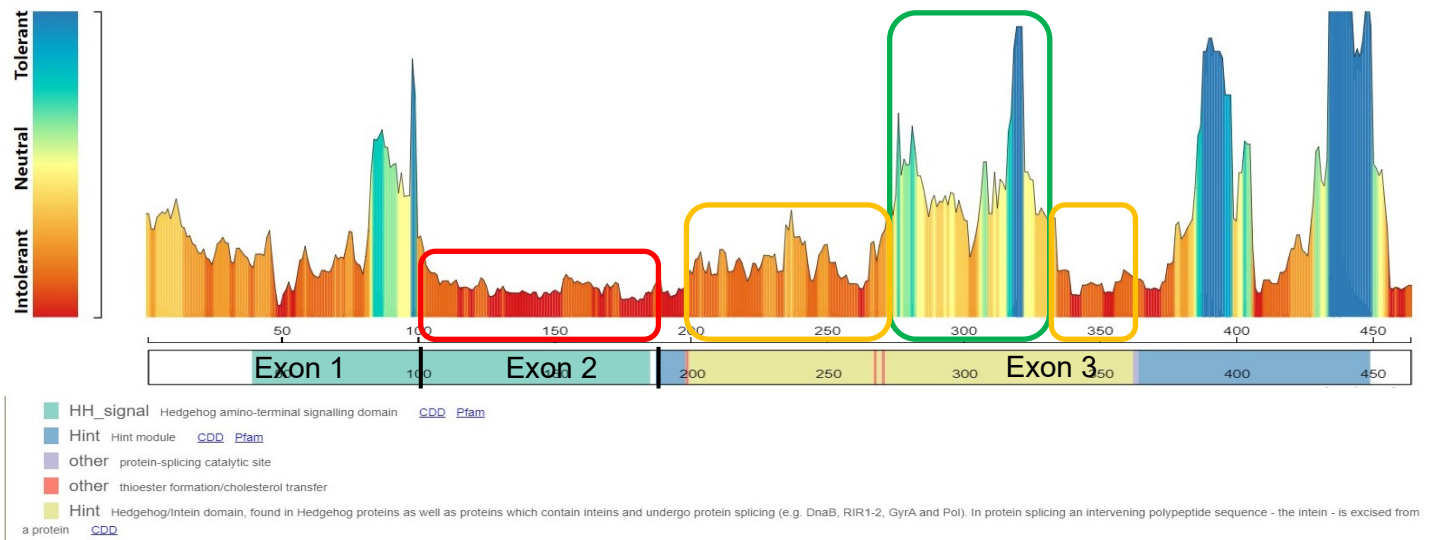


Figure 15 : Profil de tolérance à la substitution de *SHH*⁵⁰.

Le cadre rouge représente le profil de l'exon 2, qui est très intolérant à la substitution.

Le cadre vert représente une zone de l'exon 3 globalement tolérante à la substitution.

Les cadres oranges représentent deux zones de l'exon 3 intolérante à la substitution.

III.2. Etudes fonctionnelles du gène *SHH*

Ces études reposent notamment sur la transfection d'ADNc (ADN circulaire) de *SHH* muté dans des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2. Ces dernières se différencient en ostéoblastes si l'ADNc de *SHH* est sauvage, induisant la production de phosphatase alcaline qui peut alors être mesurée. Les variants sains ont une activité phosphatase alcaline conservée, similaire à celle de la protéine SHH sauvage. Les variants délétères ont, quant à eux, soit une activité phosphatase alcaline diminuée et donc une efficacité réduite, soit une chute de cette activité avec une perte totale (ou presque) de fonction⁵¹.

Ainsi, si ces études sont en défaveur de la pathogénicité de certains variants de *SHH*, leur implication dans l'HPE devrait être discutée et une autre étiologie génétique pourrait être recherchée chez le patient. Si la pathogénicité est confirmée et qu'il n'existe pas de variabilité phénotypique chez les porteurs du variant, l'HPE pourrait être imputée à ce variant de *SHH*, ce qui est notamment le cas pour les variants *de novo* retrouvés chez des fœtus avec une HPE alobaire. Cependant, si différentes formes d'HPE sont retrouvées chez des patients porteurs du même variant et que celui-ci est décrit pathogène par les études fonctionnelles, il serait alors intéressant d'investiguer d'autres étiologies génétiques par la recherche de variants dans d'autres gènes. Cette situation est la plus fréquente dans le cadre de patients

atteints d'HPE avec un variant dans le gène *SHH* car, dans 70% des cas, le variant est hérité d'un parent pauci voire asymptomatique^{10,19}. Cette faible pénétrance est expliquée par l'oligogénisme : le variant de *SHH* seul ne suffit pas à expliquer l'ensemble des phénotypes observés, il est à l'origine de certains signes cliniques, mais la présence de variants dans d'autres gènes définit la survenue de formes plus sévères. Les études fonctionnelles permettent donc d'évaluer les conséquences des variants faux-sens de *SHH* sur la fonction protéique afin d'aider à la détermination de leur éventuelle pathogénicité.

III.3. Biais de l'étude : évolution des techniques de biologie moléculaire

Les limites de notre étude reposent principalement sur les données manquantes notamment phénotypiques, mais également sur l'absence d'homogénéité dans les examens génétiques réalisés chez les patients. Ce dernier biais est indépendant de nos pratiques. En effet, la base de données HPE a été créée en 1996 et les techniques de recherches d'altérations génétiques n'étaient pas aussi performantes qu'aujourd'hui et ont considérablement évoluées¹⁰ (Figure 16).

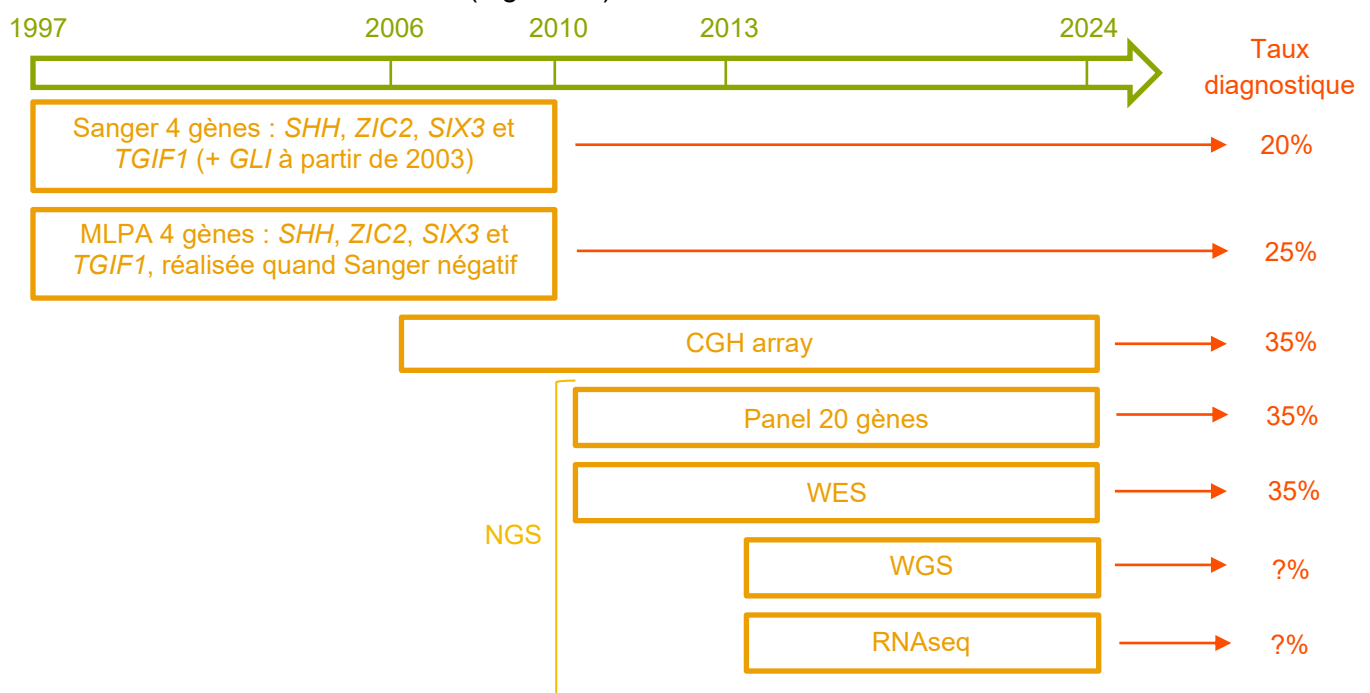


Figure 16 : Evolution des techniques et des taux diagnostiques au cours du temps.

Les premiers examens génétiques réalisés chez les patients atteints d'HPE reposaient sur : le séquençage par Sanger, adapté pour étudier peu de gènes car elle est longue et coûteuse si on souhaite étudier de nombreux gènes ; et la MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), détectant les délétions/duplications des gènes d'intérêt. Ils ont permis la découverte des premières corrélations génotypes-phénotypes et notamment l'association des formes sévères d'HPE avec les gènes *SIX3* et *ZIC2* à la différence de *SHH*^{9,39}, mais également la pénétrance plus forte de *ZIC2* contrairement aux autres gènes retrouvés dans l'HPE¹⁰. Un diagnostic moléculaire a été obtenu chez 25% des patients avec HPE^{10,35,56}.

La CGH array (analyse par puce à ADN) s'est ensuite développée : c'est le premier examen pangénomique, il permet la détection des microdélétions/microduplications (Copy Number Variant, CNV) dans l'ensemble des chromosomes. Cet examen donne lieu à la découverte de

nouveaux gènes compris dans les CNV diagnostiqués. Pour illustrer ce fait, la délétion 6qter chez des patients avec HPE a mis en lumière l'implication de *DLL1*⁵² dans cette pathologie. Le taux diagnostique a été considérablement amélioré avec l'avènement de la CGH array, de 25 à 35%.

Le déploiement du NGS (séquençage à haut débit) est à l'origine de la création de panels de gènes, notamment le panel HPE contenant 20 gènes, mais également du WES (Whole Exome Sequencing), méthode de séquençage de l'ensemble des régions codantes du génome (soit les 20 000 gènes), afin d'être plus exhaustif dans la recherche de variants. Cependant, le taux diagnostique semble rester stable^{10,57}. Il existe plusieurs explications à ce constat. D'une part, la démocratisation du NGS dans de nombreux laboratoires de génétique a induit une diminution des envois d'ADN aux centres de référence. Ces laboratoires réalisent à présent un WES chez les patients atteints d'HPE et les situations simples, avec diagnostic moléculaire évident, ne sont donc pas recensées, à la différence des situations complexes sans variant retrouvé pour lesquelles un avis sera alors demandé aux centres référents. Ainsi, le diagnostic reste stable dans ces centres. D'autre part, aucune cohorte conséquente n'a, pour le moment, été publiée concernant l'apport du WES dans l'HPE. Une seule étude de 2018⁵⁸, portant sur 20 sujets de plus de 15 ans avec HPE quelque soit la forme, a étudié la contribution du WES en trio (parents et cas index) après réalisation d'un séquençage par Sanger des 4 gènes les plus fréquents d'HPE et d'une CGH array. Seuls les variants *de novo* ont été étudiés et aucun n'expliquait l'HPE. Toutefois, en raison du mode de transmission complexe de cette pathologie, des variants présents chez les parents peuvent être à l'origine de l'HPE de leur enfant quand ils sont transmis ensemble. Ce qui soulève une dernière explication à la stagnation du taux diagnostique : l'oligogénisme et la difficulté d'interprétation des variants retrouvés, pouvant chacun être à l'origine d'une partie du phénotype des cas index et expliquant certains signes cliniques chez les parents également.

Une autre méthode de NGS, le WGS (Whole Genome Sequencing), permet d'aller encore plus loin en analysant l'intégralité du génome (régions codantes et non-codantes). Le rendement diagnostique n'est pas encore connu. Néanmoins, les premières publications semblent mettre en évidence un apport de cet examen, avec notamment la découverte d'un variant dans *FGF8* au WGS après CGH array et WES négatifs dans une cohorte de 17 fœtus présentant des malformations diagnostiquées en anténatal, quelles qu'elles soient⁵⁹. Un second article, dans lequel un WGS a été réalisé en première intention chez 162 fœtus présentant des anomalies du SNC (dont 17 fœtus atteints d'HPE)⁶⁰, retrouve un taux diagnostique de 70% dans l'HPE toutes causes génétiques confondues (un SNV dans *GLI2*, un SNV dans *SIX3*, les autres causes étant des CNV et des triploïdies 13). Le WGS pourrait potentiellement, à terme, remplacer l'ensemble des techniques précédemment citées et permettrait donc un meilleur rendement diagnostique lorsqu'il est réalisé en première intention. Son coût élevé est actuellement pris en charge dans le cadre d'un plan de financement national, le PFMG (Plan France Médecine Génomique).

Il existe également le RNAseq (séquençage de l'ARN), une autre technique de NGS qui s'intéresse à l'analyse de l'ensemble des ARN transcrits du génome. Cette méthode apporte de nombreuses informations quant à l'expression des gènes, leurs modifications post-traductionnelles, et la détection de transcrits particuliers notamment⁶¹. Elle permet de comprendre les conséquences fonctionnelles de variants sur la transcription, expliquant la physiopathologie de certaines maladies et leur développement chez les patients. L'analyse du transcriptome par RNAseq chez le zebrafish a mis en lumière le rôle de *ZIC2* comme activateur d'*ALX1* dans la crête neurale périoculaire, *ALX1* étant un facteur de transcription essentiel

dans la morphogenèse crâniofaciale et oculaire chez l'Homme⁶². Son implication dans la découverte de variants a également été démontrée : un gain diagnostique de 35% a été mis en évidence dans une cohorte de patients atteints de troubles musculaires primaires dont l'étiologie génétique était inconnue après réalisation de WES ou WGS, et des variants classés VUS (de signification inconnue) ont pu être reclassés (que ce soit en variants pathogènes ou en variants non pathogènes) devant leur conséquence sur l'épissage⁶³. Actuellement, l'apport de RNAseq en termes de taux diagnostique dans l'HPE est inconnu car il n'est pas utilisé en pratique courante en génétique moléculaire. C'est une méthode en cours de développement qui va très probablement se démocratiser dans le futur de part la richesse des informations qu'elle apporte.

Pour conclure, les patients présents dans la base de données HPE avec un variant dans le gène *SHH* devraient tous bénéficier d'un WGS voire d'un RNAseq, particulièrement dans les situations de variabilité phénotypique intrafamiliale inexplicée, afin d'étudier un potentiel oligogénisme. Cependant, l'ADN est manquant ou insuffisant dans un grand nombre de cas. Un projet futur serait donc de réaliser ces examens chez les patients pour lesquels du matériel génétique subsiste, et de récupérer l'ADN si cela est possible pour les cas anciens.

De surcroît, il est nécessaire de poursuivre le recueil de patients atteints d'HPE afin d'agrandir notre cohorte. La base de données HPE est en cours de modifications pour améliorer l'exhaustivité du recueil des données cliniques. Il pourrait être envisagé d'inclure dans cette nouvelle base de données tous les patients diagnostiqués avec une HPE en France et même en Europe, indépendamment du lieu de réalisation des examens moléculaires. L'ensemble des techniques de NGS décrites précédemment devrait considérablement améliorer le diagnostic moléculaire de l'HPE et favoriser la découverte de nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie. Il serait donc intéressant de recenser l'ensemble des cas d'HPE en France depuis la généralisation du NGS, afin d'estimer le taux de diagnostic moléculaire actuel et de découvrir par conséquent l'apport des techniques récentes (WES, WGS, RNAseq). Des recommandations quant aux examens de génétique moléculaire à réaliser en cas d'HPE pourraient également en découler. En effet, ces travaux permettraient d'étudier l'oligogénisme plus en détails, de connaître sa proportion dans l'HPE et de mettre ainsi en lumière l'importance de l'utilisation d'une méthode de NGS pangénomique afin d'être exhaustif dans l'étude des variants à l'origine du phénotype clinique de la pathologie, le but étant d'apporter un conseil génétique complet aux familles de patients.

Références bibliographiques

1. Geng X, Oliver G. Pathogenesis of holoprosencephaly. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1403-13. doi: 10.1172/JCI38937. Epub 2009 Jun 1. PMID: 19487816; PMCID: PMC2689134.
2. Matsunaga E, Shiota K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology*. 1977 Dec;16(3):261-72. doi: 10.1002/tera.1420160304. PMID: 594909.
3. Odent S, Atti-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, Gall JY, Le Marec B, Munnich A, David V, Vekemans M. Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 1999 Sep;8(9):1683-9. doi: 10.1093/hmg/8.9.1683. PMID: 10441331.
4. Erich Roessler and Maximilian Muenke. Midline and laterality defects : left and right meet in the middle. Published 2001 John Wiley & Sons, Inc. *BioEssays* 23:888±900, 2001.
5. Artem Kim. Exploration de l'interaction entre variants rares et communs dans la susceptibilité génétique à holoprosencéphalie. Thèse de doctorat, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), UMR6290 CNRS, Université Rennes 1.
6. Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Feb 2;2:8. doi: 10.1186/1750-1172-2-8. PMID: 17274816; PMCID: PMC1802747.
7. Dubourg C, Carré W, Hamdi-Rozé H, Mouden C, Roume J, Abdelmajid B, Amram D, Baumann C, Chassaing N, Coubes C, Faivre-Olivier L, Ginglinger E, Gonzales M, Levy-Mozziconacci A, Lynch SA, Naudion S, Pasquier L, Poidvin A, Prieur F, Sarda P, Toutain A, Dupé V, Akloul L, Odent S, de Tayrac M, David V. Mutational Spectrum in Holoprosencephaly Shows That FGF is a New Major Signaling Pathway. *Hum Mutat*. 2016 Dec;37(12):1329-1339. doi: 10.1002/humu.23038. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27363716.
8. Kim A, Savary C, Dubourg C, Carré W, Mouden C, Hamdi-Rozé H, Guyodo H, Douce JL; FREX Consortium; GoNL Consortium; Pasquier L, Flori E, Gonzales M, Bénêteau C, Boute O, Attié-Bitach T, Roume J, Goujon L, Akloul L, Odent S, Watrin E, Dupé V, de Tayrac M, David V. Integrated clinical and omics approach to rare diseases: novel genes and oligogenic inheritance in holoprosencephaly. *Brain*. 2019 Jan 1;142(1):35-49. doi: 10.1093/brain/awy290. PMID: 30508070.
9. Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, Belleguic M, Ratié L, Pasquier L, Loget P, Bendavid C, Jaillard S, Rochard L, Quélin C, Dupé V, David V, Odent S. New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *J Med Genet*. 2011 Nov;48(11):752-60. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100339. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21940735; PMCID: PMC3386902.
10. Dubourg C, Kim A, Watrin E, de Tayrac M, Odent S, David V, Dupé V. Recent advances in understanding inheritance of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2018 Jun;178(2):258-269. doi: 10.1002/ajmg.c.31619. Epub 2018 May 22. PMID: 29785796.

11. Kim Artem et al. Synonymous variants in holoprosencephaly alter codon usage and impact the Sonic Hedgehog protein. *Brain* 2020 ; doi:10.1093/brain/awaa152.
12. Mouden C, Dubourg C, Carré W, Rose S, Quelin C, Akloul L, Hamdi-Rozé H, Viot G, Salhi H, Darnault P, Odent S, Dupé V, David V. Complex mode of inheritance in holoprosencephaly revealed by whole exome sequencing. *Clin Genet*. 2016 Jun;89(6):659-68. doi: 10.1111/cge.12722. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26748417.
13. Barr M Jr., Hanson JW, Currey K, Sharp S, Toriello H, Schmickel RD, Wilson GN: Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 1983, 102(4):565-568.
14. Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ: Risk factors for cytogenetically normal holoprosencephaly in California: a population-based case-control study. *Am J Med Genet* 2000, 90(4):320-325.
15. Sanders TA, Llagostera E, Barna M. Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature*. 2013 May 30;497(7451):628-32. doi: 10.1038/nature12157. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23624372; PMCID: PMC4197975.
16. Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP. Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2294–303.
17. Spassky N, Aguilar A. Cil primaire et développement cérébral [Shh regulates neurogenesis through primary cilia]. *Med Sci (Paris)*. 2008 Oct;24(10):790-1. French. doi: 10.1051/medsci/20082410790. PMID: 18950567.
18. Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development*. 2019 May 15;146(10):dev166892. doi: 10.1242/dev.166892. PMID: 31092502; PMCID: PMC6550017.
19. Lavillaureix A, Rollier P, Kim A, Panasenkava V, De Tayrac M, Carré W, Guyodo H, Faoucher M, Poirel E, Akloul L, Quélin C, Whalen S, Bos J, Broekema M, van Hagen JM, Grand K, Allen-Sharp M, Magness E, McLean SD, Kayserili H, Altunoglu U, En Qi Chong A, Xue S, Jeanne M, Almontashiri N, Habhab W, Vanlerberghe C, Faivre L, Viora-Dupont E, Philippe C, Safrau H, Laffargue F, Mittendorf L, Abou Jamra R, Patil SJ, Dalal A, Sarma AS, Keren B, Reversade B, Dubourg C, Odent S, Dupé V. DISP1 deficiency: Monoallelic and biallelic variants cause a spectrum of midline craniofacial malformations. *Genet Med*. 2024 Mar 24;26(7):101126. doi: 10.1016/j.gim.2024.101126. Epub ahead of print. PMID: 38529886.
20. Mafi A, Purohit R, Vielmas E, Lauinger AR, Lam B, Cheng YS, Zhang T, Huang Y, Kim SK, Goddard WA 3rd, Ondrus AE. Hedgehog proteins create a dynamic cholesterol interface. *PLoS One*. 2021 Feb 25;16(2):e0246814. doi: 10.1371/journal.pone.0246814. PMID: 33630857; PMCID: PMC7906309.
21. Buglino JA, Resh MD. Hhat is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem*. 2008 Aug 8;283(32):22076-88. doi: 10.1074/jbc.M803901200. Epub 2008 Jun 4. PMID: 18534984; PMCID: PMC2494920.
22. Hehr U, Pineda-Alvarez DE, Uyanik G, Hu P, Zhou N, Hehr A, Schell-Apacik C, Altus C, Daumer-Haas C, Meiner A, Steuernagel P, Roessler E, Winkler J, Muenke M. Heterozygous mutations in SIX3 and SHH are associated with schizencephaly and further expand the clinical spectrum of holoprosencephaly. *Hum Genet*. 2010 Mar;127(5):555-61.

doi: 10.1007/s00439-010-0797-4. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20157829; PMCID: PMC4101187.

23. Silvia Cr, Wilma & Sen, Debalina & Pinnelli, Venkata & A, Priyanka. (2021). Cognizance of stem cells: A gist. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research*. 8. 1-8. 10.18231/j.ijcbr.2021.001.
24. Zhang Y, Alvarez-Bolado G. Differential developmental strategies by Sonic hedgehog in thalamus and hypothalamus. *J Chem Neuroanat*. 2016 Sep;75(Pt A):20-7. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.11.008. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26686294.
25. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 1996 Oct 3;383(6599):407-13. doi: 10.1038/383407a0. PMID: 8837770.
26. S. Watson et al. Voie de signalisation Sonic Hedgehog : du développement embryonnaire aux thérapies moléculaires ciblées. *Bull Cancer* vol. 97, N° 12, 12/2010. doi: 10.1684/bdc.2010.1231.
27. Fuccillo M, Joyner AL, Fishell G. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 772–83.
28. Simonis N, Migeotte I, Lambert N, Perazzolo C, de Silva DC, Dimitrov B, Heinrichs C, Janssens S, Kerr B, Mortier G, Van Vliet G, Lepage P, Casimir G, Abramowicz M, Smits G, Vilain C. FGFR1 mutations cause Hartsfield syndrome, the unique association of holoprosencephaly and ectrodactyly. *J Med Genet*. 2013 Sep;50(9):585-92. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101603. Epub 2013 Jun 28. PMID: 23812909; PMCID: PMC3756455.
29. Sanders TA, Llagostera E, Barna M. Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature*. 2013 May 30;497(7451):628-32. doi: 10.1038/nature12157. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23624372; PMCID: PMC4197975.
30. Luz M, Spannli-Müller S, Özhan G, Kagermeier-Schenk B, Rhinn M, Weidinger G, Brand M. Dynamic association with donor cell filopodia and lipid-modification are essential features of Wnt8a during patterning of the zebrafish neuroectoderm. *PLoS One*. 2014 Jan 10;9(1):e84922. doi: 10.1371/journal.pone.0084922. PMID: 24427298; PMCID: PMC3888416.
31. Du L, Sohr A, Yan G, Roy S. Feedback regulation of cytoneme-mediated transport shapes a tissue-specific FGF morphogen gradient. *Elife*. 2018 Oct 17;7:e38137. doi: 10.7554/eLife.38137. PMID: 30328809; PMCID: PMC6224196.
32. Ericson J, Muhr J, Placzek M, Lints T, Jessell TM, Edlund T. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell*. 1995 Jun [32]2;81(5):747-56. doi: 10.1016/0092-8674(95)90536-7. Erratum in: *Cell* 1995 Jul 14;82(1):following 165. PMID: 7774016.
33. Rallu M, Corbin JG, Fishell G. Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Dec;3(12):943-51. doi: 10.1038/nrn989. PMID: 12461551.
34. Nanni L, Ming JE, Du Y, Hall RK, Aldred M, Bankier A, Muenke M. SHH mutation is associated with solitary median maxillary central incisor: a study of 13 patients and review of the literature. *Am J Med Genet*. 2001 Jul 22;102(1):1-10. doi: 10.1002/1096-8628(20010722)102:1<1::aid-ajmg1336>3.0.co;2-u. PMID: 11471164.

35. Solomon BD, Bear KA, Wyllie A, Keaton AA, Dubourg C, David V, Mercier S, Odent S, Hehr U, Paulussen A, Clegg NJ, Delgado MR, Bale SJ, Lacbawan F, Ardinger HH, Aylsworth AS, Bhengu NL, Braddock S, Brookhyser K, Burton B, Gaspar H, Grix A, Horovitz D, Kanetzke E, Kayserili H, Lev D, Nikkel SM, Norton M, Roberts R, Saal H, Schaefer GB, Schneider A, Smith EK, Sowry E, Spence MA, Shalev SA, Steiner CE, Thompson EM, Winder TL, Balog JZ, Hadley DW, Zhou N, Pineda-Alvarez DE, Roessler E, Muenke M. Genotypic and phenotypic analysis of 396 individuals with mutations in Sonic Hedgehog. *J Med Genet.* 2012 Jul;49(7):473-9. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101008. PMID: 22791840.
36. de Castro VF, Mattos D, de Carvalho FM, Cavalcanti DP, Duenas-Roque MM, Llerena J Jr, Cosentino VR, Honjo RS, Leite JCL, Sanseverino MT, de Souza MPA, Bernardi P, Bolognese AM, Santana da Silva LC, Barbero P, Correia PS, Bueno LSM, Savastano CP, Orioli IM. New SHH and Known SIX3 Variants in a Series of Latin American Patients with Holoprosencephaly. *Mol Syndromol.* 2021 Jul;12(4):219-233. doi: 10.1159/000515044. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34421500; PMCID: PMC8339482.
37. Roessler E., Belloni E., Gaudenz K. et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14, 357–360 (1996). <https://doi.org/10.1038/ng1196-357>
38. Gurrieri F, Trask BJ, van den Engh G, Krauss CM, Schinzel A, Pettenati MJ, Schindler D, Dietz-Band J, Vergnaud G, Scherer SW, et al. Physical mapping of the holoprosencephaly critical region on chromosome 7q36. *Nat Genet.* 1993 Mar;3(3):247-51. doi: 10.1038/ng0393-247. PMID: 8485580.
39. Paulussen AD, Schrandt-Stumpel CT, Tserpelis DC, Spee MK, Stegmann AP, Mancini GM, Brooks AS, Collée M, Maat-Kievit A, Simon ME, van Bever Y, Stolte-Dijkstra I, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, van Essen AJ, Lichtenbelt KD, van Haeringen A, Kwee ML, Lachmeijer AM, Tan-Sindhunata GM, van Maarle MC, Arens YH, Smeets EE, de Die-Smulders CE, Engelen JJ, Smeets HJ, Herbergs J. The unfolding clinical spectrum of holoprosencephaly due to mutations in SHH, ZIC2, SIX3 and TGIF genes. *Eur J Hum Genet.* 2010 Sep;18(9):999-1005. doi: 10.1038/ejhg.2010.70. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20531442; PMCID: PMC2987413.
40. Wannasilp N, Solomon BD, Warren-Mora N, Clegg NJ, Delgado MR, Lacbawan F, Hu P, Winder TL, Roessler E, Muenke M. Holoprosencephaly in a family segregating novel variants in ZIC2 and GLI2. *Am J Med Genet A.* 2011 Apr;155A(4):860-4. doi: 10.1002/ajmg.a.33903. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21416594.
41. Lynch SA, Bond PM, Copp AJ, Kirwan WO, Nour S, Balling R, Mariman E, Burn J, Strachan T. A gene for autosomal dominant sacral agenesis maps to the holoprosencephaly region at 7q36. *Nat Genet.* 1995 Sep;11(1):93-5. doi: 10.1038/ng0995-93. PMID: 7550324.
42. Lacbawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domené S, Vélez JI, Zhou N, Hadley D, Balog JZ, Long R, Fryer A, Smith W, Omar S, McLean SD, Clarkson K, Lichty A, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E, Stashinko E, Potocki L, Vanallen MI, Clayton-Smith J, Donnai D, Bianchi DW, Juliusson PB, Njølstad PR, Brunner HG, Carey JC, Hehr U, Müsebeck J, Wieacker PF, Postra A, Hennekam RC, van den Boogaard MJ, van Haeringen A, Paulussen A, Herbergs J, Schrandt-Stumpel CT, Janecke AR, Chitayat D, Hahn J, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Dobyns WB, Muenke M. Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and

- function. *J Med Genet*. 2009 Jun;46(6):389-98. doi: 10.1136/jmg.2008.063818. Epub 2009 Apr 2. PMID: 19346217; PMCID: PMC3510661.
43. Mallick S, Panda SS, Ray R, Shukla R, Kabra M, Agarwal R. Semilobar holoprosencephaly with 21q22 deletion: an autopsy report. *BMJ Case Rep*. 2014 Mar 13;2014:bcr2014203597. doi: 10.1136/bcr-2014-203597. PMID: 24626384; PMCID: PMC3962924.
 44. Revest JM, Spencer-Dene B, Kerr K, De Moerlooze L, Rosewell I, Dickson C. Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol*. 2001 Mar 1;231(1):47-62. doi: 10.1006/dbio.2000.0144. PMID: 11180951.
 45. Guyodo H, Rizzo A, Diab F, Noury F, Mironov S, de Tayrac M, David V, Odent S, Dubourg C, Dupé V. Impact of Sonic Hedgehog-dependent sphenoid bone defect on craniofacial growth. *Clin Exp Dent Res*. 2024 Apr;10(2):e861. doi: 10.1002/cre2.861. PMID: 38558491; PMCID: PMC10982674.
 46. Barratt KS, Arkell RM. ZIC2 in Holoprosencephaly. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1046:269-299. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_14. PMID: 29442327.
 47. Garcia Rodriguez R, Garcia Cruz L, Novoa Medina Y, Garcia Delgado R, Perez Gonzalez J, Palma Milla C, Lopez Siles J, Medina Castellano M, Garcia Hernandez JA, Santana Rodriguez A. The solitary median maxillary central incisor (SMMCI) syndrome: Associations, prenatal diagnosis, and outcomes. *Prenat Diagn*. 2019 May;39(6):415-419. doi: 10.1002/pd.5451. Epub 2019 Apr 26. PMID: 30900264.
 48. Pavone P, Ruggieri M, Lombardo I, Sudi J, Biancheri R, Castellano-Chiodo D, Rossi A, Incorpora G, Nowak NJ, Christian SL, Pavone L, Dobyns WB. Microcephaly, sensorineural deafness and Currarino triad with duplication-deletion of distal 7q. *Eur J Pediatr*. 2010 Apr;169(4):475-81. doi: 10.1007/s00431-009-1061-6. Epub 2009 Oct 17. PMID: 19838731; PMCID: PMC2820683.
 49. Horn D, Tönnies H, Neitzel H, Wahl D, Hinkel GK, von Moers A, Bartsch O. Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36.3. *Am J Med Genet A*. 2004 Jul 1;128A(1):85-92. doi: 10.1002/ajmg.a.30031. PMID: 15211664.
 50. Wiel L, Venselaar H, Veltman JA, Vriend G, Gilissen C. Aggregation of population-based genetic variation over protein domain homologues and its potential use in genetic diagnostics. *Hum Mutat*. 2017 Nov;38(11):1454-1463. doi: 10.1002/humu.23313. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28815929; PMCID: PMC5656839.
 51. Traiffort E, Dubourg C, Faure H et al. Functional characterization of Sonic Hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *J Biol Chem* 2004; 279: 42889-42897.
 52. Dupé V, Rochard L, Mercier S, Le Pétillon Y, Gicquel I, Bendavid C, Bourrouillou G, Kini U, Thauvin-Robinet C, Bohan TP, Odent S, Dubourg C, David V. NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 2011 Mar 15;20(6):1122-31. doi: 10.1093/hmg/ddq556. Epub 2010 Dec 31. PMID: 21196490; PMCID: PMC3390777.
 53. Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, Arkell R, Stanier P, Copp AJ. Disruption of scribble (*Scrb1*) causes severe neural tube

- defects in the circletail mouse. *Hum Mol Genet.* 2003 Jan 15;12(2):87-98. doi: 10.1093/hmg/ddg014. PMID: 12499390.
54. Robinson A, Escuin S, Doudney K, Vekemans M, Stevenson RE, Greene ND, Copp AJ, Stanier P. Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis. *Hum Mutat.* 2012 Feb;33(2):440-7. doi: 10.1002/humu.21662. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22095531; PMCID: PMC4772123.
55. Hall TM, Porter JA, Young KE, Koonin EV, Beachy PA, Leahy DJ. Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins. *Cell.* 1997 Oct 3;91(1):85-97. doi: 10.1016/s0092-8674(01)80011-8. PMID: 9335337.
56. Roessler E, El-Jaick KB, Dubourg C, Vélez JI, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Lacbawan F, Zhou N, Ouspenskaia M, Paulussen A, Smeets HJ, Hehr U, Bendavid C, Bale S, Odent S, David V, Muenke M. The mutational spectrum of holoprosencephaly-associated changes within the SHH gene in humans predicts loss-of-function through either key structural alterations of the ligand or its altered synthesis. *Hum Mutat.* 2009 Oct;30(10):E921-35. doi: 10.1002/humu.21090. PMID: 19603532; PMCID: PMC2772877.
57. Hinreiner S, Wiczorek D, Mueller D, Roedl T, Thiel G, Grasshoff U, Chaoui R, Hehr U. Further evidence for complex inheritance of holoprosencephaly: Lessons learned from pre- and postnatal diagnostic testing in Germany. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2018 Jun;178(2):198-205. doi: 10.1002/ajmg.c.31625. PMID: 30182445.
58. Weiss K, Kruszka P, Guillen Sacoto MJ, Addissie YA, Hadley DW, Hadsall CK, Stokes B, Hu P, Roessler E, Solomon B, Wiggs E, Thurm A, Hufnagel RB, Zein WM, Hahn JS, Stashinko E, Levey E, Baldwin D, Clegg NJ, Delgado MR, Muenke M. In-depth investigations of adolescents and adults with holoprosencephaly identify unique characteristics. *Genet Med.* 2018 Jan;20(1):14-23. doi: 10.1038/gim.2017.68. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28640243; PMCID: PMC5763157.
59. Qi Q, Jiang Y, Zhou X, Lü Y, Xiao R, Bai J, Lou H, Sun W, Lian Y, Hao N, Li M, Chang J. Whole-genome sequencing analysis in fetal structural anomalies: novel phenotype-genotype discoveries. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2024 May;63(5):664-671. doi: 10.1002/uog.27517. Epub 2024 Apr 15. PMID: 37842862.
60. Yang Y, Zhao S, Sun G, Chen F, Zhang T, Song J, Yang W, Wang L, Zhan N, Yang X, Zhu X, Rao B, Yin Z, Zhou J, Yan H, Huang Y, Ye J, Huang H, Cheng C, Zhu S, Guo J, Xu X, Chen X. Genomic architecture of fetal central nervous system anomalies using whole-genome sequencing. *NPJ Genom Med.* 2022 May 13;7(1):31. doi: 10.1038/s41525-022-00301-4. PMID: 35562572; PMCID: PMC9106651.
61. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63. doi: 10.1038/nrg2484. PMID: 19015660; PMCID: PMC2949280.
62. Sedykh I, Yoon B, Roberson L, Moskvina O, Dewey CN, Grinblat Y. Zebrafish *zic2* controls formation of periocular neural crest and choroid fissure morphogenesis. *Dev Biol.* 2017 Sep 1;429(1):92-104. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.07.003. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28689736; PMCID: PMC5603172.
63. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, Bolduc V, Waddell LB, Sandaradura SA, O'Grady GL, Estrella E, Reddy HM, Zhao F, Weisburd B,

Karczewski KJ, O'Donnell-Luria AH, Birnbaum D, Sarkozy A, Hu Y, Gonorazky H, Claeys K, Joshi H, Bournazos A, Oates EC, Ghaoui R, Davis MR, Laing NG, Topf A; Genotype-Tissue Expression Consortium; Kang PB, Beggs AH, North KN, Straub V, Dowling JJ, Muntoni F, Clarke NF, Cooper ST, Bönnemann CG, MacArthur DG. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med*. 2017 Apr 19;9(386):eaal5209. doi: 10.1126/scitranslmed.aal5209. PMID: 28424332; PMCID: PMC5548421.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

Description d'une cohorte de patients atteints d'holoprosencéphalie avec des variants du gène *SHH* : focus sur les microformes

Contexte : L'holoprosencéphalie (HPE) est une maladie génétique congénitale caractérisée par un défaut de clivage des hémisphères cérébraux conduisant à des anomalies cérébrales et crâniot faciales, survenant très tôt au cours du développement embryonnaire. Il existe 5 types d'HPE : alobaire, semilobaire, lobaire, interhémisphérique moyen et microforme. Le gène *Sonic Hedgehog* (*SHH*) a été le 1^{er} identifié dans l'HPE, et c'est le plus souvent associé à des variants génétiques. Il code un morphogène qui crée un gradient de concentration le long du tube neural pour permettre sa ventralisation. **Méthodes :** Cet article présente une cohorte de 77 cas index atteints d'HPE et de 96 apparentés porteurs d'un variant de *SHH*. Les données ont été collectées à partir de la base de données HPE qui répertorie les patients souffrant d'HPE en Europe pour lesquels un avis a été demandé à Rennes. 60 variants différents ont été rapportés. Les termes HPO ont été utilisés pour décrire les phénotypes des patients. **Résultats :** 47,4 % présentaient des microformes d'HPE. Les anomalies cérébrales autres que l'HPE étaient plus fréquentes dans les formes sévères que dans les microformes. Il en est de même pour les malformations des orbites, du nez, des oreilles, les fentes labio-palatines et les anomalies surrénaliennes. À l'inverse, les malformations dentaires et les anomalies des fosses nasales étaient plus fréquentes dans les microformes que dans les formes sévères. Une région de la séquence protéique intermédiaire est dépourvue de variants pathogènes. L'oligogénisme explique en partie la variabilité phénotypique pour un même variant et les difficultés à trouver des corrélations génotype-phénotype en ne s'intéressant qu'aux variants de *SHH*.

Mots-clés : Holoprosencéphalie, *SHH*, microformes, malformations d'organes, malformations crâniot faciales, génotype, oligogénisme

Description of cohort of holoprosencephaly cases with variants in the *SHH* gene: focus on microforms

Background: Holoprosencephaly (HPE) is a congenital genetic disease characterized by a cleavage defect of the cerebral hemispheres leading to cerebral and craniofacial abnormalities, which occur very early during embryonic development of the brain. There are 5 types of HPE: alobar, semilobar, lobar, middle interhemispheric and microform. The *Sonic Hedgehog* gene (*SHH*) was the first identified in relation to HPE and the one most commonly associated with genetic variants. This gene codes a morphogen that creates a concentration gradient along the neural tube to allow its ventralization. **Methods:** This report presents a cohort of 77 probands with HPE and 96 relatives with a variant in the *SHH* gene. The data were collected from the HPE database which lists patients suffering from HPE in Europe for which advice has been requested in Rennes. 60 different variants have been reported. HPO terms have been used to describe phenotypes of patients. **Results:** 47.4% exhibited microforms of HPE. Brain anomalies other than typical HPE were more frequent in severe forms of HPE than in microforms. The same is true for malformations of the orbits, nose, ears, the clefts and adrenal abnormalities. Conversely, dental malformations and nasal cavity abnormalities were more frequent in microforms than in severe forms of HPE. Moreover, one region in the intermediate protein sequence appears to be devoid of pathogenic variants. Oligogenism partly explains the phenotypic variability for the same variant and the difficulties in finding genotype-phenotype correlations by looking only at variants in the *SHH* gene.

Keywords: Holoprosencephaly, *SHH*, microforms, organs malformations, craniofacial malformations, genotype, oligogenism

