



**HAL**  
open science

# Hétérotaxie : quand Tout-De-Travers et autres gènes perturbent la cardiogénèse : de l'homme à la souris

Anne Moreau de Bellaing

► **To cite this version:**

Anne Moreau de Bellaing. Hétérotaxie : quand Tout-De-Travers et autres gènes perturbent la cardiogénèse : de l'homme à la souris. Génétique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1346 . tel-04033255

**HAL Id: tel-04033255**

**<https://theses.hal.science/tel-04033255>**

Submitted on 17 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT :  
2020LYSE1346

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205  
(Interdisciplinaire Sciences-Santé)**

**Spécialité de doctorat** : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 16/12/2020, par :  
**Anne MOREAU de BELLAING**

---

**Hétérotaxie : quand *Tout-De-Travers* et autres gènes perturbent la cardiogénèse - De l'homme à la souris**

---

Devant le jury composé de :

Pr Sylvie DI FILIPPO, UCBL

Présidente

Pr Gregor ANDELFINGER, Université de Montréal  
Dr Stéphane ZAFFRAN, INSERM  
Pr Tania ATTIE-BITACH, Université de Paris  
Dr Sigolène MEILHAC, Institut Pasteur

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinatrice

Dr Gabriel BIDAUX, UCBL  
Pr Damien SANLAVILLE, UCBL

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse

N°d'ordre NNT : xxx



## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205  
(Interdisciplinaire Sciences-Santé)**

**Spécialité de doctorat** : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 16/12/2020, par :  
**Anne MOREAU de BELLAING**

---

**Hétérotaxie : quand *Tout-De-Travers* et autres gènes perturbent la cardiogénèse - De l'homme à la souris**

---

Devant le jury composé de :

Pr Sylvie DI FILIPPO, UCBL

Présidente

Pr Gregor ANDELFINGER, Université de Montréal

Rapporteur

Dr Stéphane ZAFFRAN, INSERM

Rapporteur

Pr Tania ATTIE-BITACH, Université de Paris

Examinatrice

Dr Sigolène MEILHAC, Institut Pasteur

Examinatrice

Dr Gabriel BIDAUX, UCBL

Directeur de thèse

Pr Damien SANLAVILLE, UCBL

Co-directeur de thèse

## **Université Claude Bernard – LYON 1**

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### **COMPOSANTES SANTE**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

## RESUME

Hétérotaxie : quand *Tout-De-Travers* et autres gènes perturbent la cardiogénèse – De l’homme à la souris.

Les malformations cardiaques sont des anomalies congénitales fréquentes puisqu’elles concernent 1 naissance sur 100. Dans la majorité des cas, surtout lorsque la cardiopathie est isolée, l’étiologie reste inconnue. Elles peuvent aussi s’intégrer dans un contexte malformatif plus complexe, notamment dans le cadre des anomalies de latéralisation gauche-droite, ou hétérotaxies. L’objectif de ce travail était d’identifier de nouveaux gènes dont les mutations sont responsables de cardiopathies congénitales et/ou d’hétérotaxie et aussi de mieux comprendre la morphogénèse du cœur. Grâce à une stratégie de séquençage exomique au sein de cohortes de patients présentant la même anomalie cardiaque ou au sein de familles avec récurrence de cardiopathies congénitales, nous avons pu mettre en évidence plusieurs gènes qui ont ensuite été confirmés sur le plan fonctionnel lors d’analyses cellulaires et de modèles animaux. Nous avons ainsi étudié le rôle de MEGF8, une protéine transmembranaire et de MGRN1, une ligase E3 de la superfamille RING, qui interagissent à la surface de cellules cibles pour réguler la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh). Les souris mutées double hétérozygotes pour les gènes *Megf8* et *Mgrn1* expriment des anomalies de latéralité gauche-droite avec malformations cardiaques associées en rapport avec une activité intracellulaire augmentée du signal Shh induite par l’absence de dégradation de l’un de ses substrats, Smoothened (Smo). D’autres travaux nous ont permis d’identifier la métalloprotéase « TOUT-DE-TRAVERS » (TDT) qui est spécifiquement exprimée dans le nœud embryonnaire cilié de plusieurs espèces et dont des mutations perte de fonction sont retrouvées chez plusieurs dizaines de patients avec anomalies du *situs* et cardiopathies congénitales. Tout comme pour la métalloprotéinase MMP21 identifiée quelques années plus tôt, des modèles de poisson-zèbres ont confirmé une randomisation de l’établissement de la latéralisation gauche-droite et du looping cardiaque en cas d’inactivation par knock-out de *Tdt*. Enfin, nous avons travaillé sur deux modèles plus fréquents de malformations cardiaques dans la population générale que sont la bicuspidie aortique et la communication interauriculaire (CIA). La délétion du cluster de gènes PCDHA identifiée dans 8% de la population caucasienne semble être reliée au continuum phénotypique des obstructions du cœur gauche, allant de la plus fréquente et banale qu’est la bicuspidie aortique aux plus complexes que sont les hypoplasies du ventricule gauche. Ceci suggère le rôle probable de variants modulateurs plus rares. Lors de l’analyse d’une vaste famille avec récurrence de CIA, nous avons également constaté que la mutation très conservée mais très délétère du gène *TPMI* était partiellement compensée par une mutation co-héritée de *TLN2* codant pour une autre protéine sarcomérique impliquée dans les filaments d’actine des myocytes.

La plupart de ces travaux révèle ainsi que des interactions génétiques modulent souvent l’intensité du signal des morphogènes identifiés et que des transmissions oligogéniques sont probablement le mécanisme de nombreuses malformations cardiaques et/ou anomalies de latéralité. Ces travaux ouvrent également de nouvelles perspectives dans la compréhension des multiples voies de signalisation qui sous-tendent la mise en place de l’asymétrie gauche-droite chez les vertébrés ainsi que la formation des cardiopathies congénitales. Nous abordons également le rôle de probables mutations « protectrices » participant à la modulation des phénotypes cliniques.

Laboratoire CarMeN, INSERM U1060, Université Lyon 1, 59 bd Pinel, 69500 BRON

Mot-clés : génétique, cardiopathie congénitale, latéralité gauche-droite, hétérotaxie, voie Sonic Hedgehog, voie Nodal.

## SUMMARY

Heterotaxy: when *Tout-De-Travers* and other genes disturb heart development - From human to mouse.

The etiology of congenital heart defects (CHDs), amongst the most common human birth defects, is poorly understood partly because of its complex genetic architecture. CHD can also be part of laterality defects spectrum such as heterotaxy. The purpose of this work was to identify genes whose mutations are responsible for CHD, and also to better understand cardiac morphogenesis. Thanks to a whole exome sequencing strategy into cohorts or families of patients showing the same cardiac malformation, we identified several genes. Their roles were confirmed during cellular analysis and using animal models. We studied MEGF8, a single-pass transmembrane protein and MGRN1, a RING superfamily E3 ligase, that interact genetically and biochemically to regulate the strength of Hedgehog signaling in target cells. Double heterozygous mice (loss-of-function for *Megf8* and *Mgrn1*) exhibited an incompletely penetrant syndrome of CHDs with heterotaxy related with an elevated abundance of the Sonic Hedgehog transducer Smoothed (Smo).

Other studies identified a novel metalloproteinase, TOUT-DE-TRAVERS (TDT), which is specifically expressed in ciliated left-right organizers (LROs). Using CRISPR/Cas9 genome-editing in zebrafish and *Xenopus*, we demonstrated that TDT is solely required on the left side of the LRO to control organ laterality. Functional tests and epistasis experiments suggested that, together with another protease MMP21, they constitute a proteolytic cascade during the early laterality establishment. We could identify 21 human patients with loss-of-function *TDT* mutations segregating recessive situs anomalies with CHD.

At the end of this project, we focused on two more frequent CHD: atrial septal defect (ASD) and bicuspid aortic valve. We showed an embryonic lethal mutation in sarcomeric actin-binding protein TPM1 can cause heritable heart defect, atrial septal defect (ASD), when buffered by mutation in TLN2, another myofilament actin-binding protein. Together they account for the digenic etiology of heart defect in 8 members of a family spanning 5 generations. Otherwise, common deletion copy number variants (delCNV) in the PCDHA gene cluster (frequency 8% in whites) are linked to left ventricular outflow tract obstructions including coarctation of the aorta and hypoplastic left heart syndrome. Our findings suggest epigenetic modifications leading to incomplete penetrance.

Overall, these studies contribute to the elucidation of biological mechanisms of embryonic cardiac development and left-right determination. They open new perspectives about molecular patterning underlying CHD.

Key-words: genetics, congenital heart disease, left-right laterality, heterotaxy, Sonic Hedgehog pathway, Nodal pathway.

## REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Sylvie DI FILIPPO de me faire à nouveau l'honneur de juger mon travail en présidant ce jury de thèse.

Je remercie le professeur Gregor ANDELFINGER d'avoir bien voulu évaluer depuis l'autre côté de l'Atlantique l'ensemble de mes travaux scientifiques avec toute son expertise cardiopédiatrique et génétique qui lui est internationalement reconnue.

Je remercie le professeur Isabelle MAYSTADT d'avoir accepté de prendre du temps pour rapporter ce travail depuis la Belgique. Son regard de clinicienne généticienne est indispensable pour estimer l'impact de ce travail au sein des familles de patients.

Je remercie le docteur Stéphane ZAFFRAN d'apporter son jugement sur le travail d'une jeune cardiopédiatre qui a tenté de démêler les ficelles de la biologie moléculaire.

Je remercie le professeur Tania ATTIE-BITACH d'avoir répondu présente pour estimer ce manuscrit malgré les nombreux engagements qu'on lui connaît dans le monde médical et scientifique.

Je remercie le docteur Sigolène MEILHAC, experte intarissable de la cardiogénèse à tous ses stades et chez de nombreux modèles, de participer au jury de cette thèse.

Je remercie le docteur Gabriel BIDAUX d'avoir bien voulu accepter la délicate mission de directeur de thèse à quelques mois de sa soutenance. La qualité de son soutien dans ce défi fou est bien inversement proportionnelle au nombre de semaines depuis lesquelles nous nous connaissons.

Je remercie le professeur Damien SANLAVILLE qui depuis 5 ans est resté fidèle et d'un appui sans faille pour l'aboutissement de cette thèse de science. Ses conseils furent précieux et ses encouragements toujours arrivés à point nommé.

Je souhaite remercier particulièrement tous les membres de ce jury qui ont répondu favorablement pour participer à ce projet malgré les conditions atypiques de l'année 2020 qui ne permettront notamment pas de se réunir physiquement pour cette étape importante de mon cursus scientifique.

Un grand merci à tous ceux qui de prêt ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce projet de thèse et globalement à la construction de mon parcours de jeune chercheur. Je pense en particulier au Dr Patrice BOUVAGNET et toute son équipe (Brigitte, Rajae, Christophe) qui les premiers m'ont ouvert les portes d'un laboratoire et appris les bases de la génétique moléculaire à l'occasion de mon Master 2. Je pense ensuite au Dr Cecilia LO à Pittsburgh qui a fait plus qu'accueillir une petite « PhD student » française pendant un an. Nos relations amicales et nos collaborations cardiogénétiques ne sont pas près de s'arrêter. Je la remercie aussi pour toutes ces belles rencontres faites dans son laboratoire melting-pot et en particulier à Pol.

Enfin, je remercie tous mes fidèles et précieux amis, à Ayman, d'être simplement toujours là et de ne jamais cesser de croire en moi quels que soient les temps et les lieux. L'aboutissement de cette thèse, ils y ont cru avant moi...

Et bien sûr le dernier et toujours le plus profond sincère de mes remerciements pour cette thèse au carré ne peut aller que pour NOPA, ici ailleurs, hier aujourd'hui et demain. Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ce que je ressens mais ils le savent au-delà de ces lignes.

*Je dédicace cette thèse à Serge dont le courage et la pugnacité contre la maladie m'ont été moteur ces derniers mois pour aller jusqu'au bout de ce projet dantesque malgré les nombreux moments de découragement. Ils m'ont rappelé que notre travail de médecin ne peut s'arrêter aux portes de l'hôpital et que chercher pour comprendre et mieux soigner doit faire partie aussi de notre engagement.*

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	3
SUMMARY .....	4
REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS – FIGURES .....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS – TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS .....	11
CHAPITRE I : INTRODUCTION .....	13
I. Latéralisation Gauche-Droite : rupture de symétrie et cascade moléculaire.....	14
A. Nature et symétrie.....	14
B. De la symétrie vers l'asymétrie .....	15
C. Rôle du cil dans la mise en place de l'asymétrie Gauche-Droite .....	19
D. Voies de signalisation.....	21
II. Anomalies de latéralisation Gauche-Droite et hétérotaxie .....	23
III. Anomalies de latéralisation Gauche-Droite et malformations cardiaques .....	27
A. Cardiogénèse précoce et développement cardiaque.....	27
B. Épidémiologie des malformations cardiaques.....	30
C. Étiologies des cardiopathies congénitales.....	31
D. Malformations cardiaques et anomalies de latéralisation Gauche-Droite .....	33
IV. Transposition des gros vaisseaux et Double discordance .....	38
V. Objectifs et déroulement de la thèse.....	65
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	66
CHAPITRE III : RESULTAT 1 .....	72
I. Présentation de l'article 1.....	73
II. Article 1 .....	74
CHAPITRE IV : RESULTAT 2 .....	106
I. Présentation de l'article 2.....	107
II. Article 2 .....	108
CHAPITRE VI : RESULTATS-AUTRES ARTICLES .....	111
I. Présentation des autres articles.....	112
II. Autres articles.....	113

<b>CHAPITRE VII : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>115</b>
<b>CHAPITRE VIII : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXE 1 : .....</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXE 2 : .....</b>	<b>137</b>
<b>ANNEXE 3 : .....</b>	<b>149</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS – FIGURES

<b>Figure 1</b> : Exemples d'asymétrie gauche-droite dans la nature.....	14
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique des 4 principales étapes de la latéralisation G-D .....	18
<b>Figure 3</b> : Expression asymétrique de Nodal, Lefty 1 et 2, Pitx2.....	19
<b>Figure 4</b> : Structures des deux types de cils de l'organisme .....	20
<b>Figure 5</b> : Cascade de signalisation Nodal dans le mésoderme latéral gauche.....	22
<b>Figure 6</b> : Anatomie du situs bronchique .....	24
<b>Figure 7</b> : Organisation des viscères dans les différents types de situs et en cas d'hétérotaxie .....	25
<b>Figure 8</b> : Détermination de la latéralisation G-D en cas d'hétérotaxie .....	26
<b>Figure 9</b> : Étapes du développement cardiaque aboutissant à la septation cardiaque .....	28
<b>Figure 10</b> : Implication des différents champs cardiaques au cours du développement cardiaque.....	29
<b>Figure 11</b> : Principaux gènes impliqués dans la morphogénèse des différentes régions du cœur .....	30
<b>Figure 12</b> : Proportion de patients avec étiologie génétique identifiée .....	33
<b>Figure 13</b> : Gènes impliqués dans les MCC chez la souris .....	37
<b>Figure 14</b> : Schémas de la transposition des gros vaisseaux et de la double discordance .....	38
<b>Figure 15</b> : Principales étapes du séquençage haut débit .....	69
<b>Figure 16</b> : Workflow du travail de bioinformatique post-WES.....	69
<b>Figure 17</b> : Etapes de filtration des variants obtenus après séquençage exomique .....	69
<b>Figure 18</b> : Synthèse schématique de la méthodologie de la thèse .....	71

## TABLE DES ILLUSTRATIONS – TABLEAUX

**Tableau 1** : Principales malformations cardiaques en cas d'isomérisme droit ou gauche ..... 35

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACPA :	analyse chromosomique sur puce à ADN (CGH array en anglais)
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
BMP :	bone morphogenetic protein
CC :	cardiopathie congénitale
CIA :	communication interauriculaire
CNV :	copy number variations
dbSNP :	single nucleotide polymorphism database
DCP :	dyskinésie ciliaire primitive
DD :	double discordance
EGF-CFC :	epidermal growth factor–Cripto/FRL-1/Cryptic
ENU :	N-ethyl-nitroso-urée
EVS :	exome variant server
FGF :	fibroblast growth factor
G-D :	gauche-droite
GDF1 :	growth differentiation factor 1
GWAS :	genome-wide association study
HGMD :	human gene mutation database
<i>Invs :</i>	<i>Inversine</i>
Kif3a, Kif3b :	kinesin family member 3a et 3b
KO :	knock-out
MCC :	malformation cardiaque congénitale
MEGF8 :	multiple epidermal growth factor-like domains 8
MGRN1 :	mahogunin ring finger 1
MMP21 :	matrix metallopeptidase 21
NE :	noeud embryonnaire
NGS :	next generation sequencing
NO :	monoxyde d’azote (nitric oxide en anglais)
OMIM :	online mendelian inheritance in man
<i>Pitx2 :</i>	<i>paired-like homeodomain transcription factor 2</i>
PCR :	polymerase chain reaction
RING :	really interesting new gene

SMO : smoothed  
TGF  $\beta$  : transforming growth factor beta  
TGV : transposition des gros vaisseaux  
WES : whole exome sequencing

# CHAPITRE I : INTRODUCTION

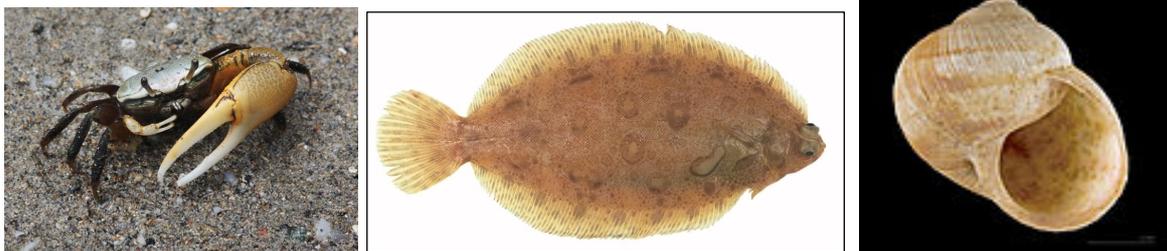
## I. Latéralisation Gauche-Droite : rupture de symétrie et cascade moléculaire

Les êtres humains, tout comme l'ensemble des vertébrés, expriment très précocement dans leur développement embryonnaire une **latéralisation gauche-droite** (G-D) de leur structure globale puis de la position de leurs organes internes.

### A. Nature et symétrie

Les **démonstrations d'asymétrie gauche-droite** sont abondantes dans la nature (Figure 1). Pour ne citer que quelques exemples, on retiendra le crabe violoniste avec une large et une petite pinces, la limande qui possède ses deux yeux du côté droit, ou encore les escargots dont la plupart des espèces sont « droitières » puisque quand on regarde leur coquille la pointe en haut, leur orifice se trouve à droite (Gittenberger 1988).

Chez les vertébrés, le corps est symétrique en apparence et l'asymétrie G-D est plus souvent cachée sous la peau impliquant plutôt la position des viscères et leur fonctionnement. Ainsi, les **organes impairs sont latéralisés**. Le cœur, par exemple, se développe selon un D-looping du tube cardiaque primitif puis va se latéraliser du côté gauche du thorax. En ce qui concerne les organes de la cavité abdominale, l'estomac, la rate et le pancréas sont situés à gauche tandis que le foie et la vésicule biliaire sont localisés à droite. Le cerveau, lui, exprime une asymétrie anatomique et fonctionnelle évidente. Les poumons droit et gauche, quant à eux, ne présentent pas le même nombre de divisions lobaires (le poumon droit est trilobé tandis que le poumon gauche est bilobé).



*Figure 1* : Exemples d'asymétrie gauche-droite dans la nature  
De gauche à droite : le crabe violoniste, la limande et l'escargot.

## B. De la symétrie vers l'asymétrie

Dans les premiers stades de son développement, l'embryon présente une parfaite symétrie de son organisation. L'axe G-D est le **dernier à se mettre en place** après les axes dorso-ventral et antéro-postérieur, au cours de la quatrième semaine du développement embryonnaire chez l'humain. Très rapidement après la gastrulation et la mise en place des trois feuilletts primitifs de l'embryon à partir de l'épiblaste (ectoderme, mésoderme et endoderme), l'initiation des premiers battements des cils primaires à la **surface du nœud embryonnaire (NE) primitif** (i.e. dépression au centre du renflement épiblastique à la limite antérieure de la ligne primitive) résulte en un flux orienté unidirectionnel de plusieurs molécules du fluide extraembryonnaire. Ces dernières vont alors principalement être exprimées dans le **mésoderme latéral situé du côté gauche** de l'embryon (Nonaka et al. 1998). Cette migration asymétrique est le début d'une longue cascade moléculaire et de plusieurs voies de signalisation qui participeront aux étapes ultérieures du développement de l'individu. Ces **voies de signalisation** seront notamment impliquées dans le développement et la latéralisation de plusieurs organes. Parmi elles, la voie ***Nodal-Pitx2*** contrôle la différenciation et la migration cellulaire dans différents tissus guidant ainsi l'asymétrie des organes en formation (organogénèse) à partir des trois feuilletts sous l'effet de signaux moléculaires et de processus d'induction. L'expression asymétrique de *Nodal* et *Pitx2* est très **fortement conservée** parmi les vertébrés et même de nombreux invertébrés (Namigai, Kenny, and Shimeld 2014).

La détermination de la latéralisation G-D chez la **souris**, de même que chez le poisson-zèbre, le xénope et le poulet, est bien connue désormais et représente un modèle pour l'ensemble des vertébrés. Elle s'établit dès le stade embryonnaire E7.5 (E pour embryonic day ou jour de développement) dans le **nœud primitif** (structure transitoire aussi appelée notochorde postérieure chez le lapin, vésicule de Kupffer chez le poisson-zèbre, nœud de Hensen chez le poulet (Gros et al. 2009), et organisateur de Spemann chez les amphibiens) en suivant **4 principales grandes étapes** (Figure 2). Nous nous concentrerons principalement sur les modèles rapportés dans la littérature chez la souris et chez l'Homme.

- 1/La rupture de la symétrie G-D est tout d'abord initiée par un **flux nodal vers la gauche** généré par un mouvement rotatoire (dans le sens des aiguilles d'une montre à une vitesse d'environ 600 tours par minute) des **cils primitifs vibratiles** présents à la surface des cellules du nœud primitif ventral embryonnaire (entre 200 et 300 cils sur le NE murin) (Nonaka et al. 2002; Hamada 2016). Ce **flux unidirectionnel coordonné** est créé grâce à la rotation des cils

mobiles dont l'axe est orienté postérieurement selon la direction caudale de l'embryon marquant un angle d'environ 30° (Nonaka et al. 2005). Cette inclinaison permet de générer un flux beaucoup plus efficace et est contrôlée par le système de polarité planaire impliquant notamment la **voie de signalisation canonique Wnt** et le cytosquelette d'actine. Elle implique aussi les protéines Dishevelled (Dvl), Vangl et Prickle (Yoshida and Hamada 2014). Le mouvement de rotation des cils serait induit, lui, entre autres, par l'activité du gène *Dnah5* (Nöthe-Menchen et al. 2019). **Plusieurs théories** s'affrontent concernant l'action de ce flux nodal sur la suite de la cascade d'évènements impliqués dans la perte de symétrie G-D et l'expression génique asymétrique. Le **modèle chémosensoriel** suggère que le flux liquidien nodal produit un gradient de particules (vésicules nodales) en rapport avec un transport spécifique à gauche. Ces vésicules contiendraient des **morphogènes** telles que les protéines Nodal et Hedgehog qui, une fois relarguées, activeraient des cascades de signalisation moléculaire dans les cellules périnodales de la gauche de l'embryon (Okada et al. 1999; Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005). **L'hypothèse mécanosensorielle** (modèle des 2 cils) soutient, elle, le rôle joué par le flux nodal dans l'apparition d'un **gradient de concentration de Calcium** au niveau des **cils primaires sensorielles** à l'apex des cellules périnodales de la gauche de l'embryon, responsable de l'activation de la cascade de signalisation Nodal dans ces cellules (McGrath et al. 2003; Norris 2012; Tabin and Vogan 2003). Ces cils à la périphérie du nœud primitif sont des mécano-senseurs qui entraînent l'ouverture de canaux calciques et donc un influx de calcium dans la cellule lorsqu'ils sont sollicités. Il a aussi été suggéré que le flux nodal exerce une **pression mécanique** sur la paroi latérale gauche du NE (Tabin and Vogan 2003). Quel que soit le mécanisme de transmission et de détection du signal du flux nodal, **la présence de cils nodaux et la création d'un flux** unidirectionnel sont indispensables pour rompre la symétrie G-D du stade précoce de la plaque neurale (Nonaka et al. 2002). Différents gènes vont, en réponse à ce flux, s'exprimer de façon asymétrique dans le NE au niveau des cellules périnodales (D>G ou G>D). C'est le cas par exemple du gène *Cer12* (D>G) chez la souris (Nakamura et al. 2012) (*DAND5* chez l'Homme) puis du gène *Nodal* (G>D) dont les expressions sont ensuite entretenues et amplifiées par des boucles de rétrocontrôle.

Il est intéressant de noter que chez certaines espèces dont le *Xenopus* et le poulet, il existe des manifestations encore plus précoces de l'asymétrie G-D avant même l'initiation du flux liquidien par les cils du NE (Spéder et al. 2007; Vandenberg and Levin 2013). C'est le cas de **l'ATPase $\alpha$  H+/K+** qui est exprimée asymétriquement dès le stade 2-cellules à quelques heures de la fécondation chez le *Xenopus* (Aw et al. 2010). D'autre part, chez certains vertébrés comme le poulet et le cochon, la structure organisatrice G-D n'est pas munie de cils et la rupture de

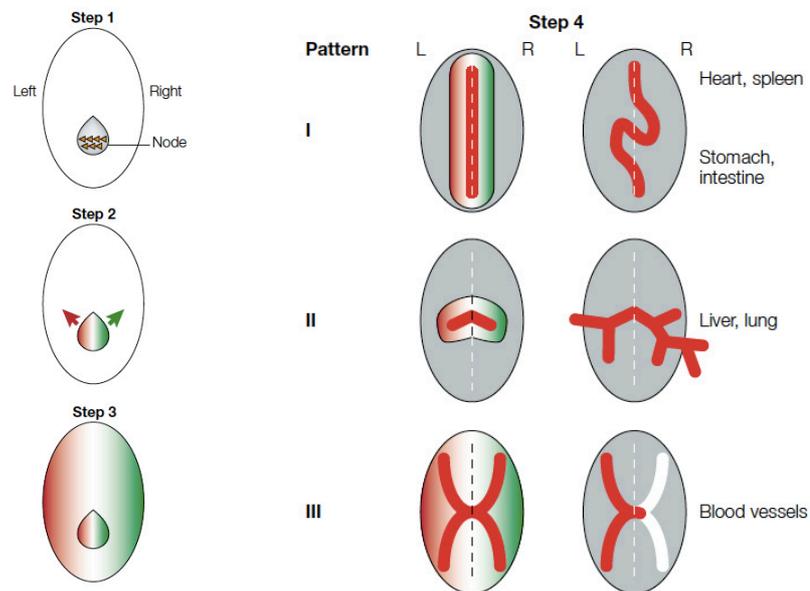
symétrie se fait donc par d'autres mécanismes (migration cellulaire asymétrique autour du nœud de Hensen,...).

- 2/Les signaux moléculaires d'asymétrie G-D détectés et générés au niveau des cellules périnodales gauche de l'embryon sont ensuite transmis jusqu'au **mésoderme latéral** de l'embryon par un mécanisme toujours inconnu à ce jour. Des modèles de **diffusion passive** ou via des processus d'endocytose ont été évoqués. Oki a lui suggéré un **transfert direct** de la protéine Nodal sécrétée au niveau du nœud primitif via des interactions avec les glycosaminoglycanes sulfatés localisés spécifiquement dans la membrane basale entre le nœud embryonnaire et la lame latérale gauche du mésoderme (Oki et al. 2007). L'absence d'expression de *Nodal* au niveau des cellules péri-nodales entraîne l'absence d'expression de *Nodal* au niveau de la lame latérale gauche du mésoderme (Saijoh et al. 2003). Son **activité est donc déterminante** pour l'asymétrie G-D.

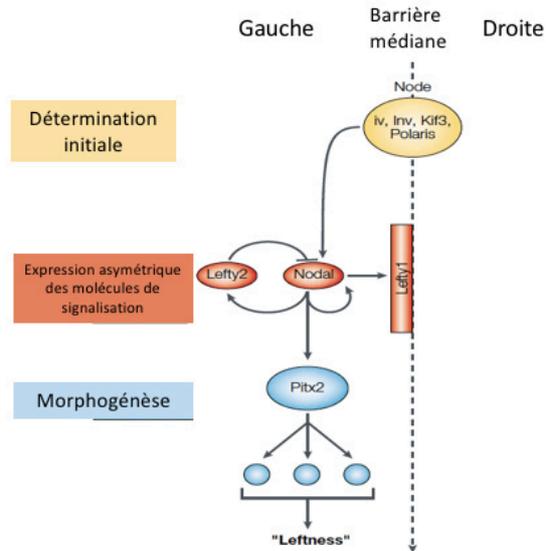
- 3/Les **molécules *Nodal* et *Lefty2*** de la superfamille des Transforming Growth Factors  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) sont exprimées de façon asymétrique de part et d'autre du mésoderme latéral (retrouvées uniquement du côté gauche) (Hamada et al. 2002) tandis ***Lefty1*** présente une expression prédominante au niveau de la ligne médiane (Figure 3). Des expériences d'inactivation de ce dernier chez la souris ont permis d'établir que le rôle de *Lefty1* était de réguler l'activité de *Nodal* et *Lefty2* en limitant leur expression exclusivement à la lame latérale gauche du mésoderme telle une « barrière médiane ». Ce système **d'auto-régulation** est très conservé entre les vertébrés (Nakamura and Hamada 2012). En cas d'inactivation de *Lefty1* (souris *Lefty1*<sup>-/-</sup>), les molécules *Nodal*, *Lefty2* et *Pitx2* (*paired-like homeodomain transcription factor 2*) sont alors exprimées symétriquement de part et d'autre du mésoderme (C. Meno et al. 1998). L'expression de *Lefty1* serait elle, entre autres, sous le contrôle de la **voie de signalisation Sonic Hedgehog** (Shh) (Tsukui et al. 1999) et sensible à la présence de l'acide rétinoïque. *Lefty2* est lui aussi un régulateur négatif de l'expression et de l'activité de *Nodal*. En son absence, Nodal est surexprimée et son activité fonctionnelle augmentée (Chikara Meno et al. 2001).

L'expression asymétrique de *Nodal* dans la partie exclusivement gauche de l'embryon est l'un des premiers signes moléculaires d'asymétrie G-D chez les vertébrés avant même le développement des organes (stade embryonnaire E8.5 chez la souris). La cascade moléculaire qui découle de Nodal est détaillée dans le paragraphe D.

- 4/La **morphogénèse des organes viscéraux** selon l'axe G-D est finalement médiée par l'**expression asymétrique de *Pitx2*** lors des stades embryonnaires tardifs en réponse à la cascade moléculaire Nodal. Tout comme *Nodal* et *Lefty*, ce facteur de transcription à homeobox de type bicoïd est exprimé de façon asymétrique mais persiste plus longtemps au cours de l'organogénèse dans les structures dérivant du mésoderme gauche (au moins jusqu'à E9.5 chez la souris) (Hamada et al. 2002). Son **isoforme *Pitx2c*** joue notamment un rôle dans l'asymétrie de la morphogénèse du cœur au sein du **second champ cardiaque** et des cellules de la **crête neurale** (C. Liu et al. 2002). L'expression de *Pitx2* est maintenue dans les organes primitifs développés à gauche grâce au **signal *Nkx2.5***.



**Figure 2 :** Représentation schématique des 4 principales étapes de la latéralisation G-D D'après Hamada (Hamada et al. 2002). La première étape (Step 1) correspond à la rupture de la symétrie G-D avec mise en place d'un flux unidirectionnel (flèches) dans le nœud embryonnaire (NE) primitif (Node en gris). Au cours de la seconde étape (Step 2), les signaux moléculaires d'asymétrie G-D sont transmis du NE jusqu'au mésoderme latéral. Lors de la troisième étape (Step 3), les molécules *Nodal* et *Lefty2* sont exprimées de façon asymétrique dans le mésoderme latéral (Rouge/Vert). Enfin, la morphogénèse asymétrique situs spécifique des organes viscéraux se met en place selon trois mécanismes : boucle d'un tube pour le cœur, l'estomac et les intestins (Pattern 1) ; segmentation asymétrique pour le foie et les poumons (Pattern 2) ; régression unilatérale des structures pour les vaisseaux par exemple (Pattern 3).



**Figure 3 :** Expression asymétrique de *Nodal*, *Lefty 1* et *2*, *Pitx2*

Adapté d'après Hamada (Hamada et al. 2002). *Nodal* et *Lefty2* sont exprimés du côté gauche du mésoderme latéral, de même que *Pitx2*, cible directe de *Nodal*, qui initie l'asymétrie de la morphogénèse des organes.

### C. Rôle du cil dans la mise en place de l'asymétrie Gauche-Droite

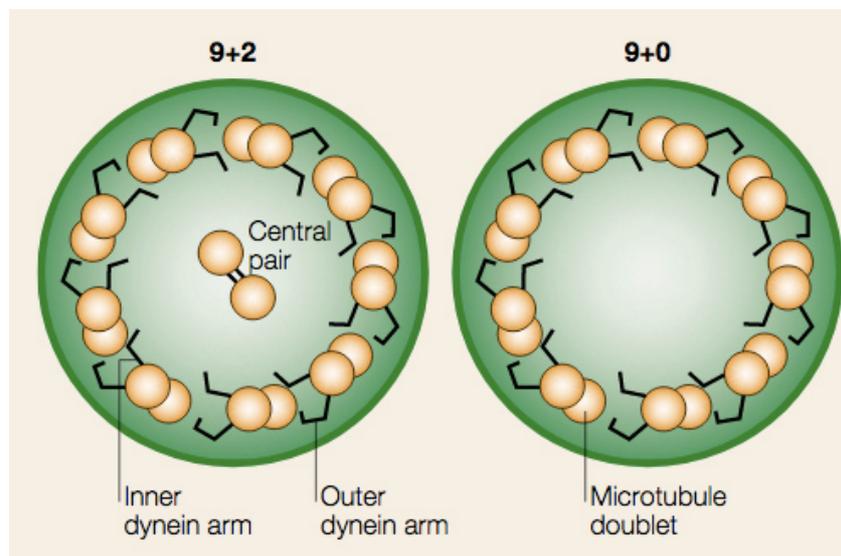
Comme décrit précédemment, le **nœud embryonnaire primitif** compte à sa surface **deux types** de cils : les cils mobiles qui génèrent le flux nodal et les cils primaires (non mobiles) qui captent ce flux en périphérie du NE, à l'origine de l'activation de la cascade Nodal dans le mésoderme latéral gauche. L'un et l'autre jouent un rôle particulièrement important dans l'établissement de la latéralisation G-D des organismes et ont de **nombreuses protéines en commun** (Ostrowski, Dutcher, and Lo 2011). Ces structures ciliées sont des organelles très **conservées au cours de l'évolution** formant une expansion cellulaire constituée d'un cytosquelette de microtubules appelé **axonème**.

Les cils **mobiles**, dits « 9+2 », sont constitués d'un anneau de 9 doublets de microtubules périphériques autour d'un doublet central et leur motilité est assurée par des bras de **dynéines internes et externes** qui s'associent aux microtubules (Figure 4A). Ils sont typiquement présents à la surface de l'épithélium respiratoire, du système nerveux central et du système reproducteur (trompe de Fallope, flagelle des spermatozoïdes).

Les cils **primaires immobiles**, dits « 9+0 », se distinguent par l'absence de doublet central. Ils sont présents à la surface de nombreuses cellules de l'organisme dont les kératinocytes de la peau, les cellules épithéliales des tubules rénaux, les photorécepteurs de la rétine et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ils captent des signaux chimiques ou

mécaniques de l'extérieur (**chémosenseur ou mécanosenseur**) qu'ils transmettent en intracellulaire.

Il est intéressant de noter que les **monocils du NE** sont des cils de structure « 9+0 » mais **mobiles** grâce à des bras de dynéine (Figure 4B) ce qui leur permet de générer un mouvement rotatoire coordonné unidirectionnel (Nonaka et al. 1998). Les protéines de dynéines forment un **complexe moteur avec les protéines Kif3a et Kif3b** (superfamille des Kinésines) pour permettre le transport bidirectionnel le long des microtubules de particules essentielles à la biosynthèse et au renouvellement du monocil. Le fonctionnement normal du cil nodal nécessite de nombreuses protéines dont celles codées par les gènes *Dnah11* et *Inversine (Invs)* chez la souris. Dans les modèles murins mutés pour ces gènes, les monocils du NE sont anormaux (rigidité, immobilisme,...) avec un **flux nodal perturbé** par rapport aux souris sauvages, à l'origine de *situs inversus* (Supp et al. 1999; Yokoyama et al. 1993). Chez l'humain, le fonctionnement normal du cil fait également intervenir des protéines motrices dont celles des bras externes de dynéine codées par les gènes *DNAH5* et *DNAIL*.



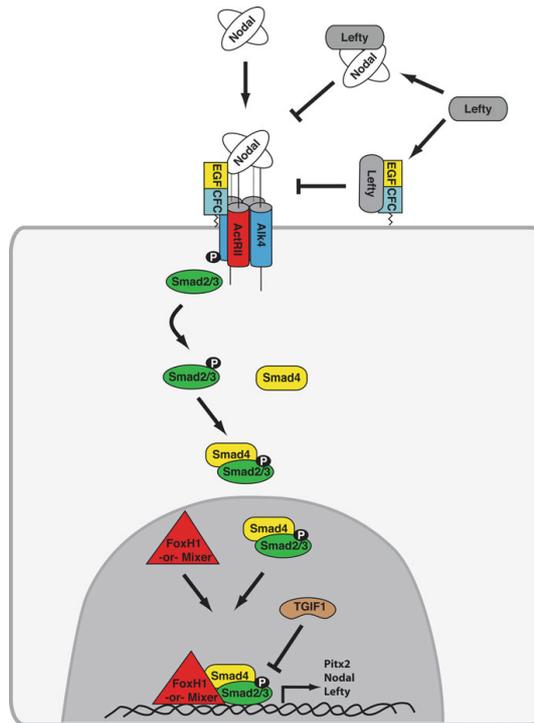
**Figure 4 :** Structures des deux types de cils de l'organisme  
D'après Hamada (Hamada et al. 2002). (A) Cils mobiles « 9+2 » constitués de 9 doublets périphériques et d'un doublet central de microtubules. (B) Cils nodales « 9+0 » sans doublet central de microtubules mais avec des bras de dynéines internes (inner dynein arm) et externes (outer dynein arm) permettant son mouvement contrairement aux cils primaires immobiles « 9+0 ».

#### D. Voies de signalisation

**Plusieurs voies de signalisation** sont mises en jeu dans l'élaboration de la latéralisation G-D et interagissent de façon **agoniste ou antagoniste**. C'est le cas notamment de la voie **Nodal** (Figure 5) et de la voie **Shh**. Différents ligands sont maintenant bien connus dont **Gdf1** (Growth differentiation factor 1) qui active la voie Nodal tandis que **Cer12** agit comme un antagoniste (interaction compétitive avec les récepteurs). Nodal interagit ensuite avec les TGF $\beta$  récepteurs ou **Activin récepteurs** de type I (Acvr1b, Acvr1c) et de type II (ActrIIa, ActrIIb) en présence de son co-récepteur Cryptic qui fait partie de la famille des protéines EGF-CFC (epidermal growth factor–Cripto/FRL-1/Cryptic). Son activité est évaluée par le **niveau de phosphorylation de la région COOH-terminale de Smad2 et 3** (effecteurs terminaux intracytoplasmiques de la cascade Nodal). Une fois transloquées dans le noyau, ces protéines s'associent à d'autres facteurs de transcription dont FoxH1 pour réguler l'activité de **transcription de gènes** en aval. Parmi ces gènes régulés, il y a *Nodal* et *Lefty* dont l'expression transitoire et localisée est régulée positivement et négativement par *Nodal* lui-même (**boucles de rétrocontrôle**).

De façon intéressante, **Gdf1**, de la superfamille des TGF $\beta$ , stimule l'activité de Nodal en formant avec lui un hétérodimère. Son expression est dépendante de la voie de signalisation Shh. Les souris mutantes *Gdf1*<sup>-/-</sup> rapportées par Rankin et al. présentent des défauts de latéralité en perdant l'expression asymétrique de Nodal dans le mésoderme latéral gauche (Rankin et al. 2000).

La **voie des facteurs BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins) intervient également dans la détermination de la latéralisation G-D. Elle participe tôt à la formation du NE et à la ciliogénèse. Son effet sur la cascade moléculaire Nodal n'est pas tout à fait clair.



**Figure 5 :** Cascade de signalisation Nodal dans le mésoderme latéral gauche

D'après Barnes et Black (Barnes and Black 2016). Nodal et son ligand interagissent avec les récepteurs activines en présence du co-récepteur Cryptic (EGF-CFC) pour activer la cascade de signalisation intracytoplasmique et notamment la phosphorylation des Smads 2 et 3. Ceux-ci s'associent ensuite à Smad 4 pour être transloqués dans le noyau où en se liant à d'autres facteurs de transcription dont FoxH1 ou Mixer ils vont réguler la transcription des gènes Nodal, Lefty et Pitx2 (régulation positive et négative).

## II. Anomalies de latéralisation Gauche-Droite et hétérotaxie

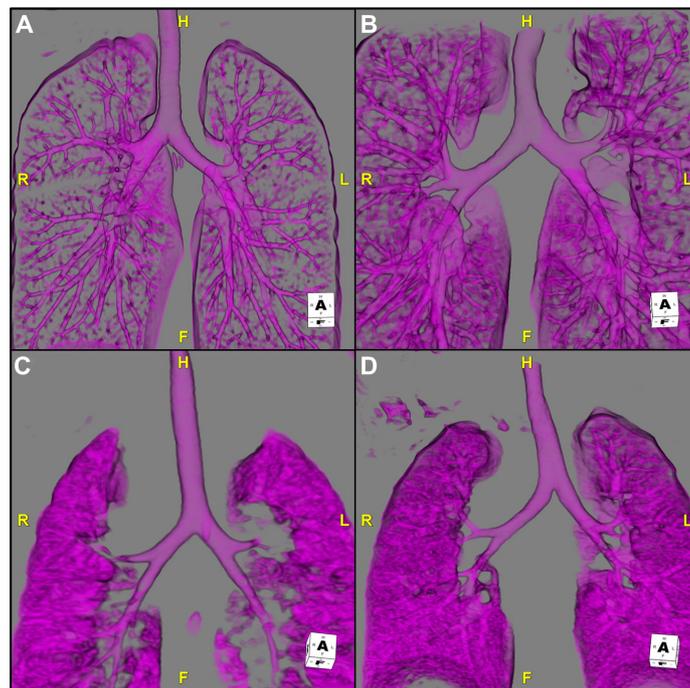
L'organogénèse des êtres vivants repose entre autres, sur la mise en route correcte de son asymétrie G-D tôt pendant le développement embryonnaire. Lorsque celle-ci ne se met pas en place suivant les règles habituelles mais s'établit de façon **randomisée**, on parle alors de *situs ambigu* ou encore d'hétérotaxie (du grec *héteros* « autre » et *taxis* « ordre, agencement »). Cette dernière, bien que rare, concerne environ **1 naissance sur 10 000** (Shiraishi and Ichikawa 2012).

**Le syndrome d'hétérotaxie** est caractérisé par un grand nombre de malformations congénitales viscérales, à l'étage thoracique comme à l'étage abdominal, rendant son phénotype très hétérogène. Plusieurs définitions et classifications ont été élaborées au fil du temps mais la **terminologie rapportée par Jacobs** au nom du Comité Internationale de Nomenclature des Malformations Cardiaques Congénitales et Pédiatriques, reste la plus consensuelle (Jacobs et al. 2007). Elle tient compte des deux écoles de pensées de la description segmentaire anatomique des malformations cardiaques congénitales : Van Praagh à Boston et Anderson en Europe. Elle définit l'hétérotaxie comme tout **arrangement anormal des organes internes thoraco-abdominaux de part et d'autre de l'axe G-D du corps** autre que le *situs solitus totalis* et le *situs inversus totalis* (Jacobs et al. 2007).

D'autres termes sont utilisés pour la description des anomalies de la latéralité des individus. Le *situs* se rapporte à la **position des viscères** pairs et impairs dans le thorax et l'abdomen. Lorsqu'elle est normale de part et d'autre de l'axe G-D, le *situs* est dit *solitus*. Lorsque les organes sont disposés en miroir de la normalité, on parle de *situs inversus*. Pour toutes les autres situations, on décrit un *situs ambigu* (organisation aléatoire). En cas d'**isomérisme** (droit ou gauche), on observe des structures similaires complètement de morphologie droite ou gauche de part et d'autre du corps. Les caractéristiques morphologiques définissant la droite et la gauche de certaines structures ne sont pas toujours évidentes, notamment en ce qui concerne les oreillettes dont la latéralité est en rapport avec les particularités de son **auricule** (pyramidale à base large avec des muscles pectinés à droite, fin en doigt-de-gant à gauche) (Anderson 1999). Ces dernières sont très difficiles à déterminer par des examens simples tels que l'échocardiographie et nécessitent parfois des investigations complémentaires par tomодensitométrie (Wolla et al. 2013). Celle-ci est également très utile pour l'évaluation du *situs* bronchique. En cas de disposition normale des viscères selon l'axe G-D, la **bronche souche** droite est plus courte et plus horizontale que la bronche souche gauche et se divise précocement sur un poumon trilobé après avoir cheminé au-dessus de l'artère

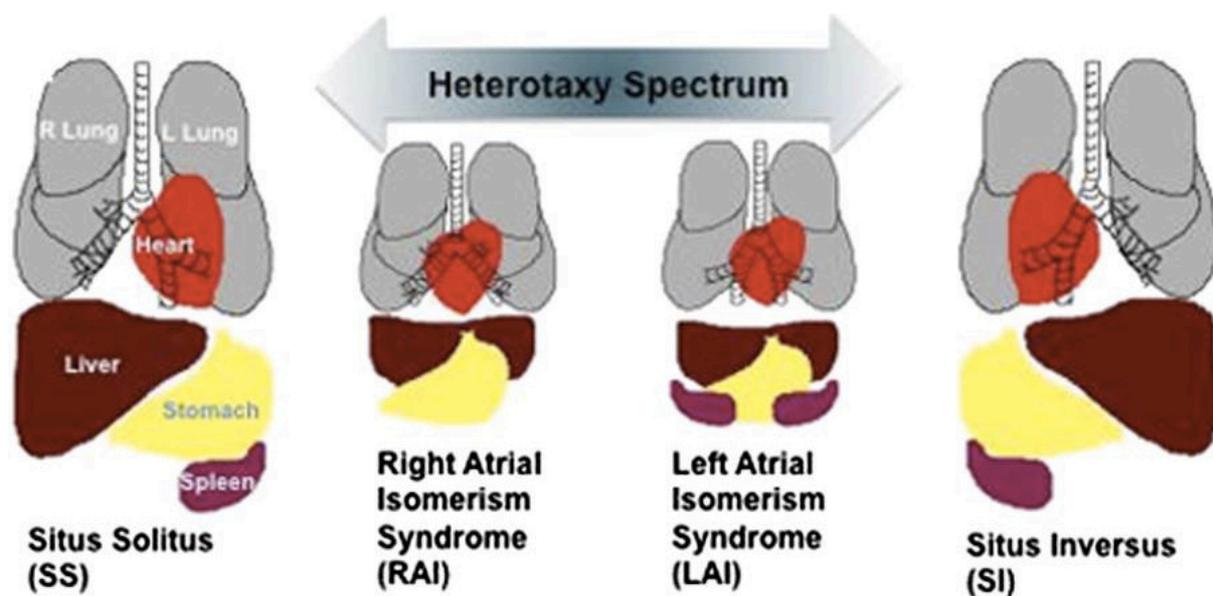
pulmonaire droite (Figure 6). Enfin, le *situs* abdominal (position de la veine cave inférieure, de l'estomac, du foie et de la rate) est souvent superposable au *situs* atrial (Van Praagh 1985).

En cas d'anomalie de latéralisation, tous les viscères du haut en bas de l'individu peuvent suivre la **même disposition**, on parle alors de *situs inversus totalis* (tous les organes sont en miroir de la normalité avec un phénotype clinique le plus souvent asymptomatique), d'isomérisme droit (tous les organes de part et d'autre de l'axe G-D sont de morphologie droite) ou d'isomérisme gauche (tous les organes de part et d'autre de l'axe G-D sont de morphologie gauche) (Figure 7). Dans tous les autres cas, il faut décrire **viscère par viscère** la latéralisation et les anomalies associées (malformation cardiaque, rate non fonctionnelle,...).



**Figure 6 :** Anatomie du situs bronchique

D'après reconstruction 3D de Wolla ("Cardiovascular Manifestations of Heterotaxy and Related Situs Abnormalities Assessed with CT Angiography" 2013). **(A)** *Situs solitus* avec bronche souche droite plus courte et horizontale que la bronche souche gauche. **(B)** *Situs inversus* avec bronche souche droite longue et angulée compatible avec une bronche souche de morphologie gauche. **(C)** Isomérisme droit avec deux bronches souches courtes et horizontales se divisant précocement. **(D)** Isomérisme gauche avec deux bronches souches longues et verticalisées. F, feet ; H, head ; L, left ; R, right



**Figure 7** : Organisation des viscères dans les différents types de situs et en cas d'hétérotaxie D'après schémas de Fakhro (Fakhro et al. 2011). **(SS)** : *Situs Solitus*, la pointe du cœur est tournée vers la gauche, le poumon droit est trilobé tandis que le gauche est bilobé, le foie (Liver) est à droite tandis que l'estomac (Stomach) et la rate (Spleen) sont à gauche. **(RAI)** : Isomérisme Atrial Droit, les deux poumons sont trilobés, le foie est médian et il n'y a pas de rate (asplénie). **(LAI)** : Isomérisme Atrial Gauche, les deux poumons sont bilobés, le foie est médian et il y a plusieurs rates (polysplénie). **(SI)** : *Situs Inversus*, la pointe du cœur est tournée vers la droite, le poumon droit est bilobé tandis que le gauche est trilobé, le foie est à gauche tandis que l'estomac et la rate sont à droite.

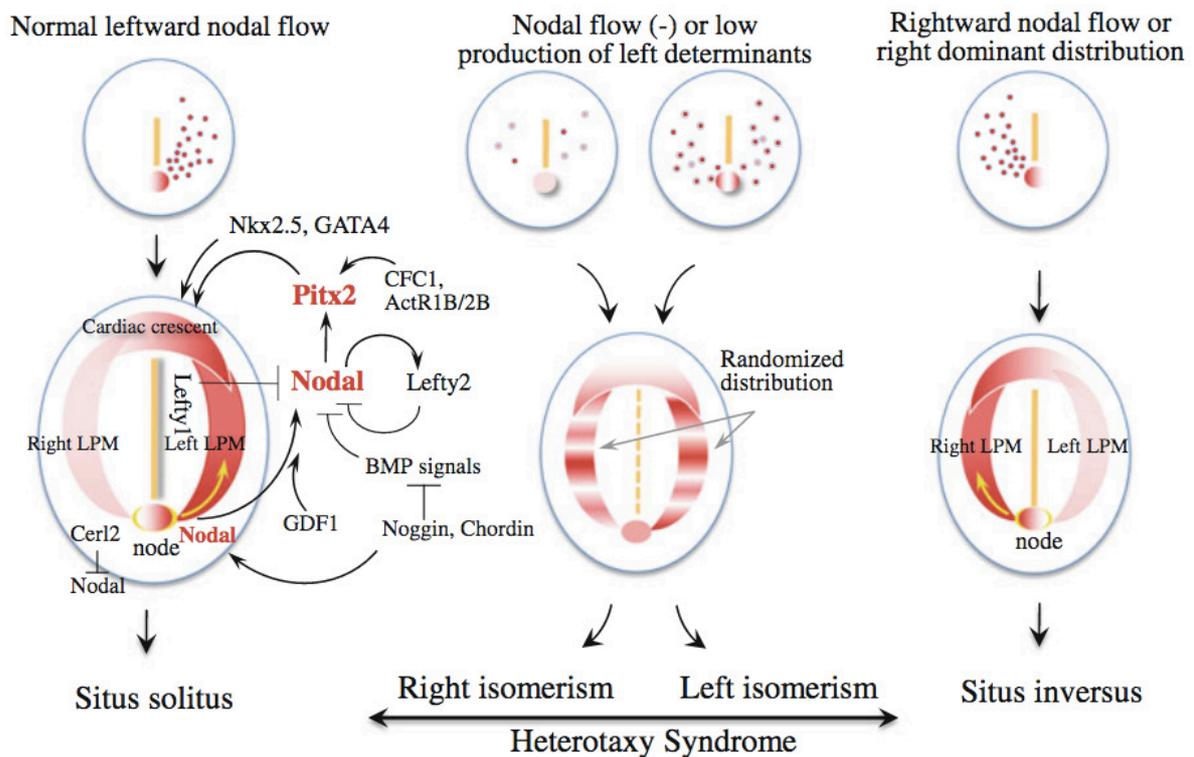
Les causes de ces **modèles complexes d'organisation spatiale** sont multiples, le plus souvent génétiques mais parfois influencées par des **facteurs environnementaux tératogènes** tels que le diabète gestationnel (Hachisuga et al. 2015). Plusieurs gènes impliqués dans les anomalies de latéralisation, que ce soit chez l'Homme comme dans différents modèles animaux, ont déjà été rapportés dans la littérature : *ZIC3* (OMIM 300265) (Ware et al. 2004), *NODAL* (OMIM 601265) (Mohapatra et al. 2009), *CFC1* (OMIM 605194) (Bamford et al. 2000), *ACVR2B* (OMIM 602730) (R. Kosaki et al. 1999), *LEFTY2* (OMIM 601877) (K. Kosaki et al. 1999), *CITED2* (OMIM 602937) (Sperling et al. 2005), *CRELD1* (OMIM 607170) (Zhian, Belmont, and Maslen 2012), *GDF1* (OMIM 602880) (Kaasinen et al. 2010), *NKX2.5* (OMIM 600584) (McElhinney et al. 2003),... Il existe probablement une **expression variable et une pénétrance incomplète** des anomalies ponctuelles génétiques expliquant les modèles complexes de transmission des anomalies de latéralisation entre les générations (Belmont et al. 2004). Tous les modes d'hérédité ont été décrits. La transmission autosomique récessive des cas d'hétérotaxie est la plus fréquente.

Les anomalies génétiques en cause peuvent aussi toucher les cils primitifs (**ciliopathies**) comme dans la dyskésie ciliaire primitive et être responsables d'une complète inversion de la

latéralisation des organes (i.e. *situs inversus* avec souvent peu de conséquences fonctionnelles et rarement des malformations cardiaques associées).

Dans la plupart des cas d'hétérotaxie, la base moléculaire reste encore inconnue.

Des anomalies dans l'établissement de l'asymétrie G-D très précoce de l'embryon et notamment de la **distribution de *Pitx2*** sont aussi à l'origine d'anomalies congénitales de latéralisation et de syndromes d'hétérotaxie avec des conséquences très variables (Figure 8).



**Figure 8 :** Détermination de la latéralisation G-D en cas d'hétérotaxie

Anomalies de transmission des signaux de latéralisation G-D du nœud primitif au mésoderme latéral et anomalies de distribution de *Pitx2* à l'origine des défauts de latéralisation des embryons (randomisation ou inversion) d'après Shiraishi (Shiraishi 2016).

### III. Anomalies de latéralisation Gauche-Droite et malformations cardiaques

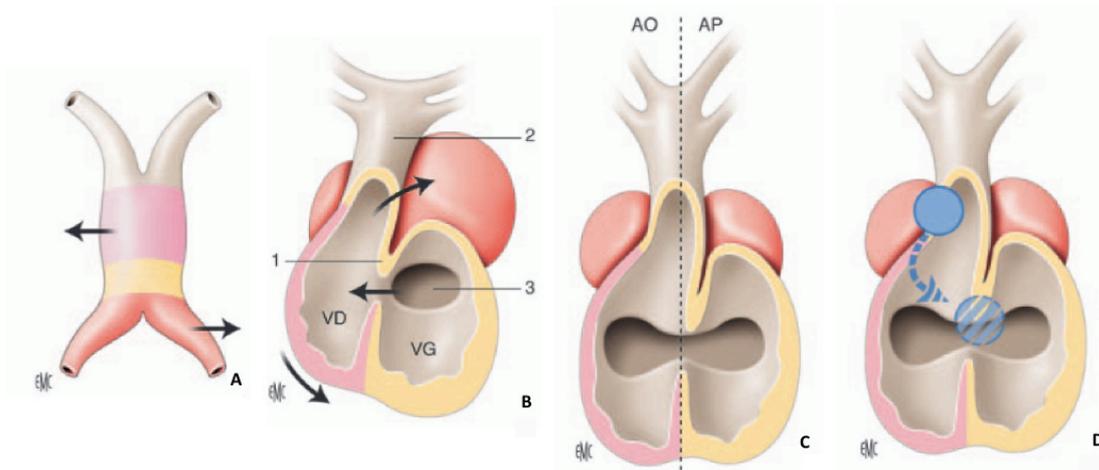
#### A. Cardiogénèse précoce et développement cardiaque

Au cours de l'embryogenèse, le cœur est le **premier organe formé** et aussi le premier à marquer la rupture de symétrie selon l'axe G-D des viscères internes en effectuant sa **boucle cardiaque (looping)**. Toute anomalie dans la détermination et la mise en place normales de la latéralité G-D des individus peut donc aussi se répercuter sur le développement du cœur.

Le développement du cœur, **organe impair et le plus asymétrique du corps**, est un processus biologique complexe au cours duquel un **réseau de gènes** et plusieurs facteurs de transcription sont impliqués à différents temps et lieux de l'organogenèse. Un certain nombre de mécanismes moléculaires de l'embryogénèse cardiaque reste encore **incompris**, même si conservés au cours de l'évolution. L'étude du développement de l'embryon de souris est notamment un bon modèle pour comprendre la cardiogénèse des mammifères dont les bases du développement sont similaires.

Chez l'humain, la morphogénèse cardiaque débute à 15 jours de vie intra-utérine (4 semaines d'aménorrhée) et comprend **trois principales étapes** pour finalement s'achever 8 semaines plus tard. Le cœur se présente initialement sous la forme d'un **tube cardiaque primitif** dont le processus précoce de **looping (boucle cardiaque en français)** est indispensable pour la mise en place de l'alignement correct des quatre cavités cardiaques et la formation normale du cœur. S'enchaînent ensuite les étapes de **convergence** puis de **wedging** (Figure 9). La **convergence** s'établit grâce à une série de déplacements morphogénétiques de part et d'autre des courbures interne et externe, et est absolument nécessaire à la septation cardiaque définitive en étroite lien avec le développement du système de conduction. Le **wedging** est le processus par lequel la future valve aortique, située au départ à la partie droite de la voie d'éjection, descend par un mouvement de **rotation anti-horaire vers la gauche** pour arriver au contact de la valve mitrale et s'encastrent entre les deux valves auriculo-ventriculaires (Figure 9D). Il est responsable du **croisement des gros vaisseaux** d'un cœur normal. Lors de sa migration, la valve aortique emporte également avec elle le septum conal issu de la fusion des bourgeons endocardiques de la voie d'éjection et qui va fusionner avec le septum interventriculaire primitif. Enfin, la formation du cœur s'achève par le développement du **système coronaire** à partir des cellules épicaudiques qui subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse sous le contrôle de facteurs de transcription tels que *GATA4* et *FOG2*.

Chaque étape de maturation du cœur nécessite l'intégration précise de **signaux de croissance et de différenciation**.



**Figure 9 :** Étapes du développement cardiaque aboutissant à la septation cardiaque

Adapté d'après Houyel (Houyel 2009). Le tube cardiaque primitif rectiligne (A) subit à J23 une inflexion selon une courbe à convexité droite appelée boucle cardiaque donnant une configuration en « S » (B). Juste après le early looping stage, vient l'étape de convergence (C) qui va permettre l'alignement des différents septa (interauriculaire, atrioventriculaire et interventriculaire) ainsi que la croissance des cavités cardiaques à partir de la courbure externe. Enfin, le wedging (D) ou étape d'encastrement va permettre le développement de la voie d'éjection grâce à la migration anti-horaire de la valve aortique (rond bleu).

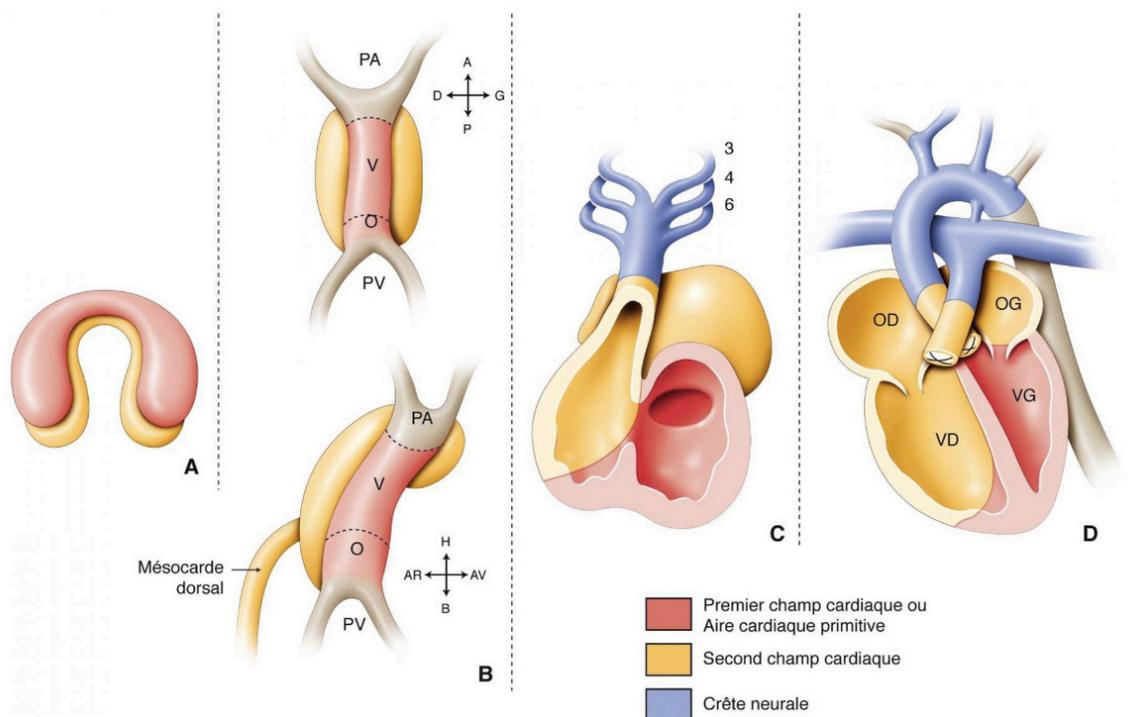
1-courbure interne ; 2-conotruncus ; 3-canal atrioventriculaire ; Ao, aorte ; AP, artère pulmonaire ; VD, ventricule droit ; VG, ventricule gauche.

Le cœur dérive du **mésoderme splanchnique antérieur**, contenant des cellules **précardiaques** qui vont se différencier très tôt pendant la gastrulation (stade E6.5 chez la souris) en **cardiomyocytes** et en **cellules endocardiques** en réponse à des signaux d'induction extracellulaires provenant de l'endoderme dont les principaux sont les facteurs de transcription *BPM2*, *BMP452* et le ligand *FGF8* qui coopère. Ces cellules migrent antérieurement et vont former le croissant cardiaque (ou **premier champ cardiaque**) de part et d'autre de la ligne médiane de l'embryon. Les limites de la région cardiaque sont définies par la **voie de signalisation Wnt** dont les facteurs Wnt1 et Wnt3A sécrétés par le tube neural qui inhibent la cardiogénèse dans le mésoderme somatique. Le programme cardiaque est régulé par les cellules du croissant cardiaque, elles même, qui expriment **plusieurs facteurs de transcription** dont *Nkx2.5*, *Gata4*, *Gata5*, *Gata6*, *Mef2c*, *Hand1*, *Hand2* et *Tbx5* (Buckingham, Meilhac, and Zaffran 2005). L'inactivation fonctionnelle de chacun de ces régulateurs dans différents modèles animaux réalisés au début des années 2000 conduit à des défauts cardiaques précoces voire même à une létalité embryonnaire.

Le cœur dérive également d'un **second champ cardiaque** (Waldo et al. 2001; Kelly, Brown, and Buckingham 2001) (présent dès le stade précurseur de la plaque cardiogénique au niveau du mésoderme pharyngé) et de deux populations cellulaires extracardiaques (les **cellules de la crête neurale** et les **cellules de l'épicarde**). La crête neurale, caractéristique des

vertébrés, est une population de cellules provenant du neuroectoderme de la partie dorsale du tube neural et contribue à la voie efférente du cœur.

Les **différents champs cardiaques** et leurs dérivés au fur et à mesure du développement du cœur sont représentés sur la **Figure 10**. Dès les premiers stades, les principaux domaines et axes (gauche-droite, antéro-postérieur) du cœur définitif sont prédéterminés. Par exemple, certains marqueurs moléculaires comme *Tbx5* montrent une expression régionalisée dans le tube cardiaque primitif. Les **principaux gènes impliqués dans la régulation de la morphogénèse** des différentes régions du cœur sont illustrés sur la Figure 11. Certains signaux sont exprimés dans les deux champs cardiaques notamment les signaux activateurs BMPs et FGFs et les signaux inhibiteurs WNTs. Les réseaux de gènes impliqués sont très conservés et rigoureusement contrôlés au sein de boucles régulatrices.



**Figure 10** : Implication des différents champs cardiaques au cours du développement cardiaque (A) Stade de la plaque cardiogénique – L'ébauche cardiaque est constituée d'un croissant cardiaque (premier champ cardiaque) avec en arrière déjà la présence du second champ cardiaque. (B) Stade du tube primitif – Les deux tubes du croissant cardiaque fusionnent sur la ligne médiane pour former le tube cardiaque primitif pendant que le second champ cardiaque migre aux extrémités antérieure (pôle artériel efférent) et postérieure (pôle veineux afférent) de ce tube où il va ajouter des cellules myocardiques. (C-D) Après l'étape de boucle cardiaque, le premier champ cardiaque va donner naissance au ventricule gauche et à la partie antérieure des oreillettes. Le second champ cardiaque antérieur va contribuer au ventricule droit et à la voie d'éjection pendant que le second champ cardiaque postérieur va participer à la septation auriculaire et atrioventriculaire ainsi qu'à l'incorporation des veines pulmonaires et systémiques dans les oreillettes. Les cellules de la crête neurale permettent d'ajouter des myocytes à la voie d'éjection et au ventricule droit. O, oreillette ; OD, oreillette droite ; OG, oreillette gauche ; PA, pôle artériel ; PV, pôle veineux ; V, ventricule ; VD, ventricule droit ; VG, ventricule gauche, 3, 3<sup>ème</sup> arche pharyngée ; 4, 4<sup>ème</sup> arche pharyngée ; 6, 6<sup>ème</sup> arche pharyngée.



enfants porteurs de cardiopathies congénitales (Fesslova et al. 2011). Ce **risque global de récurrence** varie en fonction du type de MCC (Brodwall et al. 2017). Il existe donc un rôle clair des **facteurs génétiques prédisposant** dans la survenue des anomalies cardiaques. L'expressivité variable de ces facteurs doit par contre expliquer que les membres affectés d'une même famille ne présentent pas tous la même malformation.

En cas de **syndrome génétique** ayant une MCC comme caractéristique (par opposition à une CC isolée), le risque de récurrence dépend du **mode de transmission génétique** de ce syndrome (autosomique dominant, autosomique récessif, lié à l'X,...).

### C. Étiologies des cardiopathies congénitales

Dans la majorité des cas, surtout lorsque la malformation cardiaque est isolée, c'est-à-dire non syndromique, **l'étiologie reste inconnue** (Blue et al. 2017). Les infections virales, comme la rubéole, ou l'exposition à des **toxiques** pendant la grossesse (tabac, alcool) jouent un rôle important dans la survenue des anomalies cardiaques. Il est aussi démontré que le manque de **folates** et d'homocystéine entraîne une augmentation des MCC par défaut de fermeture du tube neural (Hernández-Díaz et al. 2000; Kapusta et al. 1999). Les **réтиноïdes** en activant la vitamine A jouent également un rôle dans le développement embryonnaire. Le manque ou l'excès d'acide rétinoïque induit ainsi un large spectre d'anomalies en particulier sur la voie efférente (Jiang et al. 2002). Enfin, les maladies chroniques maternelles (diabète, lupus, phénylcétonurie) et les **médicaments maternels** pris pendant la grossesse (thalidomide, lithium, anti-inflammatoires, anti-convulsivants) peuvent être impliqués dans l'apparition des MCC.

L'origine génétique des cardiopathies congénitales est étudiée depuis les années 1950s. Seulement 10% des cardiopathies sont familiales ce qui a rendu difficile les premières techniques d'explorations génétiques (approche gène candidat par analyse de liaison avec ségrégation selon les lois mendéliennes). D'autre part, l'importante **hétérogénéité génétique** des malformations cardiaques et leur relative faible prévalence rend difficile les études d'association pangénomique GWAS. L'hypothèse initiale de la **classification mécanistique** suggère qu'une anomalie génétique perturbe un processus embryologique de la morphogénèse cardiaque conduisant à un groupe de cardiopathies hétérogènes anatomiquement mais procédant du même défaut de développement (Clark 1996). James Nora en 1968 décrit pour la première fois la possibilité d'un **déterminisme multifactoriel** impliquant plusieurs loci et une variabilité d'expression en rapport avec des facteurs hémodynamiques, mécaniques et environnementaux qui interagissent précocément (NORA 1968). D'autres travaux plus récents

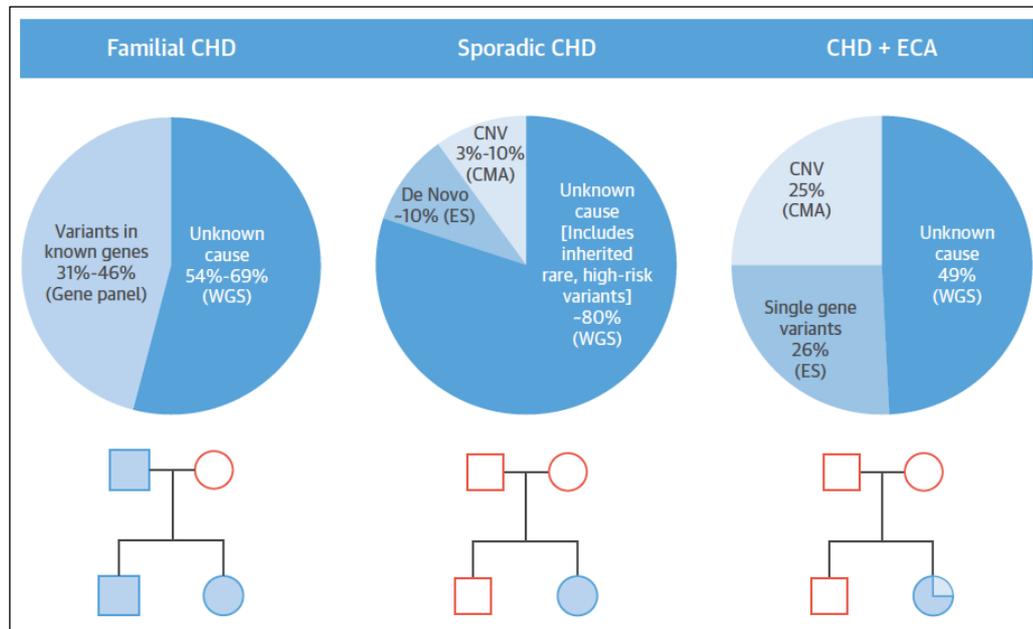
montrent, eux, que dans un pourcentage indéterminé de cas les CC sont secondaires à des **mutations ponctuelles** dont les conséquences sont proches d'une hérédité mendélienne avec pénétrance incomplète et expressivité variable (Blue et al. 2017). Les anomalies génétiques peuvent être **héritées** d'un ou des deux parents, ou survenir « de novo ». Les notions de **dosage génique**, de redondance et de régulation chromatinienne au cours de la cardiogénèse ont également une place à prendre dans l'explication des MCC.

Environ 30% des fœtus avec une cardiopathie ont des **anomalies chromosomiques** comme la trisomie 21, la trisomie 13, la trisomie 18, le syndrome de Turner ou d'autres microremaniements chromosomiques (délétion 22q11, délétion 7q11.23,...). Grâce aux techniques de cytogénétique quantitative comparative (ACPA, analyse chromosomique sur puce à ADN ou CGH-array en anglais), plusieurs **variations de nombre** de petites régions chromosomiques (CNV, Copy Number Variations) ont été mises en évidence (délétion ou duplication) (Thienpont et al. 2007; Zaidi and Brueckner 2017). Certaines malformations cardiaques sont aussi en rapport avec une anomalie génétique syndromique et désormais près de **200 syndromes** ont dans leur description une cardiopathie (Kabuki, Alagille, Noonan, Ellis van Creveld). Les principaux syndromes d'origine génétique ou chromosomique impliquant une anomalie cardiaque m'ont donné l'occasion de la rédaction de **deux chapitres d'ouvrages** spécialisés en médecine vasculaire ou cardiologie pédiatrique congénitale, et de la création d'un tableau didactique de synthèse (Annexes 1 et 2). Ces cardiopathies d'origine chromosomique ou monogénique impliquent souvent des facteurs de transcription de la cardiogénèse (cf. paragraphe A).

Au cours de ces vingt dernières années, l'identification des mécanismes génétiques n'a fait que progresser notamment grâce à l'utilisation à grande échelle des **récentes technologies d'analyse moléculaire** (Blue et al. 2014) mais également grâce à l'étude de modèles animaux présentant des cardiopathies après **inactivation spontanée ou induite de gènes** (Li et al. 2015). Le développement cardiaque de la souris est notamment très proche de celui de l'humain et permet des analyses à l'échelle macroscopique, microscopique et moléculaire (Wessels and Sedmera 2003).

Dans une exhaustive revue de la littérature basée sur les résultats récents de **séquençage massif en parallèle** de grosses cohortes de patients avec MCC, Blue estime que l'étiologie des cardiopathies congénitales est désormais identifiée dans **à peine 20% des cas sporadiques** versus la **moitié des cas dans les formes familiales ou syndromiques** (Figure 12) (Blue et al. 2017).

De façon intéressante, parmi les gènes récemment identifiés, plusieurs avaient déjà été rapportés pour leur **implication dans le développement cérébral**. Cette découverte renforce le lien étroit entre embryogenèse cardiaque et cérébrale, déjà souligné par la surreprésentation des troubles neurodéveloppementaux chez les patients MCC indépendamment d'autres facteurs confondants tels que l'hématose ou les conditions opératoires (Simmons and Brueckner 2017).



**Figure 12** : Proportion de patients avec étiologie génétique identifiée

D'après Blue et al (Blue et al. 2017). Identification des causes génétiques responsables des MCC dans les formes familiales, les formes sporadiques et les formes syndromiques associant des anomalies extracardiaques. Les patients sont représentés en bleu dans les arbres généalogiques. Les techniques moléculaires utilisées pour l'identification des causes génétiques sont précisées entre parenthèses. CMA, chromosomal microarray (ACPA en français) ; CNV, copy number variation ; ECA, extracardiac congenital anomalies ; ES, exome sequencing ; WGS, whole genome sequencing.

Globalement, l'apparition d'une MCC donnée peut donc relever de plusieurs mécanismes et/ou de la perturbation de plusieurs gènes agissant en interrelation (Clark 1996), et notamment de plusieurs **facteurs de transcription** qui contrôlent la différenciation cardiaque selon une **interdépendance** complexe (Luna-Zurita et al. 2016). Il est même possible que l'association de plusieurs variants fréquents avec peu d'effet chacun soit la cause sous-jacente de certaines cardiopathies congénitales (Marian 2012).

#### D. Malformations cardiaques et anomalies de latéralisation Gauche-Droite

La latéralisation du cœur marque le **début du développement cardiaque**. Il est maintenant démontré que les patients avec hétérotaxie ont une **incidence augmentée** de malformations cardiaques, associées ou non à des malformations extra-cardiaques telles qu'un foie médian, une malrotation intestinale, une atrésie des voies biliaires ou un polysplénisme.

En plus d'être malformé le cœur peut également occuper une place inhabituelle dans le thorax. On parle de **dextrocardie** lorsqu'il est situé à droite du sternum ou de **mésocardie** lorsqu'il est au centre. Dans une vaste étude épidémiologique rétrospective incluant 517 patients avec défauts de latéralisation G-D, Lin montre que 90% des patients avec hétérotaxie présentent une cardiopathie congénitale associée (versus 41% pour les patients en *situs inversus totalis*) (Lin et al. 2014). Il s'agit souvent de malformations cardiaques complexes, surtout en cas d'isomérisme droit, dont la gravité fait tout le pronostic des syndromes d'hétérotaxie. Même en cas de transplantation cardiaque, le pronostic reste sombre (Duong et al. 2019). On observe classiquement : ventricule droit à double issue, anomalie du retour veineux pulmonaire totale ou partielle, interruption de la veine cave inférieure, canal atrio-ventriculaire, double veine cave supérieure, ventricule unique, atrésie pulmonaire. En outre, des anomalies de latéralisation G-D sont retrouvées chez **3% des patients porteurs d'une CC** (Lin et al. 2014). Cette proportion augmente même jusqu'à 16% parmi les 82 fœtus porteurs de MCC explorés par Atkinson (Atkinson and Drant 1998).

Une **description segmentaire** de la disposition anatomique à l'étage auriculaire, à l'étage ventriculaire et à l'étage artériel ainsi que l'analyse des jonctions entre les segments, sont souvent nécessaires pour un diagnostic exhaustif et la détermination d'un projet thérapeutique adapté (Van Praagh 1985). Toutes les malformations cardiaques peuvent se rencontrer quelque soient les anomalies de latéralité associées, mais certaines sont toutefois plus fréquentes lors des situations d'isomérisme droit ou gauche (Tableau 1) (Versacci et al. 2018). Des **anomalies de la conduction** cardiaque peuvent également être présentes, en rapport avec une hypoplasie ou une absence du nœud sinusal et/ou du nœud atrioventriculaire. Le pronostic de la cardiopathie n'en est alors que plus altéré.

<b>Isomérisme droit</b>	<b>Isomérisme gauche</b>
Lévocardie/Mésocardie/Dextrocardie	Lévocardie/Mésocardie/Dextrocardie
VCI et aorte du même côté, à droite ou à gauche du rachis	Interruption de la VCI avec continuité azygos
VCSG sans sinus coronaire	VCSG avec parfois unroofing du sinus coronaire
RVPA total (habituellement extracardiaque)	RVPA partiel
Oreillette unique avec oreillettes bilatérales de morphologie droite	Oreillette unique ou CIA ostium primum avec oreillettes bilatérales de morphologie gauche
D- ou L-loop ventriculaire	D- ou L-loop ventriculaire
CAV complet	CAV partiel
Ventricules déséquilibrés souvent aux dépens du gauche	Ventricules équilibrés
VDDI ou D-TGV +/- sténose ou atrésie pulmonaire	Gros vaisseaux normoposés
Sténose ou atrésie pulmonaire (>90% des cas)	Sténose ou atrésie pulmonaire (environ 30% des cas)
Crosse aortique droite	Obstructions du cœur gauche (sténose mitrale ou coarctation aortique)
Nœud sinusal bilatéral	Hypoplasie ou absence de nœud sinusal

**Tableau 1** : Principales malformations cardiaques en cas d'isomérisme droit ou gauche

Adapté d'après Versacci et al (*Versacci et al. 2018*). CAV, canal atrioventriculaire ; CIA, communication interauriculaire ; RVPA, retour veineux pulmonaire anormal ; VCI, veine cave inférieure ; VCSG, veine cave supérieure gauche ; VDDI, ventricule droit à double issue.

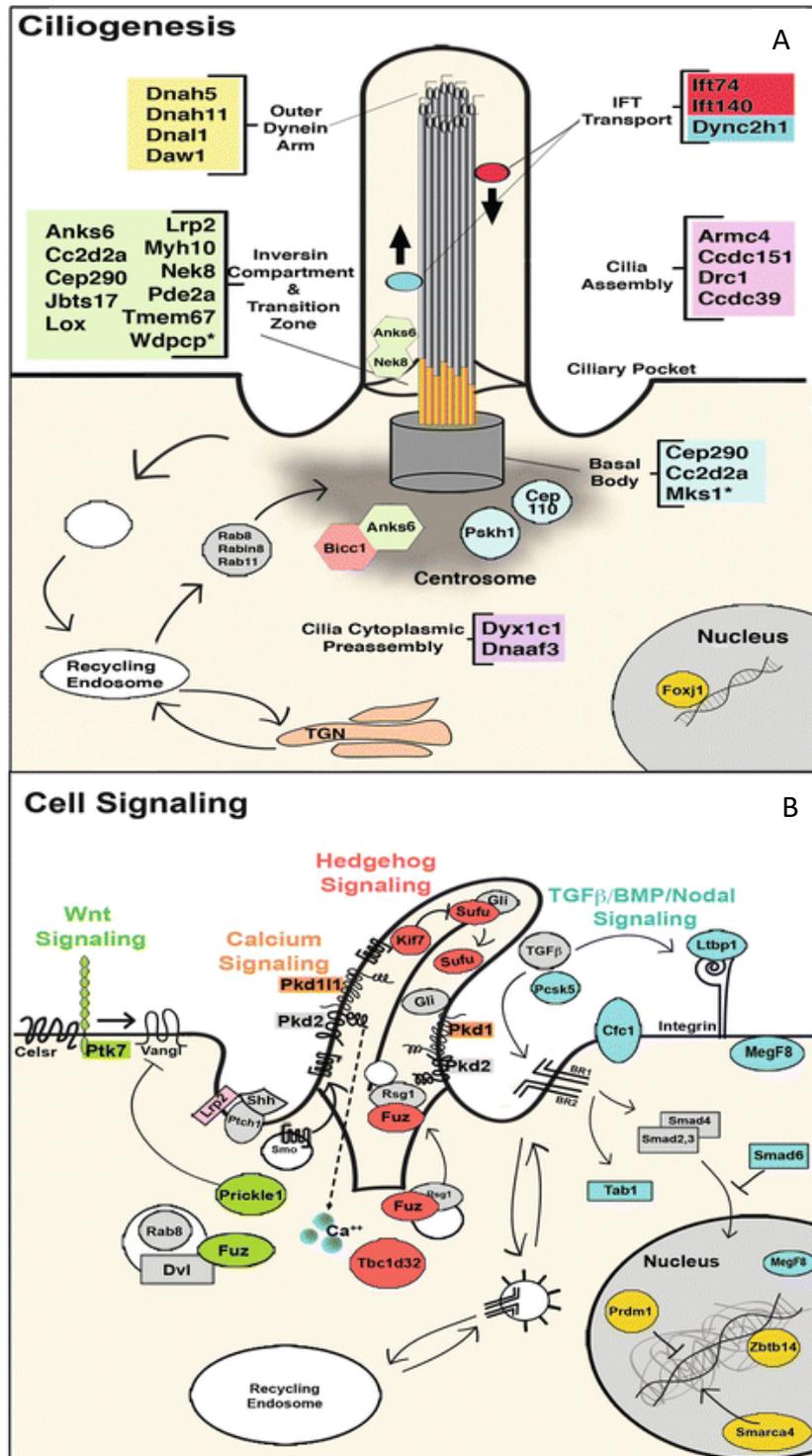
Dès 1998, Brett Casey, l'un des pionniers de la génétique de l'hétérotaxie, s'interrogeait sur la possibilité que certaines cardiopathies congénitales complexes isolées soient des **manifestations d'aberrations du développement de l'asymétrie G-D** même en l'absence d'autres anomalies viscérales associées (Casey 1998). Cette hypothèse reposait notamment sur l'observation de plusieurs familles avec hétérotaxie dont l'expression phénotypique semblait très variable d'un individu à un autre quel que soit le mode de transmission (autosomique dominant, autosomique récessif, lié à l'X).

Des mutations des gènes impliqués dans le contrôle précoce de la latéralisation G-D et de la cardiogénèse peuvent donc causer des **syndromes d'hétérotaxie ou simplement des malformations cardiaques isolées**. C'est le cas des anomalies des gènes impliqués dans la latéralité à l'étape de la loop cardiaque et qui seraient à l'origine de cardiopathies isolées avec **discordance intersegmentaire** telles que la transposition des gros vaisseaux et la double discordance (Desgrange, Garrec, and Meilhac 2018). Des criblages à large échelle d'embryons murins soumis à une **mutagenèse aléatoire induite chimiquement par l'ethyl-nitroso-urée (ENU)** ont permis de suggérer il y a une dizaine d'années l'importance jouée par les anomalies de latéralisation G-D dans le développement des MCC. Ainsi, parmi 200 lignées de souris mutées présentant des CC, Liu identifia dans pas moins de 30% d'entre elles, des anomalies en rapport avec un syndrome d'hétérotaxie (X. Liu et al. 2014). Toutes les **voies de signalisation**

**jouant un rôle dans le développement cardiaque** (Shh, Wnt, TGF $\beta$ , signaux calciques) peuvent être impliquées comme l'a montré Li dans son analyse extensive de séquençage exomique (WES, whole exome sequencing) chez des souris porteuses de MCC (Figure 13B) (Li et al. 2015).

Parallèlement, les **ciliopathies** (anomalies structurelles ou fonctionnelles des cils) occupent une place importante dans la pathogénie des syndromes d'hétérotaxie et des malformations cardiaques complexes. D'abord supporté par des études chez des modèles murins (Tan et al. 2007; Li et al. 2015) (Figure 13A), le rôle central du cil est désormais démontré dans plusieurs études cliniques humaines qui montrent une **prévalence significative d'anomalies ciliaires** parmi les patients avec MCC. Aussi bien les cils primaires que les cils mobiles sont impliqués dans ces dysfonctions pouvant également être à l'origine de symptômes ou maladies respiratoires. Par exemple, en cas de **dyskinésie ciliaire primitive** (DCP), l'immobilité ou la dyskinésie des cils de l'épithélium respiratoire est responsable d'une **anomalie de clairance du mucus** des voies aériennes causant une maladie sinusienne et respiratoire. Parmi ces patients, 6-12% présentent aussi une hétérotaxie associée ou non à une malformation cardiaque complexe. Dès 1976, Afzelius rapporte le phénotype de quatre patients avec syndrome de Kartagener qui associent infections chroniques des voies respiratoires (DCP), troubles de la fertilité masculine (spermatozoïdes immobiles) et *situs inversus* dans 50% des cas, et chez qui il identifie en microscopie électronique des anomalies de l'axonème des cils de l'épithélium respiratoire et des flagelles des spermatozoïdes (Afzelius 1976). Il décrit ainsi le « **syndrome du cil immobile** » pour expliquer les différents symptômes des malades. Cette origine commune des anomalies de latéralisation G-D et des DCP (OMIM 244400) n'est plus très surprenante puisque l'on sait maintenant que les cils mobiles à la surface du NE et ceux de l'épithélium des voies aériennes sont organisés suivant le même modèle et **partagent la plupart des mêmes protéines**. Cela explique que sans forcément exprimer toutes les caractéristiques de la DCP, près de la moitié des patients avec hétérotaxie ont une dysfonction ciliaire respiratoire révélée par une **concentration nasale en monoxyde d'azote** (NO) basse et une altération de la motricité lors de l'observation d'une biopsie de tissu nasal en vidéomicroscopie (Nakhleh et al. 2012). Cette prévalence reste également anormalement élevée lorsque l'on s'intéresse uniquement aux patients avec MCC isolée (Garrod et al. 2014). Ces caractéristiques ne sont pas anodines puisqu'elles augmentent la **morbidity respiratoire** des MCC en particulier en période post-opératoire (Harden et al. 2014). La **ciliogénèse et la fonction ciliaire** jouent donc un rôle important dans l'établissement de la latéralisation G-D

(positionnement des organes viscéraux, formation du cœur) puis secondairement dans le fonctionnement correct de nombreuses structures ciliées.

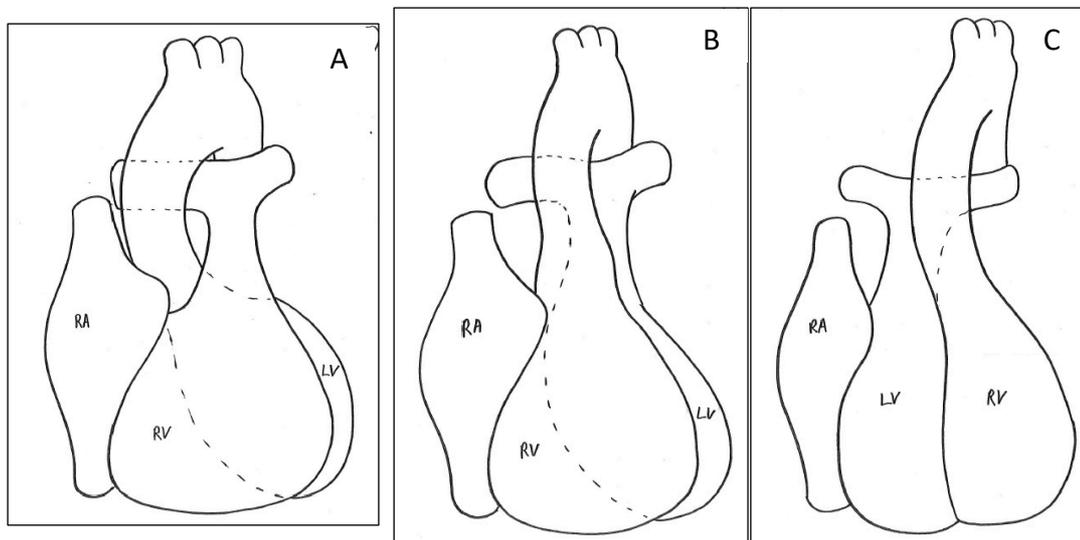


**Figure 13 :** Gènes impliqués dans les MCC chez la souris

Diagrammes représentant les différents gènes impliqués dans les malformations cardiaques des modèles murins de Li et al (Li et al. 2015). Les mutations sont induites par exposition à l'ENU. Les rôles de chaque gène dans la ciliogénèse (A) et/ou les voies de signalisation de la cardiogénèse (B) sont représentés.

#### IV. Transposition des gros vaisseaux et Double discordance

Parmi les cardiopathies congénitales humaines, nous nous intéresserons particulièrement à la **transposition des gros vaisseaux (TGV)** et à la **double discordance (DD)** pour lesquelles les mécanismes embryologiques et les causes restent encore mystérieux et sources de multiples débats. Ces deux malformations cardiaques qui impliquent une **discordance ventriculo-artérielle** et donc une **anomalie de la voie d'éjection du cœur** sont particulièrement intrigantes (Figure 14). En fonction des auteurs et des chercheurs, elles impliquent soit des **anomalies du wedging** et du développement du pôle artériel en rapport avec le second champ cardiaque (cardiopathie conotruncale), soit des anomalies de la loop cardiaque secondaires à des perturbations des **gènes de la latéralité G-D** (randomisation de l'établissement de la latéralisation G-D).



**Figure 14 :** Schémas de la transposition des gros vaisseaux et de la double discordance (A) Cœur normal : le ventricule droit (RV) donne naissance à l'artère pulmonaire en avant tandis que du ventricule gauche (LV) sort l'aorte. (B) Transposition des gros vaisseaux : l'aorte et l'artère pulmonaire sont parallèles et naissent respectivement du ventricule droit et du ventricule gauche. (C) Double discordance : le cœur présente une discordance atrioventriculaire et ventriculo-artérielle. Remerciements au Dr Gaudin pour ses schémas.

La **TGV** est la **CC cyanogène** la plus fréquente en période néonatale (5% des MCC). Elle consiste en une discordance ventriculo-artérielle, c'est-à-dire que le ventricule droit donne naissance à l'aorte tandis que l'artère pulmonaire sort du ventricule gauche. La valve aortique se retrouve alors **antérieure à la valve pulmonaire** avec un conus sous-aortique et une continuité fibreuse mitro-pulmonaire. Des anomalies coronaires peuvent être associées. Cette CC est une urgence néonatale et se révèle dès les premiers jours de vie requérant une prise en charge chirurgicale rapide (switch artériel avec réimplantation coronaire). La TGV est le plus

souvent isolée mais peut parfois être associée à des anomalies de latéralisation G-D (hétérotaxie). Le risque de récurrence familiale est faible. Les causes moléculaires d'ors et déjà identifiées dans les modèles animaux et/ou chez les patients m'ont donné l'occasion de la rédaction d'un **chapitre dans le livre** CONGENITAL HEART DISEASES: THE BROKEN HEART présenté en Annexe 3 (Bouvagnet and Bellaing 2016). Elles impliquent de **nombreuses voies de signalisation** dont 1/celles très précoces du nœud embryonnaire avec ses cils nodaux mobiles et immobiles (*NPHP4*), et 2/celles ultérieures des autres étapes de la latéralisation G-D (gènes *ACVR2B*, *CFC1*, *GDF1*, *LEFTY2*, *MYH6*, *MKRN2*, *NAA15*, *NODAL*, *RAB10*, *SMAD2*, *ZIC3*). Seul le gène *MEDL13* (*PROSIT240*) n'a jamais été associé à un phénotype d'anomalie de latéralité.

La **double discordance** est une **malformation cardiaque rare** (<1% de l'ensemble des malformations cardiaques) et encore plus mystérieuse. Elle associe, comme son nom l'indique, une double anomalie de connexion, à l'étage atrioventriculaire et à l'étage ventriculo-artériel. Cette association conduit finalement à une **circulation physiologique du cœur en série**. Depuis sa première description anatomique en 1875, de nombreuses théories phylogénétiques ont été publiées. Après une revue exhaustive de la littérature anglosaxonne, nous supportons l'hypothèse d'un modèle physiopathologique multifactoriel impliquant notamment des anomalies dans les gènes de la mise en place de la latéralité G-D avec des modificateurs génétiques et environnementaux. Basé sur des résultats récents génétiques, épidémiologiques et expérimentaux, nous suggérons que la DD est le fruit d'une anomalie de la loop cardiaque qui se fait plutôt vers la gauche que vers la droite au tout début de la cardiogénèse. Ce travail fait l'objet d'un **manuscrit présenté** ci-après qui est actuellement en révision mineure dans le Journal of the American Heart Association (JAHA).



1 **Congenitally corrected transposition of the great arteries:**

2 **A long story of controversies about mechanical and genetic patterns**

3  
4 **Moreau: ccTGA genetics review**

5  
6 Anne Moreau de Bellaing, MD<sup>1,2,3</sup>; Polakit Teekakirikul, MD<sup>4</sup>; Pascal R. Vouhé, MD, PhD<sup>1,5</sup>; Michel Ovize,  
7 MD, PhD<sup>2,6</sup>; Damien Sanlaville, MD, PhD<sup>7,8</sup>; Cecilia W. Lo, PhD<sup>3</sup>

8  
9 **Affiliations:**

10 <sup>1</sup>M3C-Necker, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

11 <sup>2</sup>CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

12 <sup>3</sup>Department of Developmental Biology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

13 <sup>4</sup>Centre for Cardiovascular Genomics and Medicine, Lui Che Woo Institute of Innovative Medicine and Division  
14 of Cardiology, Department of Medicine and Therapeutics, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong  
15 SAR, China

16 <sup>5</sup>Université de Paris, Paris, France

17 <sup>6</sup>Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

18 <sup>7</sup>HCL, Genetics department, GH Est, Lyon, France

19 <sup>8</sup>Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310 - INSERM U1217, Lyon, France; Université de Lyon - Université  
20 Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

21  
22  
23 **Corresponding Author:** Anne Moreau de Bellaing, MD

24 *Address:* Department of Pediatric Cardiology, Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris. France.

25 *Phone number:* +33(0)144495735

26 *Fax number:* +33(0)144494340

27 *Email:* [annemdb@aol.com](mailto:annemdb@aol.com)

28  
29 Total word count: 8421

30

1 **Abstract**

2 Congenitally corrected transposition of great arteries (ccTGA), formerly named “L-TGA”, is a rare and likely  
3 underestimated complex congenital heart disease. Since the first anatomic description in 1875, many  
4 phylogenetic and ontogenetic theories have been published. Based upon recent epidemiologic, experimental and  
5 genetic data, this review provides new mechanistic and genetics insights into the ccTGA pattern. We support a  
6 multiple hit model involving fundamental developmental genes defects, especially genes implicated in left-right  
7 axis specification. Together, they regulate leftward turning of the primary heart tube instead of rightward looping  
8 with discordant connections at the atrioventricular and ventriculo-arterial junctions. Environmental and/or  
9 genetic modifiers would modulate the ultimate phenotype. Recent advances in genetic tools can help distinguish  
10 the role of coding and non-coding variants involved in these rare cardiac malformation.

11

12

13

14 **Key words:** congenitally corrected transposition of great arteries, heterotaxy, congenital heart defects,  
15 congenital heart disease, embryology, genetics, cilia.

16

17

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

## 1 **Introduction**

2 Congenitally corrected transposition of the great arteries (ccTGA) is one of the rarest congenital heart  
3 diseases (CHD). It accounts for less than 1% of all CHD (prevalence of 1/33,000 live births) with a slight male  
4 predominance<sup>1,2</sup>. ccTGA was first described in 1875 by the Baron Karl von Rokitansky who immediately noted  
5 the physiological correction of this intriguing defect<sup>3</sup>. It must not be mistaken with another cardiac condition  
6 called anatomically corrected transposition of the great arteries. In ccTGA, transposition of the great arteries  
7 (TGA) defined by a discordant ventriculo-arterial connection is combined with an inappropriate atrioventricular  
8 (AV) connection. Consequently, the right atrium (with drainage of the venae cavae) is connected to the  
9 morphological left ventricle (LV) that gives rise to the pulmonary artery (PA), while the left atrium (receiving  
10 the pulmonary veins) is connected to the morphologically right ventricle (RV) from which the aorta arises. The  
11 association between discordant connections at both the atrioventricular and ventriculo-arterial junctions leads  
12 finally to a normal circulatory physiology. The defect is naturally “corrected” in term of physiology. Indeed, the  
13 deoxygenated systemic venous return is driven to the lungs through the LV, and the pulmonary venous return  
14 goes to the aorta through the RV.

15 Many points regarding ccTGA remain unclear and are still in debate. This rare CHD has no precedent in terms of  
16 phylogenetic and ontogenetic development. Its scarcity and heterogeneity have made impossible data collection  
17 from large homogeneous patient cohorts. Hence, in this comprehensive review, we discuss the different ccTGA  
18 various controversial aspects of its embryogenesis and its underlying genetic mechanism.

## 19 **Terminology**

20 The first point of debate about ccTGA is how to classify this defect, reflecting the mystery that surrounds its  
21 physiopathology and anatomic etiology. Many terminologies and nomenclature categories have been employed  
22 in the Anglo-Saxon literature to report cases combining atrioventricular and ventriculo-arterial discordances.  
23 Some of these are confusing and controversial, highlighting the heterogeneous nature of ccTGA defects<sup>4</sup>.

24 (i) In about 90% of patients, atrial chambers are arranged according to the classic disposition (situs  
25 solitus), implying that the morphologic LV is positioned to the right (L-loop by a leftward bend of  
26 the embryonic cardiac tube), and the aorta, arising from the RV, is anterior and left-sided  
27 (segmental nomenclature: {S,L,L}). Conversely, for patients with mirror-imaged atrial arrangement  
28 (situs inversus), the morphologic LV is left-sided and the aorta is typically positioned rightward  
29 and anterior to the pulmonary trunk (segmental nomenclature: {I,D,D}). Hence, such patients do  
30 not have “L-TGA” nor “inverted transposition”, but have ccTGA.

1 Exceptions to the loop rule<sup>5</sup> are also reported, and L-TGA can be found in association with D-loop  
2 ventricles (segmental nomenclature: {S,D,L}). In this case, great arteries and ventricles positions  
3 are not concordant, but atrioventricular connection is concordant leading to a rare category of  
4 uncorrected (complete) TGA<sup>6</sup>. “L-TGA” should never be used to describe the combination of  
5 simultaneous atrioventricular and ventriculo-arterial discordances.

6 (ii) Given the frequent finding in ccTGA patients of associated malformations and a natural history of  
7 many complications and interventions throughout life, this cardiac defect should not be considered  
8 as an already “congenitally or physiologically corrected” cardiac defect. Moreover, several studies  
9 have shown the morphologic RV is not well adapted for supporting systemic circulation over a life  
10 time<sup>7</sup>. However, this term does help in distinguishing these lesions from surgically repaired TGA.

11 (iii) Ventricular inversion refers to the left-right reversal of the ventricles in ccTGA, but it does not  
12 describe discordance between the ipsilateral structures. Thus a left-sided morphological right  
13 ventricle also may be observed in a normal heart found in the context of situs inversus and not only  
14 in ccTGA.

15 (iv) Finally, the French-used term “double discordance” would be the most accurate description of the  
16 complex anatomy associated with ccTGA. Another correct alternative, albeit longer, is “AV  
17 discordance with transposition of the great arteries”.

### 18 **Early embryonic defect**

19 Congenitally corrected TGA is one of the most difficult cardiac malformations to replicate experimentally, given  
20 its pathogenetic mechanism remains largely unknown. Initially, radiation and trypan blue were used to yield  
21 mutants<sup>8</sup>. Then, animal models were obtained with administration of excessive all-trans retinoic acid (RA) or  
22 retinoic acid inhibitors as teratogens during mouse pregnancy<sup>9,10</sup>. In fact, retinoic acid is an active metabolite of  
23 vitamin A and has been shown to function as a signaling molecule in several vertebrate developmental  
24 processes. Yasui *et al.* developed one of these reproducible models of TGA including ccTGA. Interestingly, a  
25 large proportion of embryos treated at day 8.5 of gestation showed complete TGA, but no heart looping defects  
26 or visceratrial situs abnormalities<sup>11</sup>. However, when treated at embryonic day 6.5 (primitive streak stage),  
27 almost half of the mice exhibited abnormal situs, especially right isomerism. Direct effect of RA on neural crest  
28 was documented<sup>12</sup>, but perturbation of a RA-controlled gene activation cascade<sup>13</sup> involving transcription factors  
29 such as *Gata4* and *Nkx2.5*<sup>14,15</sup> might also explain the outflow tract structural heart defects<sup>10</sup>. Whatever the  
30 developmental mechanism, ccTGA likely involves disturbance of heart looping, an early morphogenetic event

1 occurring when specification of the left-right body axis is already established during the third week of human  
2 embryonic development.

### 3 **Heterotaxy spectrum or not?**

4 Congenitally corrected TGA like other complex CHD, is regularly reported as a part of the heterotaxy spectrum.  
5 Since 1986, Clark in his heart development classification included ccTGA in group VI of situs and looping  
6 abnormalities, whereas TGA was grouped among conotruncal heart defects due to abnormalities of  
7 ectomesenchymal tissue migration<sup>16,17</sup>. As terminologies in the literature describing the cardiac apex relative to  
8 thoraco-abdominal orientation, organs situs and heterotaxy are often confusing, this will be discussed in more  
9 detail here.

10 Isolated dextrocardia is reported among ~30% of ccTGA patients whereas up to 15% of them may have  
11 mesocardia<sup>18</sup>. Notably, in case of situs solitus, dextrocardia occurs from shift of the ventricular apex during  
12 embryonic development to the right hemithorax and not because of an abnormal cardiac rotation.

13 Double discordance may occur in patients with atrial situs solitus (segmental arrangement {S,L,L}) or more  
14 rarely in those with atrial situs inversus (segmental arrangement {I,D,D}). However, it cannot occur in patients  
15 with atrial situs ambiguus (atrial isomerism), since the disorganized atrial arrangement does not allow  
16 assignment of left vs. right atrial identity required for determining if the connections between atrial chamber and  
17 ventricle are concordant or discordant<sup>4</sup>. In a surgical series, Biliciler-Denktaş *et al.* determined 13% of ccTGA  
18 patients suffer situs abnormalities (situs solitus of viscera and atria with isolated dextrocardia, situs inversus of  
19 viscera and atria with dextrocardia, or situs inversus of viscera and atria with isolated levocardia), consistent  
20 with other publications<sup>19,20</sup>. Yet in another retrospective cross-sectional analysis, among 53 patients with ccTGA,  
21 92.4% had usual visceral arrangement and only one patient presented with left isomerism<sup>20</sup>.

22 By convention, heterotaxy does not include patients with situs solitus totalis or situs inversus totalis<sup>21</sup>.  
23 Moreover, according to Lin *et al.* and the National Birth Defects Prevention Study (NBDPS) Laterality Defects  
24 Inclusion Criteria, the diagnosis of heterotaxy requires at least three features of visceral and cardiac anomalies  
25 among the following: (i) characteristic CHD, (ii) biliary atresia, (iii) abdominal situs abnormality, (iv) spleen  
26 abnormality, (v) isomerism of bronchi, (vi) isomerism of the lungs, (vii) similar morphology of the atrial  
27 appendages, (viii) systemic venous anomalies, associated with intestinal malrotation or absent gallbladder<sup>22</sup>.  
28 Given this recent determination of a minimal diagnostic criteria for the diagnosis of heterotaxy, this makes  
29 difficult the phenotype review of older studies.

1 In the large case-control Baltimore-Washington Infant Study, 7 of 36 infants with ccTGA had  
2 associated Ivemark syndrome<sup>23</sup>, but laterality defects were not typically observed in the majority of patients with  
3 ccTGA. In a large phenotypic and genetic study, Ware *et al.* analyzed 194 unrelated patients, including 61  
4 patients with classic heterotaxy, 93 patients with heart defects characteristic of heterotaxy, and 11 patients with  
5 situs inversus totalis<sup>24</sup>. Interestingly, they noted an increased representation of L-TGA in the CHD heterotaxy  
6 group versus the CHD observed in the classic heterotaxy group (asplenia or polysplenia). Therefore, some cases  
7 of ccTGA might relate to laterality defects restricted to the heart, in the absence of other heterotaxy features.

8 In contrast, in exceptional families with disturbances of the normal asymmetric placement of organs (i.e.  
9 heterotaxy), some cases of ccTGA were reported<sup>25,26</sup>. One of the most notable case involves fraternal twins  
10 associated with primary cilia dyskinesia (PCD) who each presented with ccTGA, one with situs solitus and one  
11 with situs inversus<sup>25</sup>. These infants, though sharing the same environmental intrauterine exposures and genetic  
12 background, had differing situs phenotypes. PCD is an autosomal recessive respiratory condition involving  
13 mucociliary clearance defects due to motile cilia defects in the airway. The close association of PCD with situs  
14 inversus and heterotaxy is already well described, and reflects the known requirement for motile cilia function  
15 not only in mediating airway clearance, but also in left-right patterning during early embryonic development.  
16 Thus PCD has been shown arise from mutations in genes required for motile cilia structure/function.

17 Nonmotile primary cilia is also known to play a role in left-right patterning and also in cardiogenesis.  
18 Thus primary cilia is required for transduction of many cell signaling pathways regulating cardiovascular  
19 development, such as Sonic hedgehog signaling and TGF $\beta$  signaling<sup>13</sup>. Thus cilia related genetic changes are  
20 suspected to play a role in abnormal ventricular looping in ccTGA. Clinical and experimental animal studies  
21 have supported the relationship between all types of TGA and visceral organ laterality defects through distinct  
22 genetic pathways<sup>27</sup>. In fact, the association of laterality defects with randomized TGA were found by screening  
23 mice with ethylnitrosourea (ENU)-induced mutations<sup>28,29</sup> or in pregnant mice treated by all-trans retinoic acid or  
24 retinoic acid inhibitors<sup>9</sup>, corroborating a common pathogenetic mechanism.

25 Left-right embryo asymmetry and normal rightward looping and spiralization of the heart are  
26 genetically determined, regulated by numerous genes, especially those involved in the NODAL signaling  
27 pathway<sup>30,31</sup>. Using genetic techniques such as linkage analysis, positional cloning and whole exome sequencing  
28 in large CHD families, human gene map of cardiac development has improved. As ccTGA patients have parallel  
29 placement of the great arteries with abnormal ventricular looping, we would expect to find sporadic or familial  
30 mutations in laterality genes even in the absence of extracardiac features as already established for patients with

1 complete TGA<sup>32</sup>. In fact, mutations in human genes involved in left-right vertebrates asymmetry are increasingly  
2 found in TGA patients, such as *CFC1* (encoding the CRYPTIC protein)<sup>33-35</sup>, *ZIC3* (X-linked transmission)<sup>24,36-</sup>  
3 <sup>38</sup>, *ACVR2B*<sup>39,40</sup>, *NODAL*<sup>41,42</sup>, *MED13L*<sup>43</sup>, *MMP21*<sup>44</sup>, *NKX2.5*<sup>42</sup>, *INVS*<sup>45</sup>, *NPHP4*<sup>46</sup>, *FOXH1*<sup>42,47</sup>, *CCDC11*<sup>48</sup>,  
4 *MEGF8*<sup>49</sup>, *CITED2*<sup>50</sup>, *NEK2*<sup>51</sup>, *ROCK2*<sup>51</sup>, *NUP188*<sup>51</sup> and *GDF1*<sup>52,53</sup>. All types of segregation have been  
5 described (Mendelian or not), including autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked recessive  
6 inheritance patterns in patients with left-right malformations<sup>37,54,55</sup>.

7 Moreover, mice with double-heterozygous mutation for both *Smad 2* and *Nodal*, two members of the  
8 transforming growth factor  $\beta$  family, can exhibit TGA and/or laterality defects<sup>56</sup>. Other targeted genes  
9 disruptions also implicated in mice with laterality defects and malposition of the great arteries include *Acvr2b*<sup>57</sup>,  
10 *Lefty1*<sup>58</sup>, *iv*<sup>27,59</sup>, *Mmp21*<sup>44</sup>, *Mgm1*<sup>60</sup> and *Megf8*<sup>61</sup>. As ccTGA phenotype is more rare and often asymptomatic,  
11 identifying causative mutations in large genetic studies is more difficult. Some cases of ccTGA have been found  
12 among larger series reporting mutations in laterality genes such as *ACVR2B*<sup>39</sup>, *ZIC3*<sup>24</sup>, *NODAL*<sup>41</sup>, *NKX2.5*<sup>62</sup>,  
13 *SHROOM3*<sup>63</sup>, *INVS*<sup>64</sup>, *NPHP4*<sup>46</sup>, *MMP21*<sup>44</sup>, *UBXN10*<sup>65</sup> even in the absence of other heterotaxy features (Table  
14 1), suggesting ccTGA should be included among the laterality defects group rather than as a defect in the  
15 heterotaxy spectrum.

16 All these genes reported in humans and/or animal models (such as *Drosophila*, zebrafish, chick, and mouse) play  
17 a critical role in normal cardiovascular development and also in the asymmetric placement of organs. Mutations  
18 in these developmental genes can affect basic developmental mechanisms, including molecular signals  
19 regulating left-right patterning. Hence, heart lesions may not be the primary result of the abnormal gene activity  
20 but rather are secondary to defective interactions occurring during cardiac development in association with other  
21 developmental processes.

## 22 **Is ccTGA just a TGA variant?**

23 It has been suggested that ccTGA is a variant of the complete transposition of the great arteries (i.e. d-  
24 TGA) and result from incomplete heart looping during early heart development. Hence, the International Society  
25 for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease (ISNPCHD) in its most recent comprehensive  
26 classification of the 11th iteration of the International Classification of Disease International Pediatric and  
27 Congenital Cardiac Code (IPCCC), ccTGA was classified as a part of the Category “Transposition of the Great  
28 Arteries and Variants”<sup>66</sup>. Supporting this classification, Digilio *et al.* showed in a large population study,  
29 significant co-occurrence of d-TGA and ccTGA among first-degree relatives of children with d-TGA, indicating  
30 an underlying pathogenetic link between these 2 malformations<sup>67</sup>. They proposed to include these cases in a

1 specific pathogenetic group named “non-spiralized great arteries”<sup>68</sup>. The familial aggregation of TGA and  
2 ccTGA is also reported by Unolt *et al.* who proposed a monogenic inheritance with a variable phenotypic  
3 expression<sup>69</sup>.

4 In another point of view, more recently, Houyel *et al.* reorganized the thousands IPCCC codes and  
5 established an easier-to-use classification for clinical and epidemiologic studies. In this Anatomic and Clinical  
6 Classification of Congenital Heart Defects (ACC-CHD), ccTGA was identified as a specific condition and  
7 classified separately as a “Complex Anomaly of Atrioventricular Connections” and not as an “Anomaly of  
8 Ventriculo-arterial Connections”<sup>70</sup>. This suggests ccTGA is a specific cardiac entity in term of anatomical,  
9 clinical and surgical standpoint. In his pathogenetic classification of CHD, Clark had also included isolated  
10 ccTGA with classic TGA in conotruncal heart defects with abnormalities of ectomesenchymal tissue  
11 migration<sup>16,17</sup>. Thus, the discordant atrioventricular connection would represent the major feature of the cardiac  
12 malformation rather than the abnormal ventriculo-arterial connection and the parallel arrangement of the great  
13 arterial trunks. This theory was further supported by a recent anatomical study of 31 ccTGA specimen showing  
14 that the orientation of the septal band, which is part of the RV outflow tract, was different between ccTGA and  
15 TGA, whereas they were similar, but mirror-imaged, between normal heart and ccTGA<sup>19</sup>. While the ventricular  
16 septum is straight and the outflow tracts parallel in TGA<sup>71</sup>, only the vessels were found parallel in ccTGA  
17 suggesting that rotational mechanism of the outflow tract is conserved during cardiac development. Therefore,  
18 discordant ventriculo-arterial connection in ccTGA may arise from a different mechanism compared to TGA  
19 and is likely not simply an outflow tract abnormality.

20 Abnormalities of the right-handed spiral movement of the outflow tract related with *Pitx2* mutations  
21 were demonstrated in mice with TGA<sup>71</sup>. One of the critical stage during the outflow tract development is the so-  
22 called “wedging” (counterclockwise rotation of the aorto-pulmonary septum) involving the migration of  
23 secondary heart field cells and cardiac neural crest cells to the outflow tract<sup>71</sup>. When this step is perturbed, great  
24 arteries spiralization defects can be observed. Further experimental studies would be necessary to assess the  
25 spiraling migration of cells from the secondary heart field in ccTGA models. We suspect discordant cardiac  
26 looping could influence conotruncal development and predispose to ventriculoarterial discordance.

27 Beyond anatomic and genetic considerations, these recent findings may have clinical implications. They  
28 could explain the differences observed in the long-term outcomes between palliated TGA and ccTGA patients  
29 patients with systemic RV<sup>72</sup>. In an imaging study investigating indices of myocardial deformation in speckle-  
30 tracking echocardiography, Diller *et al* showed that systemic RV function is more impaired in repaired d-TGA

1 than in ccTGA, especially the subpulmonary ventricle function which is preserved in ccTGA patients<sup>73</sup>. Similar  
2 results were obtained using cardiac magnetic resonance imaging. Patients with ccTGA showed higher right  
3 ventricular ejection fractions ( $p = 0.04$ ) compared to patients with d-TGA independent of the right ventricular  
4 myocardial mass index, suggesting different physiologies in their systemic ventricles<sup>74</sup>.

### 5 **Sporadic versus inheritable defect**

6 Over the last years, several multicenter epidemiologic studies have attempted to report familial  
7 recurrence data for major CHD. Congenitally corrected TGA is often considered as a sporadic defect, given few  
8 familial cases have been described and they are not usually seen in genetic syndromes, nor are combined  
9 extracardiac anomalies observed. Because many publications comprise only a small number of patients and/or  
10 evaluated all types of TGA and all looping anomalies as a single group, recurrence risk for ccTGA cases is  
11 difficult to determine<sup>75,76</sup>. In 1996, Becker *et al.* analyzed 50 sibs in a “L-TGA group” and found just one had a  
12 cardiac malformation (2%)<sup>77</sup>. Moreover, in this report, the parental occurrence was 0%, all suggesting a weak  
13 genetic contribution to the ccTGA pathogenesis. Therrien reviewed 19 ccTGA patients who had 45 pregnancies.  
14 Among them, solely one live offspring had a CHD (hypoplastic left heart syndrome) but the maternal  
15 transmission rate may have been underestimated given that prevalence of CHD in the 18 terminated pregnancies  
16 was unknown<sup>78</sup>. In another publication, 22 women with ccTGA had 60 pregnancies resulting in 50 live births<sup>79</sup>.  
17 None of them have been diagnosed with CHD, but calculation of the risk is uncertain owing to the small number  
18 of births. Based on these two reports, vertical transmission might appear as an uncommon event.

19 More recently, Piacentini *et al.* included 102 consecutive patients with isolated ccTGA excluding other  
20 types of visceral heterotaxia and looping abnormalities. In this large series, he found CHD recurrence in 15.7%  
21 of the relatives. Among them, TGA was the most common recurrent defect<sup>68</sup>. Interestingly, six probands had an  
22 unaffected twin-sib. Recurrence risk for CHD was calculated at 5.2% for siblings in this clinical cases series  
23 highlighting a pattern of inheritance. Autosomal recessive mechanism involving Mendelian genes was suspected  
24 in some families where consanguinity was identified in the parents<sup>68</sup>. Recurrence risk rate for CHD is higher  
25 among families with ccTGA in comparison to other types of CHD (4.1%)<sup>80</sup>. Piacentini *et al.* also supported in  
26 their study the plausible relationship among twinning and ccTGA as was already suggested for laterality  
27 defects<sup>68</sup>. Additionally, several epidemiologic studies which investigated the recurrence of CHD in families of  
28 children with complete non-syndromic TGA found a significant occurrence of ccTGA among first-degree  
29 relatives<sup>67</sup>. This would support monogenic or oligogenic inheritance with variable phenotypic expression. These  
30 findings should be kept in mind when providing genetic counseling for ccTGA relatives.

1 Intriguingly, association with environmental factors was also reported. Within the comprehensive  
2 Baltimore-Washington Infant Study (BWIS) database<sup>76</sup>, a nested case-control study of ccTGA reported  
3 significant associations of the cardiac condition with the maternal use of hair dye (OR = 3.0; 95% CI = 0.9-9.7),  
4 the father's exposure to laboratory chemicals (OR = 8.2; 95% CI = 1.7-40.1), the maternal smoking (OR = 1.6;  
5 95% CI = 1.1-2.4) and the residence in spatial clusters characterized by release of toxic chemicals into air and by  
6 hazardous waste sites (OR = 13.4; 95% CI = 4.7-37.8)<sup>23</sup>. Other fetal environmental expositions were identified  
7 in patients with ccTGA such as the intake of anticonvulsants<sup>81</sup> and maternal diabetes<sup>82</sup>. Congenital  
8 malformations is likely related to the gestational age at the time of exposure, the susceptibility of the individual  
9 to a given teratogen, and the dose and duration of exposure to the teratogenic influence. This notion has been  
10 widely supported by studies in various animal models. Notably, retinoic acid was demonstrated to play a role in  
11 mouse embryo left-right determination. Different teratogenic effects on ventricular looping of the murine and  
12 chick hearts<sup>9,83-85</sup> were observed depending on the developmental stage of exposure<sup>10</sup>. Tsukui demonstrated a  
13 molecular link between two parallel conserved pathways (Sonic hedgehog cascade and retinoic acid regulation)  
14 that signify crucial roles in the establishment of left-right asymmetry in vertebrates and cardiac defects<sup>13</sup>.

15 Finally, the complexity of the previous observations would suggest a multifactorial etiology in the  
16 pathogenesis of ccTGA, including a likely multigenic origin with environmental influence during embryonic  
17 development. Multiple developmental mechanisms are likely contribute to these cardiac phenotype. Gene  
18 dosage is critical for signaling and thus genetic modifiers may be involved. Larger epidemiologic studies would  
19 help identify the teratologic agents and the influence of the fetal genotype contributing to human situs anomalies  
20 and associated defects in cardiogenesis.

### 21 **Associated cardiac lesions**

22 Congenitally corrected TGA is rarely found in isolation (<10%)<sup>86</sup>. This cardiac malformation  
23 encompasses a largely heterogenous group of cardiac anomalies, and most commonly is accompanied by one or  
24 more other lesions such as ventricular septal defect (VSD), left ventricular outflow tract obstruction (LVOTO)  
25 and tricuspid valve abnormalities. Therefore, we should refer to congenitally corrected TGA as "ccTGA  
26 complex", referring to this triad of associated malformations that encompasses the ccTGA condition. Therefore  
27 care must be exercised to examine and stratify patients with ccTGA according to other cardiac malformations.  
28 Thus malformations of the left-sided systemic atrioventricular valve are common, seen in 94% of the cases in  
29 Hornung's combined series<sup>87</sup>. This is associated with various degrees of regurgitation severity, and are at least  
30 moderately incompetent<sup>86</sup>. They are mostly caused by incomplete valve tissue lamination and/or displacement of

1 leaflets toward the apex without atrialization of the ventricle. Therefore, referring to such ccTGA defects as  
2 Ebstein anomaly would not be appropriate. Rather this is an “Ebstein-like malformation” in which tricuspid  
3 valve is seen with short and thickened chordae tendineae. Rarer are the associated mitral valve abnormalities  
4 such as cleft mitral valve or abnormal numbers of valve cusps. We hypothesize these associated AV lesions are  
5 directly related with the ccTGA patterning. Since 1995, Morishima and then Yasui established a direct link  
6 between abnormalities of the heart tube looping and AV cushion dysplasia in mouse embryos with right  
7 isomerism induced by retinoic acid<sup>88</sup>. For them, the primitive right ventricle was usually deviated cranially to  
8 various degrees and the AV cushion were abnormal, resulting in unilateral ventricular hypoplasia in some  
9 cases<sup>88</sup>. Similar evidences were noted in chicken hearts treated with retinoic acid<sup>83,84</sup>. In the severely affected  
10 hearts, Bouman *et al.* showed decreased volume of the right ventricular myocardium is associated with  
11 myocardial dysfunction. Together, these morphologic and hemodynamic changes might contribute to abnormal  
12 development of the AV cushion tissue<sup>83</sup>.

13 Ventricular septal defect (VSD) frequently associated with ccTGA is also indicative of the  
14 malalignment between the atrial and ventricular septum due to abnormal atrioventricular connection<sup>89-91</sup>.  
15 Depending on the authors, the prevalence of VSD has been reported as between 60 and 90%<sup>19,86,87</sup>. Clinical  
16 series likely underestimate VSD frequency, since patients with isolated ccTGA usually remain asymptomatic  
17 and undiagnosed for a long time. In contrast, the most severe ccTGA types include associated defects and these  
18 are more common in autopsy series.

19 Chick embryos treated early in development with retinoic acid can show disturbance of cardiac looping  
20 and perturbed formation of the septal components, causing outflow malalignment and increase in septal  
21 defects<sup>31,84</sup>. These findings are supported by 3D reconstructions and may explain correlation of the inflow and  
22 outflow tract malformations and also LVOTO with hemodynamic disturbance arising from defect in ventricular  
23 chamber development. Frequent ccTGA conduction disturbances, such as spontaneous complete heart block may  
24 also result from the malalignment between the atria and inlet ventricular septa related to the wedged position of  
25 the pulmonary outflow tract<sup>92</sup>. This can lead to abnormalities involving the posteriorly positioned AV node that  
26 cannot penetrate the ventricular mass. Instead, in the case of situs solitus, a secondary anteriorly displaced AV  
27 node can give rise to an elongating penetrating bundle that runs through the fibrous trigone and anterior and  
28 superior to the pulmonary valve annulus. This location predisposes the conduction system to spontaneous and  
29 iatrogenic damage such as high-grade AV block and re-entry tachycardias<sup>91</sup>. These findings highlight the ccTGA  
30 phenotypic continuum and provide evidences of the early and complex patterning of this rare CHD.

## 1 **Perspectives**

2 Recent improvements in the genetic field are paving the way to investigate CHD. They will likely transform and  
3 accelerate our understanding of the physiopathology associated with different types of CHD. Traditional  
4 approaches were challenging for rare disorders such as ccTGA, due to extremely small numbers, significant  
5 clinical and genetic heterogeneity and/or multifactorial inheritance. Combined studies using microarray-based  
6 SNP/CNV genotyping and exome sequencing (targeted and then non-targeted) have helped identify many  
7 different cell signaling molecules, transcription factor, components of the extracellular matrix, apical junctions,  
8 cilia and other pathways playing essential roles in patterning the left-right axis and in directing asymmetric  
9 embryonic morphogenesis<sup>93-95</sup>. Over the last 10 years, population based-studies have also shown patients with  
10 non-syndromic CHD carry an exome-wide burden of rare inherited protein-truncating variants, indicating a  
11 potential oligogenic contribution to non-syndromic CHD and their incomplete penetrance<sup>96</sup>. Large-scale cohorts  
12 are beginning to emerge such as the Congenital Heart Disease Genetic Network Study to investigate  
13 relationships between genetic factors, clinical features, and outcomes in CHD, overcoming limitations of small  
14 studies for rare conditions. Together, these recent studies have helped to elucidate the genetic etiology in almost  
15 one-third of familial cases<sup>93-95,97</sup>. More than 500 genes are found related with L-R defects and TGA in mice, and  
16 likely many others remain to be discovered in humans. To better understand the complex genetic basis of  
17 ccTGA, in the future it will be necessary not only to integrate whole exome sequencing with CNV analysis, but  
18 also important is the analysis of noncoding regions<sup>98</sup>. Novel *in silico* tools and/or computational bioinformatic  
19 tools now make possible the interpretation of these noncoding regions. An enrichment of potentially disruptive  
20 regulatory noncoding de novo variants (DNVs) implicated in a fraction of CHD at least as high as that observed  
21 for damaging coding DNVs was recently demonstrated by Richter *et al*, opening the door toward new insights  
22 into the cardiogenetic field<sup>99</sup>. Small and long non-coding RNAs, and micro RNAs remain also to be investigated  
23 for their role in CHD.

## 24 **Conclusion**

25 This review demonstrate the phenotypic complexity of ccTGA and based on the evidence would suggest a  
26 “multiple” hit model. However, clinically silent forms of the disease make more difficult population-based  
27 studies. Rarity and variable penetrance of the cardiac defect also make extensive explorations difficult. Taken  
28 account all the findings reported herein, we support the hypothesis of a multilocus phenotype with environmental  
29 and/or genetic modifiers in determining the ultimate phenotype. Based on the known developmental profile of  
30 early heart development, we suggest ccTGA likely arises early in embryogenesis and involve disturbance of

1 different genes known to participate in the left-right axis establishment and normal cardiovascular development.  
2 The most relevant defect induced by the early pathogenic mechanism would be abnormal heart looping, itself  
3 responsible for the following disorders that define the ccTGA complex.

4

5

6

7 **Ethical approval:** This article does not contain any experiments with animals performed by any of the authors.

8 **Sources of funding:** This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-  
9 profit sectors.

10 **Disclosures and Conflict of interest:** None.

11

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

1 **References:**

- 2 1. Samánek M, Vorísková M. Congenital heart disease among 815,569 children born between 1980 and  
3 1990 and their 15-year survival: a prospective Bohemia survival study. *Pediatr Cardiol*. 1999;20:411–417.
- 4 2. Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JI, Neill CA, Perry LW, Hepner SI, Downing JW.  
5 Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington Infant Study. *Am J Epidemiol*.  
6 1985;121:31–36.
- 7 3. Rokitansky C. Die Defecte der Scheidewande des Herzens. In: Vienna: Braumuller, W. 1875. p.  
8 81–6.
- 9 4. Wilkinson JL, Cochrane AD, Karl TR. Congenital Heart Surgery Nomenclature and Database Project:  
10 corrected (discordant) transposition of the great arteries (and related malformations). *Ann Thorac Surg*.  
11 2000;69:S236-248.
- 12 5. Vanpraagh R, Vanpraagh S, Vlad P, Keith JD. ANATOMIC TYPES OF CONGENITAL  
13 DEXTROCARDIA: DIAGNOSTIC AND EMBRYOLOGIC IMPLICATIONS. *Am J Cardiol*. 1964;13:510–  
14 531.
- 15 6. Houyel L, Van Praagh R, Lacour-Gayet F, Serraf A, Petit J, Bruniaux J, Planché C. Transposition of the  
16 great arteries [S,D,L]. Pathologic anatomy, diagnosis, and surgical management of a newly recognized complex.  
17 *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110:613–624.
- 18 7. Warnes CA. Congenitally corrected transposition: the uncorrected misnomer. *J Am Coll Cardiol*.  
19 1996;27:1244–1245.
- 20 8. Monie IW, Takacs E, Warkany J. Transposition of the great vessels and other cardiovascular  
21 abnormalities in rat fetuses induced by trypan blue. *Anat Rec*. 1966;156:175–190.
- 22 9. Pexieder T, Blanc O, Pelouch V, et al. Late fetal development of retinoic acid-induced transposition of  
23 great arteries: morphology, physiology, and biochemistry. In: *Developmental Mechanisms of Heart Disease*.  
24 1995. p. 297–307.
- 25 10. Cipollone D, Amati F, Carsetti R, Placidi S, Biancolella M, D'Amati G, Novelli G, Siracusa G, Marino  
26 B. A multiple retinoic acid antagonist induces conotruncal anomalies, including transposition of the great  
27 arteries, in mice. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2006;15:194–202.
- 28 11. Yasui H, Nakazawa M, Morishima M, Miyagawa-Tomita S, Momma K. Morphological observations on  
29 the pathogenetic process of transposition of the great arteries induced by retinoic acid in mice. *Circulation*.  
30 1995;91:2478–2486.

- 1 12. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Retinoic acid signalling in the development of branchial arches.  
2 *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14:591–598.
- 3 13. Tsukui T, Capdevila J, Tamura K, Ruiz-Lozano P, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Magallón J,  
4 Chandraratna RA, Chien K, Blumberg B, Evans RM, Belmonte JC. Multiple left-right asymmetry defects in  
5 *Shh(-/-)* mutant mice unveil a convergence of the *shh* and retinoic acid pathways in the control of *Lefty-1*. *Proc*  
6 *Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11376–11381.
- 7 14. Nemer G, Nemer M. Regulation of heart development and function through combinatorial interactions  
8 of transcription factors. *Ann Med.* 2001;33:604–610.
- 9 15. Sepulveda JL, Belaguli N, Nigam V, Chen C-Y, Nemer M, Schwartz RJ. GATA-4 and Nkx-2.5  
10 Coactivate Nkx-2 DNA Binding Targets: Role for Regulating Early Cardiac Gene Expression. *Mol Cell Biol.*  
11 1998;18:3405–3415.
- 12 16. Clark EB. Mechanism in the pathogenesis of congenital cardiac malformations. *Genet. Cardiovasc. Dis.*  
13 1986;pp 3–11.
- 14 17. Clark EB. Pathogenetic mechanisms of congenital cardiovascular malformations revisited. *Semin*  
15 *Perinatol.* 1996;20:465–472.
- 16 18. Rutledge JM, Nihill MR, Fraser CD, Smith OE, McMahon CJ, Bezold LI. Outcome of 121 Patients  
17 with Congenitally Corrected Transposition of the Great Arteries. *Pediatr Cardiol.* 2002;23:137–145.
- 18 19. Arribard N, Mostefa Kara M, Hascoët S, Bessières B, Bonnet D, Houyel L. Congenitally corrected  
19 transposition of the great arteries: is it really a transposition? An anatomical study of the right ventricular septal  
20 surface. *J Anat.* 2020;236:325–333.
- 21 20. Al-Zahrani RS, Alharbi SH, Tuwajjri RMA, Alzomaili BT, Althubaiti A, Yelbuz TM. Transposition of  
22 the great arteries: A laterality defect in the group of heterotaxy syndromes or an outflow tract malformation? *Ann*  
23 *Pediatr Cardiol.* 2018;11:237–249.
- 24 21. Jacobs JP, Anderson RH, Weinberg PM, Walters HL, Tchervenkov CI, Del Duca D, Franklin RCG,  
25 Aiello VD, Béland MJ, Colan SD, Gaynor JW, Krogmann ON, Kurosawa H, Maruszewski B, Stellin G, Elliott  
26 MJ. The nomenclature, definition and classification of cardiac structures in the setting of heterotaxy. *Cardiol*  
27 *Young.* 2007;17 Suppl 2:1–28.
- 28 22. Lin AE, Krikov S, Riehle-Colarusso T, Frías JL, Belmont J, Anderka M, Geva T, Getz KD, Botto LD.  
29 Laterality Defects in the National Birth Defects Prevention Study (1998–2007): Birth Prevalence and  
30 Descriptive Epidemiology. *Am J Med Genet A.* 2014;0:2581–2591.

- 1 23. Kuehl KS, Loffredo CA. Population-based study of l-transposition of the great arteries: possible  
2 associations with environmental factors. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2003;67:162–167.
- 3 24. Ware SM, Peng J, Zhu L, Fernbach S, Colicos S, Casey B, Towbin J, Belmont JW. Identification and  
4 functional analysis of ZIC3 mutations in heterotaxy and related congenital heart defects. *Am J Hum Genet.*  
5 2004;74:93–105.
- 6 25. Mah Kandice, Friedberg Mark K. Congenitally Corrected Transposition of the Great Arteries. *Circ*  
7 *Cardiovasc Imaging.* 2014;7:849–851.
- 8 26. Morelli SH, Young L, Reid B, Ruttenberg H, Bamshad MJ. Clinical analysis of families with heart,  
9 midline, and laterality defects. *Am J Med Genet.* 2001;101:388–392.
- 10 27. Icardo JM, Sanchez de Vega MJ. Spectrum of heart malformations in mice with situs solitus, situs  
11 inversus, and associated visceral heterotaxy. *Circulation.* 1991;84:2547–2558.
- 12 28. Yu Q, Shen Y, Chatterjee B, Siegfried BH, Leatherbury L, Rosenthal J, Lucas JF, Wessels A, Spurney  
13 CF, Wu Y-J, Kirby ML, Svenson K, Lo CW. ENU induced mutations causing congenital cardiovascular  
14 anomalies. *Dev Camb Engl.* 2004;131:6211–6223.
- 15 29. Shen Y, Leatherbury L, Rosenthal J, Yu Q, Pappas MA, Wessels A, Lucas J, Siegfried B, Chatterjee B,  
16 Svenson K, Lo CW. Cardiovascular phenotyping of fetal mice by noninvasive high-frequency ultrasound  
17 facilitates recovery of ENU-induced mutations causing congenital cardiac and extracardiac defects. *Physiol*  
18 *Genomics.* 2005;24:23–36.
- 19 30. Casey B. Two Rights Make a Wrong: Human Left-Right Malformations. *Hum Mol Genet.*  
20 1998;7:1565–1565.
- 21 31. Ramsdell AF. Left–right asymmetry and congenital cardiac defects: Getting to the heart of the matter in  
22 vertebrate left–right axis determination. *Dev Biol.* 2005;288:1–20.
- 23 32. De Luca A, Sarkozy A, Consoli F, Ferese R, Guida V, Dentici ML, Mingarelli R, Bellacchio E, Tuo G,  
24 Limongelli G, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. Familial transposition of the great arteries caused by  
25 multiple mutations in laterality genes. *Heart Br Card Soc.* 2010;96:673–677.
- 26 33. Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Saplakoglu U, dela Cruz J, Splitt M, Goodship JA, Towbin J,  
27 Bowers P, Ferrero GB, Marino B, Schier AF, Shen MM, Muenke M, Casey B. Loss-of-function mutations in the  
28 EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet.* 2000;26:365–369.
- 29 34. Tierney ESS, Marans Z, Rutkin MB, Chung WK. Variants of the CFC1 gene in patients with laterality  
30 defects associated with congenital cardiac disease. *Cardiol Young.* 2007;17:268–274.

- 1 35. Ozcelik C, Bit-Avragim N, Panek A, Gaio U, Geier C, Lange PE, Dietz R, Posch MG, Perrot A, Stiller  
2 B. Mutations in the EGF-CFC gene cryptic are an infrequent cause of congenital heart disease. *Pediatr Cardiol.*  
3 2006;27:695–698.
- 4 36. Mégarbané A, Salem N, Stephan E, Ashoush R, Lenoir D, Delague V, Kassab R, Loiselet J, Bouvagnet  
5 P. X-linked transposition of the great arteries and incomplete penetrance among males with a nonsense mutation  
6 in ZIC3. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2000;8:704–708.
- 7 37. Gebbia M, Ferrero GB, Pilia G, Bassi MT, Aylsworth A, Penman-Splitt M, Bird LM, Bamforth JS,  
8 Burn J, Schlessinger D, Nelson DL, Casey B. X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat*  
9 *Genet.* 1997;17:305–308.
- 10 38. Ferrero GB, Gebbia M, Pilia G, Witte D, Peier A, Hopkin RJ, Craigen WJ, Shaffer LG, Schlessinger D,  
11 Ballabio A, Casey B. A submicroscopic deletion in Xq26 associated with familial situs ambiguus. *Am J Hum*  
12 *Genet.* 1997;61:395–401.
- 13 39. Kosaki R, Gebbia M, Kosaki K, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, Casey B. Left-right axis  
14 malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am J Med*  
15 *Genet.* 1999;82:70–76.
- 16 40. Ma L, Tierney ESS, Lee T, Lanzano P, Chung WK. Mutations in ZIC3 and ACVR2B are a common  
17 cause of heterotaxy and associated cardiovascular anomalies. *Cardiol Young.* 2012;22:194–201.
- 18 41. Mohapatra B, Casey B, Li H, Ho-Dawson T, Smith L, Fernbach SD, Molinari L, Niesh SR, Jefferies JL,  
19 Craigen WJ, Towbin JA, Belmont JW, Ware SM. Identification and functional characterization of NODAL rare  
20 variants in heterotaxy and isolated cardiovascular malformations. *Hum Mol Genet.* 2009;18:861–871.
- 21 42. De Luca A, Sarkozy A, Consoli F, Ferese R, Guida V, Dentici ML, Mingarelli R, Bellacchio E, Tuo G,  
22 Limongelli G, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. Familial transposition of the great arteries caused by  
23 multiple mutations in laterality genes. *Heart Br Card Soc.* 2010;96:673–677.
- 24 43. Muncke Nadja, Jung Christine, Rüdiger Heinz, Ulmer Herbert, Roeth Ralph, Hubert Annette,  
25 Goldmuntz Elizabeth, Driscoll Deborah, Goodship Judith, Schön Karin, Rappold Gudrun. Missense Mutations  
26 and Gene Interruption in PROSIT240, a Novel TRAP240-Like Gene, in Patients With Congenital Heart Defect  
27 (Transposition of the Great Arteries). *Circulation.* 2003;108:2843–2850.
- 28 44. Guimier A, Gabriel GC, Bajolle F, Tsang M, Liu H, Noll A, Schwartz M, El Malti R, Smith LD, Klana  
29 NT, Jimenez G, Miller NA, Oufadem M, Moreau de Bellaing A, Yagi H, Saunders CJ, Baker CN, Di Filippo S,  
30 Peterson KA, Thiffault I, Bole-Feysot C, Cooley LD, Farrow EG, Masson C, Schoen P, Deleuze J-F, Nitschké P,

- 1 Lyonnet S, de Pontual L, Murray SA, Bonnet D, Kingsmore SF, Amiel J, Bouvagnet P, Lo CW, Gordon CT.  
2 MMP21 is mutated in human heterotaxy and is required for normal left-right asymmetry in vertebrates. *Nat*  
3 *Genet.* 2015;47:1260–1263.
- 4 45. Bon BWM van, Koolen DA, Pfundt R, Burgt I van der, Leeuw N de, Vries BBA de. Transposition of  
5 the great vessels in a patient with a 2.9 Mb interstitial deletion of 9q31.1 encompassing the inversin gene:  
6 Clinical report and review. *Am J Med Genet A.* 2008;146A:1225–1229.
- 7 46. French VM, van de Laar IMBH, Wessels MW, Rohe C, Roos-Hesselink JW, Wang G, Frohn-Mulder  
8 IME, Severijnen L-A, de Graaf BM, Schot R, Breedveld G, Mientjes E, van Tienhoven M, Jadot E, Jiang Z,  
9 Verkerk A, Swagemakers S, Venselaar H, Rahimi Z, Najmabadi H, Meijers-Heijboer H, de Graaff E, Helbing  
10 WA, Willemsen R, Devriendt K, Belmont JW, Oostra BA, Amack JD, Bertoli-Avella AM. NPHP4 Variants are  
11 Associated with Pleiotropic Heart Malformations. *Circ Res.* 2012;110:1564–1574.
- 12 47. Roessler E, Pei W, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Veléz JI, Banerjee-Basu S, Gibney G, Lupo PJ,  
13 Mitchell LE, Towbin JA, Bowers P, Belmont JW, Goldmuntz E, Baxevanis AD, Feldman B, Muenke M.  
14 Cumulative ligand activity of NODAL mutations and modifiers are linked to human heart defects and  
15 holoprosencephaly. *Mol Genet Metab.* 2009;98:225–234.
- 16 48. Perles Z, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Einbinder T, Rein AJJT, Elpeleg O. A human laterality  
17 disorder associated with recessive CCDC11 mutation. *J Med Genet.* 2012;49:386–390.
- 18 49. Twigg SRF, Lloyd D, Jenkins D, Elçioğlu NE, Cooper CDO, Al-Sannaa N, Annagür A, Gillissen-  
19 Kaesbach G, Hüning I, Knight SJL, Goodship JA, Keavney BD, Beales PL, Gileadi O, McGowan SJ, Wilkie  
20 AOM. Mutations in multidomain protein MEGF8 identify a Carpenter syndrome subtype associated with  
21 defective lateralization. *Am J Hum Genet.* 2012;91:897–905.
- 22 50. Sperling S, Grimm CH, Dunkel I, Mebus S, Sperling H-P, Ebner A, Galli R, Lehrach H, Fusch C,  
23 Berger F, Hammer S. Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital  
24 heart defects. *Hum Mutat.* 2005;26:575–582.
- 25 51. Fakhro KA, Choi M, Ware SM, Belmont JW, Towbin JA, Lifton RP, Khokha MK, Brueckner M. Rare  
26 copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning. *Proc*  
27 *Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:2915–2920.
- 28 52. Karkera JD, Lee JS, Roessler E, Banerjee-Basu S, Ouspenskaia MV, Mez J, Goldmuntz E, Bowers P,  
29 Towbin J, Belmont JW, Baxevanis AD, Schier AF, Muenke M. Loss-of-function mutations in growth  
30 differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet.*

- 1 2007;81:987–994.
- 2 53. Kaasinen E, Aittomäki K, Eronen M, Vahteristo P, Karhu A, Mecklin J-P, Kajantie E, Aaltonen LA,  
3 Lehtonen R. Recessively inherited right atrial isomerism caused by mutations in growth/differentiation factor 1  
4 (GDF1). *Hum Mol Genet.* 2010;19:2747–2753.
- 5 54. Casey B, Cuneo BF, Vitali C, van Hecke H, Barrish J, Hicks J, Ballabio A, Hoo JJ. Autosomal  
6 dominant transmission of familial laterality defects. *Am J Med Genet.* 1996;61:325–328.
- 7 55. Casey B. Two rights make a wrong: human left-right malformations. *Hum Mol Genet.* 1998;7:1565–  
8 1571.
- 9 56. Nomura M, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial  
10 development. *Nature.* 1998;393:786–790.
- 11 57. Oh SP, Li E. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning  
12 and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev.* 1997;11:1812–1826.
- 13 58. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, Noji S, Kondoh H, Hamada H. lefty-1  
14 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell.* 1998;94:287–297.
- 15 59. Seo J W, Brown N A, Ho S Y, Anderson R H. Abnormal laterality and congenital cardiac anomalies.  
16 Relations of visceral and cardiac morphologies in the iv/iv mouse. *Circulation.* 1992;86:642–650.
- 17 60. Cota CD, Bagher P, Pelc P, Smith CO, Bodner CR, Gunn TM. Mice with mutations in Mahogunin ring  
18 finger-1 (Mgrr1) exhibit abnormal patterning of the left–right axis. *Dev Dyn.* 2006;235:3438–3447.
- 19 61. Zhang Z, Alpert D, Francis R, Chatterjee B, Yu Q, Tansey T, Sabol SL, Cui C, Bai Y, Koriabine M,  
20 Yoshinaga Y, Cheng J-F, Chen F, Martin J, Schackwitz W, Gunn TM, Kramer KL, De Jong PJ, Pennacchio LA,  
21 Lo CW. Massively parallel sequencing identifies the gene *Megf8* with ENU-induced mutation causing  
22 heterotaxy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:3219–3224.
- 23 62. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Woodrow Benson D, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients  
24 with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1650–1655.
- 25 63. Tariq M, Belmont JW, Lalani S, Smolarek T, Ware SM. SHROOM3 is a novel candidate for heterotaxy  
26 identified by whole exome sequencing. *Genome Biol.* 2011;12:R91.
- 27 64. Schön P, Tsuchiya K, Lenoir D, Mochizuki T, Guichard C, Takai S, Maiti AK, Nihei H, Weil J,  
28 Yokoyama T, Bouvagnet P. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis  
29 of the human *INV* gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary  
30 atresia. *Hum Genet.* 2002;110:157–165.

- 1 65. Reuter MS, Chaturvedi RR, Liston E, Manshaei R, Aul RB, Bowdin S, Cohn I, Curtis M, Dhir P,  
2 Hayeems RZ, Hosseini SM, Khan R, Ly LG, Marshall CR, Mertens L, Okello JBA, Pereira SL, Raajkumar A,  
3 Seed M, Thiruvahindrapuram B, Scherer SW, Kim RH, Jobling RK. The Cardiac Genome Clinic: implementing  
4 genome sequencing in pediatric heart disease. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2020;22:1015–1024.
- 5 66. Franklin RCG, Béland MJ, Colan SD, Walters HL, Aiello VD, Anderson RH, Bailliard F, Boris JR,  
6 Cohen MS, Gaynor JW, Guleserian KJ, Houyel L, Jacobs ML, Juraszek AL, Krogmann ON, Kurosawa H, Lopez  
7 L, Maruszewski BJ, Louis JDS, Seslar SP, Srivastava S, Stellin G, Tchervenkov CI, Weinberg PM, Jacobs JP.  
8 Nomenclature for congenital and paediatric cardiac disease: the International Paediatric and Congenital Cardiac  
9 Code (IPCCC) and the Eleventh Iteration of the International Classification of Diseases (ICD-11)\*. *Cardiol*  
10 *Young.* 2017;27:1872–1938.
- 11 67. Digilio MC, Casey B, Toscano A, Calabrò R, Pacileo G, Marasini M, Banaudi E, Giannotti A,  
12 Dallapiccola B, Marino B. Complete transposition of the great arteries: patterns of congenital heart disease in  
13 familial precurrence. *Circulation.* 2001;104:2809–2814.
- 14 68. Piacentini G, Digilio MC, Capolino R, Zorzi AD, Toscano A, Sarkozy A, D'Agostino R, Marasini M,  
15 Russo MG, Dallapiccola B, Marino B. Familial recurrence of heart defects in subjects with congenitally  
16 corrected transposition of the great arteries. *Am J Med Genet A.* 2005;137:176–180.
- 17 69. Unolt M. Transposition of great arteries: new insights into the pathogenesis. *Front Pediatr* [Internet].  
18 2013 [cited 2018 Aug 21];1. Available from:  
19 <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2013.00011/abstract>
- 20 70. Houyel L, Khoshnood B, Anderson RH, Lelong N, Thieulin A-C, Goffinet F, Bonnet D, EPICARD  
21 Study group. Population-based evaluation of a suggested anatomic and clinical classification of congenital heart  
22 defects based on the International Paediatric and Congenital Cardiac Code. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:64.
- 23 71. Bajolle F, Zaffran S, Kelly RG, Hadchouel J, Bonnet D, Brown NA, Buckingham ME. Rotation of the  
24 myocardial wall of the outflow tract is implicated in the normal positioning of the great arteries. *Circ Res.*  
25 2006;98:421–428.
- 26 72. Brida M, Diller G-P, Gatzoulis MA. Systemic Right Ventricle in Adults With Congenital Heart  
27 Disease: Anatomic and Phenotypic Spectrum and Current Approach to Management. *Circulation.*  
28 2018;137:508–518.
- 29 73. Diller G-P, Radojevic J, Kempny A, Alonso-Gonzalez R, Emmanouil L, Orwat S, Swan L, Uebing A,  
30 Li W, Dimopoulos K, Gatzoulis MA, Baumgartner H. Systemic right ventricular longitudinal strain is reduced in

- 1 adults with transposition of the great arteries, relates to subpulmonary ventricular function, and predicts adverse  
2 clinical outcome. *Am Heart J.* 2012;163:859–866.
- 3 74. Grothoff M, Fleischer A, Abdul-Khaliq H, Hoffmann J, Lehmkuhl L, Luecke C, Gutberlet M. The  
4 systemic right ventricle in congenitally corrected transposition of the great arteries is different from the right  
5 ventricle in dextro-transposition after atrial switch: a cardiac magnetic resonance study. *Cardiol Young.*  
6 2013;23:239–247.
- 7 75. Gill HK, Splitt M, Sharland GK, Simpson JM. Patterns of recurrence of congenital heart disease: An  
8 analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography. *J Am Coll Cardiol.*  
9 2003;42:923–929.
- 10 76. Ferencz C. Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations: The  
11 Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989. *Perspect Pediatr Cardiol.* 1997;5:346–347.
- 12 77. Becker TA, Van Amber R, Moller JH, Pierpont ME. Occurrence of cardiac malformations in relatives  
13 of children with transposition of the great arteries. *Am J Med Genet.* 1996;66:28–32.
- 14 78. Therrien J, Barnes I, Somerville J. Outcome of pregnancy in patients with congenitally corrected  
15 transposition of the great arteries. *Am J Cardiol.* 1999;84:820–824.
- 16 79. Connolly HM, Grogan M, Warnes CA. Pregnancy among women with congenitally corrected  
17 transposition of great arteries. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:1692–1695.
- 18 80. Brodwall K, Greve G, Leirgul E, Tell GS, Vollset SE, Øyen N. Recurrence of congenital heart defects  
19 among siblings—a nationwide study. *Am J Med Genet A.* 2017;173:1575–1585.
- 20 81. Weber M, Schweitzer M, Andre JM, Tridon P, Vert P. [Epilepsy, anticonvulsants and pregnancy]. *Arch*  
21 *Fr Pediatr.* 1977;34:374–383.
- 22 82. Rowland TW, Hubbell JP, Nadas AS. Congenital heart disease in infants of diabetic mothers. *J Pediatr.*  
23 1973;83:815–820.
- 24 83. Bouman HGA, Broekhuizen MLA, Baasten AMJ, Groot ACG-D, Wenink ACG. Stereological study of  
25 stage 34 chicken hearts with looping disturbances after retinoic acid treatment: Disturbed growth of myocardium  
26 and atrioventricular cushion tissue. *Anat Rec.* 1997;248:242–250.
- 27 84. Bouman HGA, Broekhuizen MLA, Baasten AMJ, Groot ACG-D, Wenink ACG. Spectrum of looping  
28 disturbances in stage 34 chicken hearts after retinoic acid treatment. *Anat Rec.* 1995;243:101–108.
- 29 85. Bouman HGA, Broekhuizen MLA, Baasten AMJ, Groot ACG-D, Wenink ACG. Diminished growth of  
30 atrioventricular cushion tissue in stage 24 retinoic acid-treated chicken embryos. *Dev Dyn.* 1998;213:50–58.

- 1 86. Lundstrom U, Bull C, Wyse RKH, Somerville J. The natural and “unnatural” history of congenitally  
2 corrected transposition. *Am J Cardiol.* 1990;65:1222–1229.
- 3 87. Hornung TS, Calder L. Congenitally corrected transposition of the great arteries. *Heart.* 2010;96:1154–  
4 1161.
- 5 88. Yasui H, Morishima M, Nakazawa M, Aikawa E. Anomalous looping, atrioventricular cushion  
6 dysplasia, and unilateral ventricular hypoplasia in the mouse embryos with right isomerism induced by retinoic  
7 acid. *Anat Rec.* 1998;250:210–219.
- 8 89. Wallis GA, Debich-Spicer D, Anderson RH. Congenitally corrected transposition. *Orphanet J Rare Dis.*  
9 2011;6:22.
- 10 90. Allwork SP, Bentall HH, Becker AE, Cameron H, Gerlis LM, Wilkinson JL, Anderson RH.  
11 Congenitally corrected transposition of the great arteries: Morphologic study of 32 cases. *Am J Cardiol.*  
12 1976;38:910–923.
- 13 91. Anderson RH, Becker AE, Arnold R, Wilkinson JL. The conducting tissues in congenitally corrected  
14 transposition. *Circulation.* 1974;50:911–923.
- 15 92. Hosseinpour A-R, McCarthy KP, Griselli M, Sethia B, Ho SY. Congenitally corrected transposition:  
16 size of the pulmonary trunk and septal malalignment. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:2163–2166.
- 17 93. Jia Y, Louw JJ, Breckpot J, Callewaert B, Barrea C, Sznajer Y, Gewillig M, Souche E, Dehaspe L,  
18 Vermeesch JR, Lambrechts D, Devriendt K, Corveleyn A. The diagnostic value of next generation sequencing in  
19 familial nonsyndromic congenital heart defects. *Am J Med Genet A.* 2015;167A:1822–1829.
- 20 94. Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Dunwoodie SL, Ho JWK, Hilton DCK, White SM, Sholler GF,  
21 Harvey RP, Winlaw DS. Targeted next-generation sequencing identifies pathogenic variants in familial  
22 congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:2498–2506.
- 23 95. Szot Justin O., Cuny Hartmut, Blue Gillian M., Humphreys David T., Ip Eddie, Harrison Katrina,  
24 Sholler Gary F., Giannoulatou Eleni, Leo Paul, Duncan Emma L., Sparrow Duncan B., Ho Joshua W.K.,  
25 Graham Robert M., Pachter Nicholas, Chapman Gavin, Winlaw David S., Dunwoodie Sally L. A Screening  
26 Approach to Identify Clinically Actionable Variants Causing Congenital Heart Disease in Exome Data. *Circ*  
27 *Genomic Precis Med.* 2018;11:e001978.
- 28 96. Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR, Zeng X, Qi H, Chang W, Sierant MC, Hung  
29 W-C, Haider S, Zhang J, Knight J, Bjornson RD, Castaldi C, Tikhonova IR, Bilguvar K, Mane SM, Sanders SJ,  
30 Mital S, Russell MW, Gaynor JW, Deanfield J, Giardini A, Porter GA, Srivastava D, Lo CW, Shen Y, Watkins

- 1 WS, Yandell M, Yost HJ, Tristani-Firouzi M, Newburger JW, Roberts AE, Kim R, Zhao H, Kaltman JR,  
2 Goldmuntz E, Chung WK, Seidman JG, Gelb BD, Seidman CE, Lifton RP, Brueckner M. Contribution of rare  
3 inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat Genet.* 2017;49:1593–1601.
- 4 97. LaHaye S, Corsmeier D, Basu M, Bowman JL, Fitzgerald-Butt S, Zender G, Bosse K, McBride KL,  
5 White P, Garg V. Utilization of Whole Exome Sequencing to Identify Causative Mutations in Familial  
6 Congenital Heart Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2016;9:320–329.
- 7 98. Akhirome E, Walton NA, Noguee JM, Jay PY. The Complex Genetic Basis of Congenital Heart Defects.  
8 *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2017;81:629–634.
- 9 99. Richter F, Morton SU, Kim SW, Kitaygorodsky A, Wasson LK, Chen KM, Zhou J, Qi H, Patel N,  
10 DePalma SR, Parfenov M, Homsy J, Gorham JM, Manheimer KB, Velinder M, Farrell A, Marth G, Schadt EE,  
11 Kaltman JR, Newburger JW, Giardini A, Goldmuntz E, Brueckner M, Kim R, Porter GA, Bernstein D, Chung  
12 WK, Srivastava D, Tristani-Firouzi M, Troyanskaya OG, Dickel DE, Shen Y, Seidman JG, Seidman CE, Gelb  
13 BD. Genomic analyses implicate noncoding de novo variants in congenital heart disease. *Nat Genet.* 2020.
- 14

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disseminated.

1 **Table 1: Genes reported in ccTGA patients**

<b>Gene</b>	<b>OMIM</b>	<b>Molecular Pathway</b>	<b>Reference</b>
<i>NODAL</i>	601265	NODAL signaling	Mohaptra <i>et al.</i> , 2009 <sup>41</sup>
<i>NKX2.5</i>	600584	Transcription factor	McElhinney <i>et al.</i> , 2003 <sup>62</sup>
<i>SHROOM3</i>	604570	Cytoskeletal regulation	Tariq <i>et al.</i> , 2011 <sup>63</sup>
<i>INVS</i>	243305	Cilia component	Schön <i>et al.</i> , 2002 <sup>64</sup>
<i>NPHP4</i>	607215	Cilia component	French <i>et al.</i> , 2012 <sup>46</sup>
<i>ACVR2B</i>	602730	NODAL signaling	Kosaki <i>et al.</i> , 1999 <sup>39</sup>
<i>MMP21</i>	608416	Extracellular matrix	Guimier <i>et al.</i> , 2015 <sup>44</sup>
<i>ZIC3</i>	300265	Transcription factor	Ware <i>et al.</i> , 2004 <sup>24</sup>
<i>UBXN10</i>	616783	Ciliogenesis	Reuter <i>et al.</i> , 2020 <sup>65</sup>

2

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

## V. Objectifs et déroulement de la thèse

Le travail de recherche conduit au cours de cette thèse s'est déroulé « **de l'homme à la souris** » afin d'identifier de nouveaux **gènes responsables de malformations cardiaques et d'anomalies de la latéralisation G-D**, et d'en étudier les mécanismes moléculaires et physiopathologiques. Il a débuté par l'étude de cas familiaux présentant une récurrence de malformations cardiaques congénitales au fil des générations. Grâce à une **stratégie combinée d'identification de gènes candidats** associant analyse de liaison et séquençage exomique (WES), j'ai contribué à plusieurs projets au sein des laboratoires de recherche de Lyon (France) et de Pittsburgh (USA) pour proposer de nouveaux gènes responsables de CC et en démontrer la causalité en apportant des **données fonctionnelles** (étude histochimique par immunofluorescence,...) et en développant des **modèles animaux** notamment murins. Les différents projets auxquels j'ai contribué, soit par l'analyse des données bioinformatiques, soit lors des manipulations en paillasse pour les études fonctionnelles et les modèles animaux ont fait l'objet de **plusieurs manuscrits soumis et/ou publiés**. Ces travaux seront présentés successivement dans les chapitres de résultats de la thèse.

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

Dans ce chapitre Matériel et Méthodes, je décrirai principalement les techniques de **séquençage exomique** qui ont fait l'objet du début de chacun de mes travaux pendant cette thèse que ce soit dans le **laboratoire de Lyon** en France (HCL, Groupement Hospitalier Est) ou celui de **Pittsburgh** (Département de Biologie développemental, Dr Lo) lors de mon année de mobilité internationale aux États-Unis.

Plusieurs familles, remarquables par leur récurrence de malformations cardiaques isolées au fil des générations ou par leur consanguinité, ont été identifiées. Une approche combinée de **clonage positionnel** associant analyse de liaison et séquençage exomique a été réalisée dans ces familles à forte probabilité de **maladie monogénique**. Les prélèvements sanguins des patients et de leurs apparentés sains, utilisés dans ces travaux, ont été collectés après obtention des **consentements éclairés** des majeurs ou des parents des mineurs.

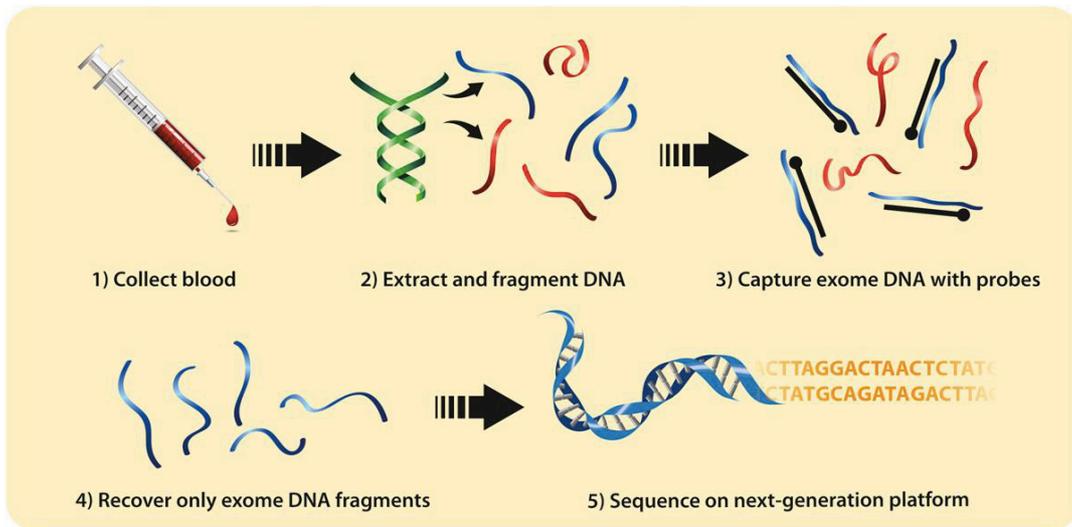
Le génotypage réalisé sur plus de 500 000 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) répartis sur l'ensemble des chromosomes a permis de réaliser des **analyses de liaison** et de déterminer pour chaque famille les régions du génome où la mutation causale de la maladie devait se trouver (régions chromosomiques similaires entre les cas familiaux et les homozygotes) et les régions au contraire où la mutation ne pouvait pas se situer en se servant des résultats des analyses paramétriques et non paramétriques préalables.

Le **séquençage à haut débit** (NGS, Next Generation Sequencing) des exomes entiers (WES, Whole Exome Sequencing) cible uniquement la **partie codante du génome**, soit environ 1,2% du génome humain (exons des 20 000 gènes codant une protéine) mais permet un séquençage massif en parallèle en quelques jours.

L'ADN génomique est extrait et fragmenté à partir d'un échantillon de sang avant d'être ligué à des adaptateurs spécifiques de séquençage possédant un index de reconnaissance de l'échantillon. Les séquences exoniques obtenues sont amplifiées par PCR puis hybridées avec des sondes nucléiques couvrant les régions d'intérêt du génome, qui seront finalement capturées pour être séquencées. Le séquençage inclue une étape d'amplification clonale puis un séquençage en temps réel base après base générant un signal fluorescent dont la lecture automatisée permet de reconstituer les séquences d'ADN (un signal fluorescent associé à chacun des quatre nucléotides de l'ADN, base calling) (Figure 15).

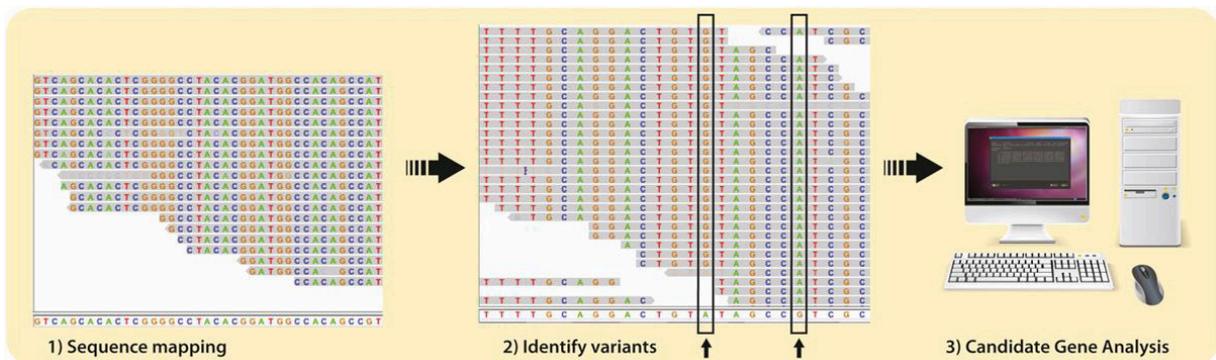
Les données extraites de ce séquençage sont traitées en bioinformatique par des « pipelines » permettant l'alignement de la séquence au génome de référence (mapping). La séquence alignée est ensuite comparée à l'ADN de référence pour détecter des variations et

annoter les variants (variant calling) (Figure 16). Ces derniers sont ensuite analysés en interrogeant notamment des bases de données publiques afin d'identifier parmi les nombreux variants retrouvés ceux ayant une signification dans le phénotype clinique des patients. Classiquement, environ **20 000 variants codants** sont initialement obtenus à l'issue du WES. Après comparaison avec les **bases de données** telles que Single Nuclotide Polymorphism database (dbSNP), 1000 Genomes Project, Exome Variant Server (EVS), Human Gene Mutation Database (HGMD) ou encore Exome Aggregation consortium (ExAC) qui regroupe les données de plus de 60 000 exomes (adultes sains et atteints de maladies communes), seuls 200 variants rares (définis par une fréquence **Minor Allele Frequency** <1% chez les contrôles) sont véritablement considérés pour la suite de l'analyse bioinformatique (Figure 17). D'autres **filtres** vont alors être appliqués dont la nature moléculaire des variants (mutation stop, mutation dans des séquences conservées au fil de l'évolution et des espèces,...) et leur répercussion biologique. Des **logiciels in silico** comme SIFT, Mutation Taster et Polyphen 2 peuvent en particulier aider pour ces prédictions fonctionnelles (impact sur la structure et la fonction de la protéine). L'étude de la **conservation entre les espèces** (phylogénie) de la séquence nucléotidique et peptidique des variants suspects grâce à des bases de données d'alignement peut être réalisée. La consultation des **atlas d'expression protéique** permet d'identifier les tissus où les gènes identifiés sont les plus exprimés dans l'organisme. La construction de modèles en 3 dimensions de la protéine altérée peut permettre d'observer sa conformation tertiaire modifiée et de voir le type de site protéique atteint par la mutation. Par ailleurs, le **mode de transmission** attendu peut permettre de filtrer les mutations hétérozygotes (transmission autosomique dominante) versus homozygotes ainsi que celles héritées versus de novo chez le cas index. Enfin, en cas d'analyse de liaison préalable dans la famille, la recherche de mutation causale peut être focalisée dans certaines **régions cibles** du génome.



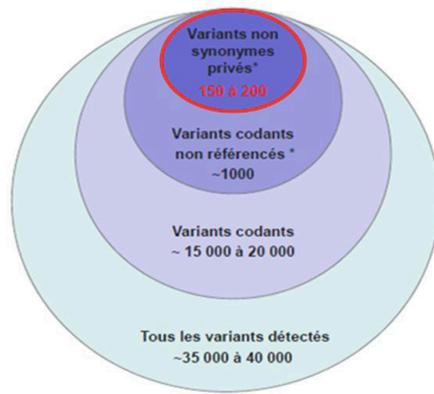
**Figure 15** : Principales étapes du séquençage haut débit

D'après Paria (Paria et al. 2013). A partir d'un échantillon de sang, l'ADN est finement fragmenté pour être hybridé avec des séquences nucléiques couvrant les régions d'intérêt du génome. Celles-ci sont ensuite capturées, amplifiées puis séquencées en quelques heures.



**Figure 16** : Workflow du travail de bioinformatique post-WES

D'après Paria (Paria et al. 2013). Les séquences codantes obtenues au décours du WES sont alignées sur le génome de référence (mapping) puis les variants annotés. Ceux-ci seront ensuite filtrés suivant de nombreuses bases de données publiques et des critères préalablement fixés (mode de transmission, effet sur la protéine, fréquence dans la population contrôle,...).



**Figure 17** : Etapes de filtration des variants obtenus après séquençage exomique

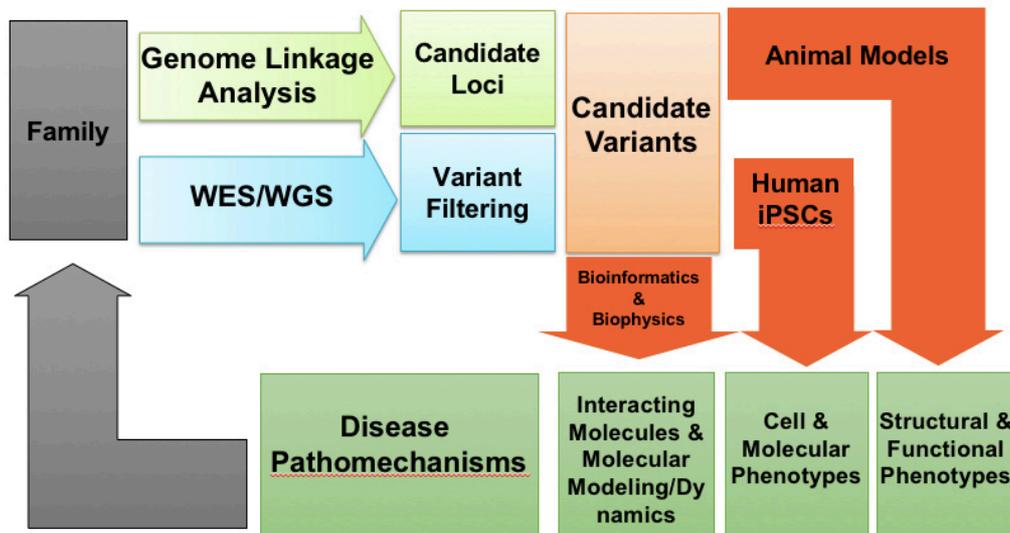
Les gènes candidats suspectés à l'issue du travail de WES peuvent ensuite être confortés par **l'analyse de la ségrégation** du ou des allèles mutés au sein de la famille. Le séquençage de la mutation peut lui être confirmé par **analyse manuelle de Sanger**.

Les études de WES peuvent être réalisées sur une large cohorte de patients exprimant le même phénotype clinique (même MCC par exemple) ou à l'échelle d'une famille (étude de trio avec parents sains-enfant atteint ou analyse de transmission de la maladie au sein d'une fratrie ou au fil des générations). L'une ou l'autre des stratégies a été utilisée dans les différents travaux présentés ci-après. L'hypothèse du mode d'hérédité de la MCC oriente le choix et le nombre d'individus séquencés.

Les **effets des mutations** mises en évidence dans cette première partie des études ont ensuite fait l'objet d'analyses fonctionnelles à l'aide de divers modèles selon les travaux (culture cellulaire, modèles animaux,..) afin de démontrer la pathogénicité du ou des variants identifiés (Figure 18).

J'ai en particulier travaillé sur des **analyses histochimiques** réalisées sur des cellules souches embryonnaires issus de souris ou de patients. J'ai également participé au diagnostic prénatal d'embryons de souris en réalisant des échocardiographies à différents stades embryonnaires à la recherche de MCC parmi les mutants. Le dépistage échographique était ensuite confirmé par autopsie des litières et imagerie par microscopie en épifluorescence.

Nous avons appliqué ces différentes stratégies méthodologiques d'identification de gènes pour l'étude de malformations cardiaques isolées simples (communication inter-auriculaire, bicuspidie aortique) ou plus complexes associées à des défauts de la latéralisation G-D (transposition des gros vaisseaux, hétérotaxie,...). Les résultats ont fait l'objet de manuscrits publiés ou soumis qui sont présentés dans les chapitres suivants.



**Figure 18** : Synthèse schématique de la méthodologie de la thèse

Ce schéma représente les différentes étapes qui ont guidé l'ensemble de mes travaux de thèse, de l'Homme à la souris.

## **CHAPITRE III : RESULTAT 1**

## I. Présentation de l'article 1

Nous avons considéré dans ce premier travail une cohorte de plusieurs dizaines de patients avec **transposition des gros vaisseaux**. Grâce aux résultats du séquençage exomique obtenu pour l'ensemble d'eux, nous avons noté un étonnant enrichissement de variations pathogènes dans le gène *MEGF8*. Ce dernier code pour une protéine transmembranaire et intervient dans la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Pusapati et al. 2018). Chez la souris, des données antérieures du laboratoire de Cécilia Lo à Pittsburgh ont montré que des mutations faux-sens bi-alléliques de *Megf8* obtenues par mutagenèse chimique aléatoire (ENU) sont responsables de **défaut de latéralité G-D avec malformation cardiaque sévère** (Z. Zhang et al. 2009). Chez l'Homme, les variations homozygotes du gène *MEGF8* sont déjà rapportées dans le syndrome autosomique récessif de **Carpenter** qui inclue des anomalies squelettiques, des anomalies pré-axiales des doigts et des CC (Twiggy et al. 2012). Le rôle moléculaire joué par *MEGF8* restait jusqu'alors mystérieux.

D'un autre côté, au sein de l'équipe du laboratoire Rajat Rohatgi à Stanford, des constatations phénotypiques et moléculaires un peu similaires étaient faites pour la protéine **MGRN1**, elle aussi impliquée dans la régulation négative de la voie Shh.

Nous avons donc associé nos travaux et résultats à l'aide de cultures cellulaires et modèles animaux murins pour montrer **l'interaction génétique et biochimique** de ces deux molécules dans la modulation de la cascade Shh au sein des cellules cibles. En formant un complexe enzymatique Ubiquitine ligase à la surface cellulaire, elles catalysent l'ubiquitination et la dégradation du transducteur Smoothed (Smo) au tout début de la voie de signalisation Shh. En cas de perte de fonction chez la souris de *Megf8* et *Mgrn1*, le ligand Smo s'accumule dans les cellules et des anomalies de la latéralisation G-D sont observées.

Le détail des résultats obtenus dans ce travail collaboratif Pittsburgh-Stanford est présenté dans l'article ci-après. Il permet d'établir l'importance de la **voie Shh** dans l'établissement de la latéralisation G-D et dans la cardiogénèse.

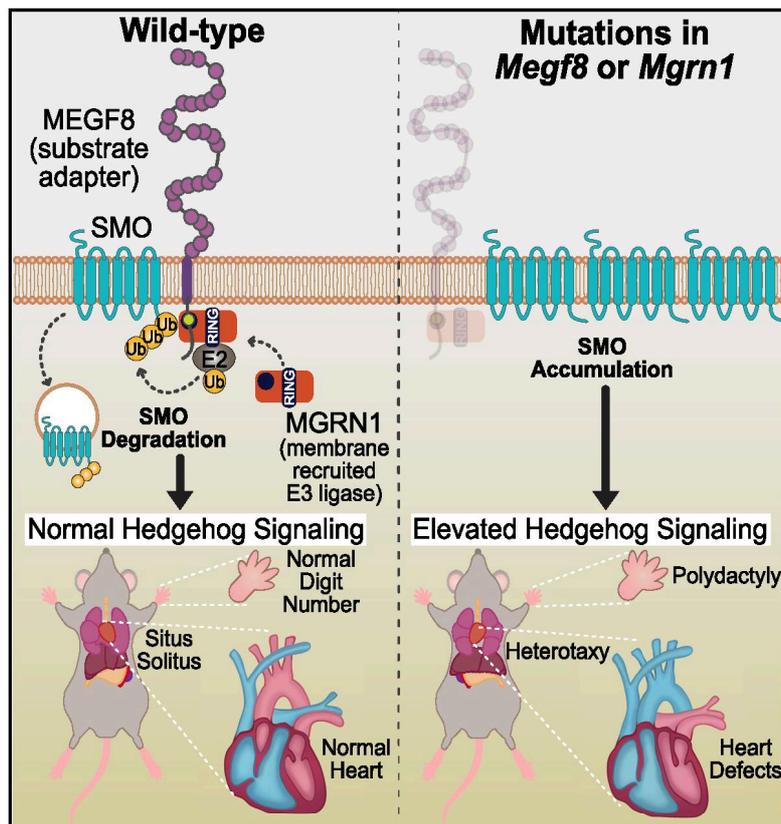
Les premiers résultats de ce travail ont été présentés lors d'une communication au congrès annuel de l'American Heart Association (AHA) à Chicago en novembre 2018 puis ont fait l'objet d'un manuscrit publié en novembre 2020.

## **II. Article 1**

# Developmental Cell

## A Membrane-Tethered Ubiquitination Pathway Regulates Hedgehog Signaling and Heart Development

### Graphical Abstract



### Authors

Jennifer H. Kong, Cullen B. Young, Ganesh V. Pusapati, ..., Teresa M. Gunn, Cecilia W. Lo, Rajat Rohatgi

### Correspondence

tmg@mclaughlinresearch.org (T.M.G.), cel36@pitt.edu (C.W.L.), rrohlatgi@stanford.edu (R.R.)

### In Brief

Kong et al. discovered a membrane-tethered ubiquitination pathway that plays a role in the patterning of multiple tissues during development by dampening Hedgehog signaling strength. Defects in this pathway lead to disrupted left-right patterning (called heterotaxy) of the entire body plan, as well as organ-specific defects in the heart, limb, and skeleton.

### Highlights

- A cell-surface ubiquitination pathway negatively regulates Hedgehog signaling strength
- This pathway promotes the ubiquitination and downregulation of Smoothened
- Defects in this pathway cause limb, heart, and left-right patterning defects
- Mutations in genes associated with this pathway show oligogenic inheritance

Article

# A Membrane-Tethered Ubiquitination Pathway Regulates Hedgehog Signaling and Heart Development

Jennifer H. Kong,<sup>1,6</sup> Cullen B. Young,<sup>2,6</sup> Ganesh V. Pusapati,<sup>1,6</sup> Chandni B. Patel,<sup>1</sup> Sebastian Ho,<sup>2</sup> Arunkumar Krishnan,<sup>5</sup> Jiuann-Huey Ivy Lin,<sup>2</sup> William Devine,<sup>2</sup> Anne Moreau de Bellaing,<sup>2,3</sup> Tejas S. Athni,<sup>1</sup> L. Aravind,<sup>5</sup> Teresa M. Gunn,<sup>4,\*</sup> Cecilia W. Lo,<sup>2,\*</sup> and Rajat Rohatgi<sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biochemistry and Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA

<sup>2</sup>Department of Developmental Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15201, USA

<sup>3</sup>Department of Pediatric Cardiology, Necker-Sick Children Hospital and The University of Paris Descartes, Paris 75015, France

<sup>4</sup>McLaughlin Research Institute, Great Falls, MT 59405, USA

<sup>5</sup>National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA

<sup>6</sup>These authors contributed equally

<sup>7</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [tmg@mclaughlinresearch.org](mailto:tmg@mclaughlinresearch.org) (T.M.G.), [cel36@pitt.edu](mailto:cel36@pitt.edu) (C.W.L.), [rrohagti@stanford.edu](mailto:rrohagti@stanford.edu) (R.R.)

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.08.012>

## SUMMARY

The etiology of congenital heart defects (CHDs), which are among the most common human birth defects, is poorly understood because of its complex genetic architecture. Here, we show that two genes implicated in CHDs, *Megf8* and *Mgrn1*, interact genetically and biochemically to regulate the strength of Hedgehog signaling in target cells. MEGF8, a transmembrane protein, and MGRN1, a RING superfamily E3 ligase, assemble to form a receptor-like ubiquitin ligase complex that catalyzes the ubiquitination and degradation of the Hedgehog pathway transducer Smoothened. Homozygous *Megf8* and *Mgrn1* mutations increased Smoothened abundance and elevated sensitivity to Hedgehog ligands. While mice heterozygous for loss-of-function *Megf8* or *Mgrn1* mutations were normal, double heterozygous embryos exhibited an incompletely penetrant syndrome of CHDs with heterotaxy. Thus, genetic interactions can arise from biochemical mechanisms that calibrate morphogen signaling strength, a conclusion broadly relevant for the many human diseases in which oligogenic inheritance is emerging as a mechanism for heritability.

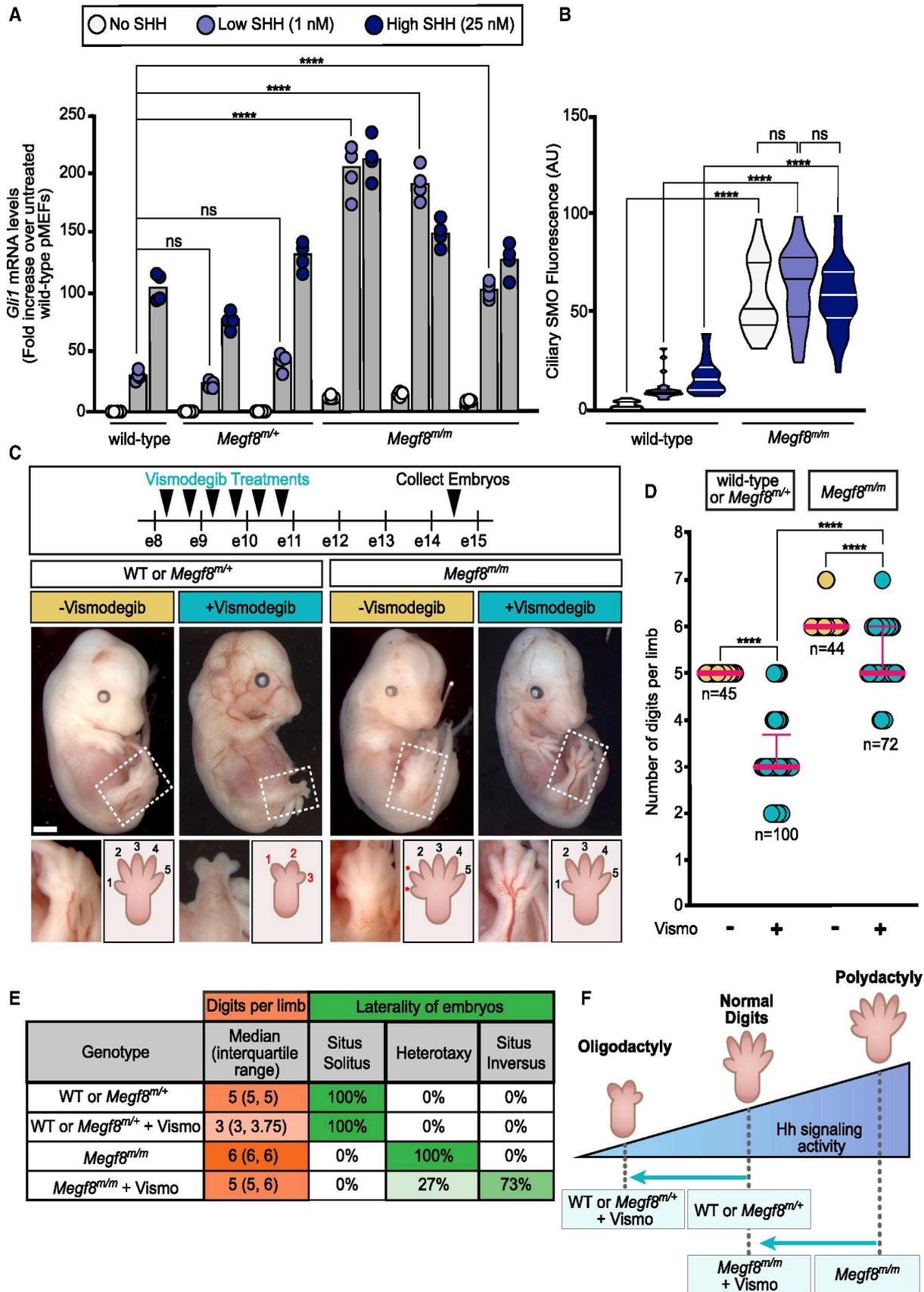
## INTRODUCTION

Morphogens are secreted ligands that influence differentiation, patterning, or morphogenesis in a dose-dependent manner. Temporal and spatial gradients of Hedgehog (Hh) ligands (such as Sonic Hedgehog, SHH) pattern the spinal cord and limb during development. Varying concentrations or durations of morphogen exposure produce different cellular outcomes by changing the strength or persistence of signaling in target cells (Harfe et al., 2004; Stamatakis et al., 2005). The focus in morphogen signaling has largely been on understanding how ligands, such as SHH, are produced and distributed across tissues to form gradients. However, signaling strength in target cells is a function of both ligand exposure and ligand sensitivity. Less is known about the mechanisms in target cells that modulate ligand reception and whether such mechanisms are damaged in developmental disorders.

In CRISPR screens for regulators of Hh signaling, we recently discovered several proteins that attenuate signaling strength in target cells (Pusapati et al., 2018). Because of similarities in their loss-of-function phenotypes, we focus here on three of these

proteins: multiple epidermal growth factor-like domains 8 (MEGF8), a type I single-pass transmembrane protein, and two paralogous RING superfamily E3 ubiquitin ligases, mahogunin ring finger 1 (MGRN1) and RNF157. *Megf8* was identified as a regulator of both left-right patterning and cardiac morphogenesis in mouse genetic screens (Aune et al., 2008; Engelhardt et al., 2013; Zhang et al., 2009). Human mutations in *MEGF8* result in Carpenter syndrome, an autosomal recessive syndrome similarly characterized by heterotaxy (defects in left-right patterning), severe congenital heart defects (CHDs), preaxial digit duplication, and skeletal defects (Twigg et al., 2012). Unlike many other genes associated with heterotaxy, loss of *Megf8* does not result in any detectable defects in either primary or motile cilia (Aune et al., 2008; Pusapati et al., 2018; Zhang et al., 2009). Loss of MGRN1 was also previously shown to cause CHDs and heterotaxy with low penetrance in mice (Cota et al., 2006). How MEGF8 and MGRN1 regulate these critical developmental events has remained unknown for over a decade.

We investigated the biochemical and biological functions of MEGF8, MGRN1, and RNF157 using a combination of mechanistic studies in cultured cells and mouse genetics. MEGF8,



**Figure 1. Elevated Hh Signaling Causes Birth Defect Phenotypes in *Megf8*<sup>m/m</sup> Embryos**

(A and B) Hh signaling strength was assessed using qRT-PCR (A) to measure mRNA for *Gli1* (a direct Hh target gene used as a metric for signaling strength) or ciliary SMO abundance (B) in pMEFs with the indicated genotypes. Each cell line tested was derived from a different embryo. Bars in (A) denote the median *Gli1*

(legend continued on next page)

MGRN1, and RNF157 anchor a ubiquitination pathway at the cell surface that regulates the sensitivity of target cells to Hh ligands. They assemble into an unusual transmembrane E3 ubiquitin ligase complex that functions as a traffic control system for signaling receptors, including the Hh transducer Smoothed (SMO). Mouse studies revealed striking genetic interactions and gene dosage effects involving *Megf8*, *Mgrn1*, and *Rnf157* that impact the penetrance of a wide spectrum of birth defects, including CHDs, heterotaxy, skeletal defects, and limb anomalies. Our work shows how genetic interactions between components of a ubiquitin ligase complex that tunes morphogen signaling strength can lead to a birth defect syndrome inherited in an oligogenic pattern.

## RESULTS

### *Megf8* and *Mgrn1* Are Negative Regulators of Hedgehog Signaling

Among the top gene hits identified in our genome-wide screen for attenuators of Hh signaling (Pusapati et al., 2018), we pursued a detailed analysis of *Megf8* and *Mgrn1* (Figure S1A) because of similarities in their loss-of-function phenotypes. In both NIH/3T3 fibroblasts and cultured neural progenitor cells (NPCs), loss-of-function mutations in *Megf8* and *Mgrn1* resulted in an elevated response to SHH ligands caused by the accumulation of SMO at the cell surface and primary cilium (Pusapati et al., 2018). To determine if MEGF8 and MGRN1 can attenuate Hh signaling in a more physiological context, we isolated primary mouse embryonic fibroblasts (pMEFs) from embryos homozygous for previously characterized mutant alleles of *Megf8* (C193R) or *Mgrn1* (md-nc) (Figure S1A) (He et al., 2003; Phillips, 1963; Zhang et al., 2009). As we observed in the NIH/3T3 cells, *Megf8*<sup>C193R/C193R</sup> and *Mgrn1*<sup>md-nc/md-nc</sup> (hereafter referred to as *Megf8*<sup>ml/ml</sup> and *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup>) pMEFs were more sensitive to SHH. When exposed to a sub-saturating concentration of SHH (1 nM), *Gli1* (a direct Hh target gene) was only partially induced in wild-type pMEFs, but this same low concentration induced *Gli1* to maximum levels in *Megf8*<sup>ml/ml</sup> and *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> pMEFs (Figures 1A and S1B). Heightened SHH sensitivity was caused by an elevated abundance of SMO in the primary cilia of *Megf8*<sup>ml/ml</sup> and *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> pMEFs, both in the absence and presence of SHH (Figures 1B and S1C).

The accumulation of ectopic ciliary SMO was also observed in multiple tissues within *Megf8*<sup>ml/ml</sup> and *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> embryos (Figure S2). In wild-type embryos, Hh signaling activity is restricted to early embryonic development and by e12.5 is turned off in most tissues, resulting in ciliary SMO restricted to cells that

were exposed to only the highest concentrations of SHH, like the progenitor cells within the ventral neural tube (Figure S2) (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). In contrast, SMO was concentrated in the primary cilia of nearly all *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryonic tissues, regardless of whether it had been exposed to Hh ligands (Figure S2). Tissues from *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> embryos did not have a widespread accumulation of ciliary SMO (Figure S2). However, ciliary SMO was inappropriately present sporadically in the dorsal neural tube and brain of *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> embryos (Figure S2), consistent with our observation that *Mgrn1*<sup>-/-</sup> NPCs exhibited a moderately elevated response to SHH (Pusapati et al., 2018).

To test if the phenotypes in *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryos were caused by elevated Hh signaling, we employed a pharmacological strategy to attenuate signaling strength *in utero* using vismodegib, a specific small molecule SMO inhibitor that is FDA-approved for the treatment of Hh-driven basal cell cancer in humans. Vismodegib is also a teratogen. Its acute administration to pregnant mice can produce “dose-dependent dysmorphology” in embryos, demonstrating that it can be used to tune the strength of Hh signaling during development (not simply to turn it off) (Lipinski et al., 2014). As predicted by the well-known role of Hh signaling in establishing the number of digits in the limb (Litintung et al., 2002; Riddle et al., 1993; te Welscher et al., 2002), vismodegib administered between e8.25 and e10.75 induced oligodactyly (reduced digit number) in wild-type and *Megf8*<sup>ml/+</sup> embryos (Figures 1C–1F). Remarkably, vismodegib rescued the preaxial digit duplication universally seen in *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryos, restoring digit numbers to 5 in the majority of the treated embryos (Figures 1C–1F). Heterotaxy, defined as randomized organ situs, is another completely penetrant phenotype seen in *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryos (Figure 1E) (Aune et al., 2008). *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryos exposed to vismodegib also showed a partial rescue of heterotaxy: ~70% displayed concordant organ situs that was mirror symmetric (situs inversus) (Figure 1E). Vismodegib-treated *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryos still displayed CHDs, likely because heterotaxy was not fully rescued and because vismodegib was not delivered during some of the critical periods of heart morphogenesis. Future experiments varying the dose and time period of vismodegib administration should help clarify the role of Hh signaling in all the birth defect phenotypes seen in *Megf8*<sup>ml/ml</sup> embryos.

*Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> embryos displayed a very low (<10%) rate of preaxial digit duplication (because of lower levels of SMO in cilia; Figure S2), making the assessment of vismodegib rescue challenging. However, compared with wild-type or *Mgrn1*<sup>ml/+</sup> embryos, *Mgrn1*<sup>ml/ml</sup> embryos were resistant to vismodegib-induced oligodactyly (Figures S1D and S1E), consistent with

mRNA values derived from the four individual measurements shown as circles. Violin plots in (B), with horizontal lines denoting the median and interquartile range, summarize SMO fluorescence at ~15–50 cilia.

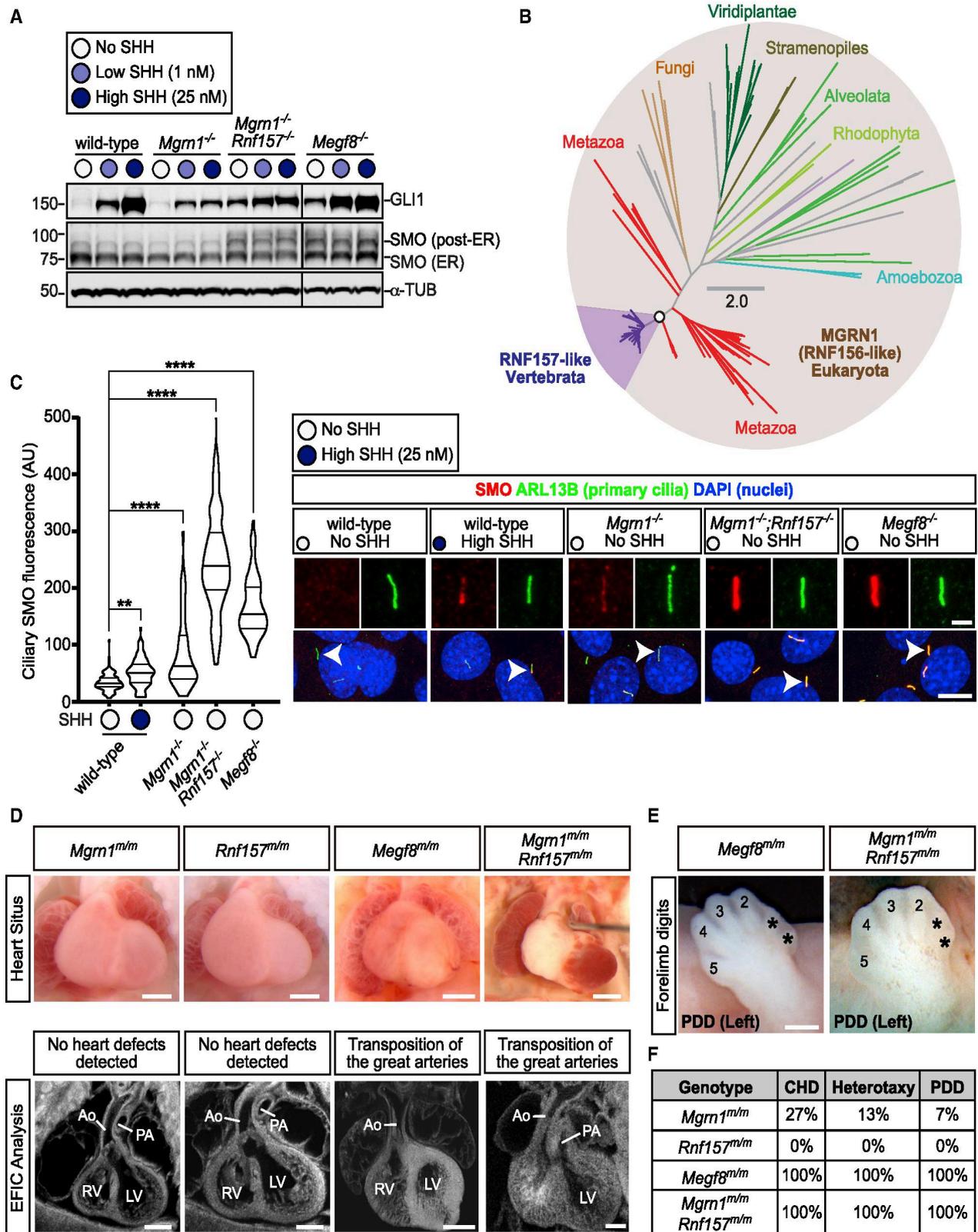
(C) Embryos (e14.5) of the indicated genotypes treated with vismodegib according to the regimen shown at the top. The dotted box marks the hindlimb depicted in zoomed images and cartoons at the bottom show the number of digits. Scale bar, 1 mm.

(D) Graph showing the number of digits per limb (forelimb and hindlimb) in embryos of the indicated genotypes treated with vismodegib. Each circle represents a single limb and the pink lines depict the median with interquartile range.

(E) Table summarizing digit number and left-right patterning phenotypes in embryos of various genotypes, with or without vismodegib treatment according to the regimen shown in (D).

(F) A model for how the interaction between vismodegib exposure and genotype influences digit number by altering the strength of Hh signaling.

Statistical significance was determined by one-way ANOVA (A) or Kruskal-Wallis (B and D); not-significant (ns) > 0.05 and \*\*\*\*p value ≤ 0.0001. See also Figures S1 and S2.



**Figure 2. RNF157 Partially Compensates for the Loss of MGRN1**

(A) Immunoblots showing GLI1 as a measure of Hh signaling strength and SMO abundance in the indicated NIH/3T3 cell lines treated with various concentrations of SHH.  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -TUB) is a loading control. Two populations of SMO, localized in the ER or in post-ER compartments, are marked. An analysis of additional clonal cell lines is shown in Figure S3C.

(B) Unrooted maximum-likelihood tree topology showing the evolutionary relationship between MGRN1 and RNF157, with the vertebrate-specific RNF157 lineage highlighted in purple. The open circle denotes 100% confidence support (1,000 replicates) and the scale bar indicates phylogenetic distance. The full Newick tree file is provided in Data S1.

(legend continued on next page)

the fact that they have a higher Hh signaling setpoint (Figure S1F).

The striking difference in digit number between littermate control and *Megf8<sup>mi/mi</sup>* or *Mgrn1<sup>mi/mi</sup>* embryos exposed to vismodegib (Figures 1D and S1D) supports the idea that a just-right “goldilocks” level of Hh signaling is required for proper digit patterning. Vismodegib restores SMO activity to this optimal level in *Megf8<sup>mi/mi</sup>* limbs but reduces SMO activity below the levels required for normal digit patterning in wild-type embryos (Figure 1F).

### Rnf157 Is a Genetic Modifier of Mgrn1

In both mice and cultured cells, loss of MEGF8 consistently produced stronger phenotypes than the loss of MGRN1 (Figures 1, S1, and S2), suggesting the involvement of additional genes (Purapati et al., 2018). The reported penetrance and expressivity of CHDs, heterotaxy, and preaxial digit duplication was much higher in *Megf8<sup>mi/mi</sup>* embryos compared with *Mgrn1<sup>mi/mi</sup>* embryos (Cota et al., 2006; Zhang et al., 2009) (Table S1). Similarly in NIH/3T3 cells, when compared with the loss of MGRN1, the loss of MEGF8 resulted in more Hh signaling activity at baseline and a greater abundance of SMO at the plasma and ciliary membranes (Figures 2A and 2C). Evolutionary sequence analysis indicated that RNF157, which also encodes a RING superfamily E3 ligase, is a vertebrate-specific paralog of MGRN1 (Figure 2B). Although MGRN1 is more widely distributed, found among almost all major eukaryotic lineages, MGRN1 and RNF157 share a RING domain and a distinctive predicted substrate-binding domain that is unique among other members of the RING superfamily (Figures 2B and S3A).

These analyses raised the possibility that RNF157 may partially compensate for the loss of MGRN1. Depletion of both RNF157 and MGRN1 in NIH/3T3 cells and NPCs using CRISPR methods (Figure S3B) enhanced Hh signaling activity (Figures 2A and S3C–S3E). *Mgrn1<sup>-/-</sup>;Rnf157<sup>-/-</sup>* NIH/3T3 cells constitutively expressed GLI1, even in the absence of SHH (Figure 2A). In addition, the abundance of SMO carrying mature glycan modifications acquired in the Golgi after trafficking from the endoplasmic reticulum (hereafter “post-ER SMO”) and the abundance of SMO in primary cilia was much higher in *Mgrn1<sup>-/-</sup>;Rnf157<sup>-/-</sup>* compared with *Mgrn1<sup>-/-</sup>* cells (Figures 2A and 2C). In all assays, Hh signaling in *Mgrn1<sup>-/-</sup>;Rnf157<sup>-/-</sup>* cells was enhanced compared with that in *Mgrn1<sup>-/-</sup>* cells (and equivalent to *Megf8<sup>-/-</sup>* cells) (Figures 2A, 2C, and S3C–S3E).

To assess the relationship between RNF157 and MGRN1 *in vivo*, we generated *Rnf157<sup>-/-</sup>* mice (hereafter referred to as *Rnf157<sup>mi/mi</sup>* mice) using CRISPR methods (Figure S3B). Consistent with data collected by the International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) using a different knockout strategy (Dickinson et al., 2016), the *Rnf157<sup>mi/mi</sup>* mice were viable, fertile, and

without obvious developmental defects (Figures 2D and 2F). The penetrance of birth defects in *Mgrn1<sup>mi/mi</sup>;Rnf157<sup>mi/mi</sup>* double null embryos was comparable with that in *Megf8<sup>mi/mi</sup>* embryos (and much higher than single null *Mgrn1<sup>mi/mi</sup>* or *Rnf157<sup>mi/mi</sup>* embryos) (Figures 2D–2F and Table S1).

Based on the consequences of the simultaneous disruption of *Rnf157* and *Mgrn1* in both cultured cells and mice, we conclude that RNF157 can partially compensate for the function of MGRN1 in *Mgrn1<sup>-/-</sup>* NIH/3T3 cells, NPCs, and embryos (Figures 2A, 2C–2F, and S3C–S3E). This compensation is asymmetric, as the loss of RNF157 alone had few developmental consequences (Figures 2D and 2F), presumably because MGRN1 can fully cover RNF157 functions. In conclusion, *Rnf157* is a modifier gene: mutations in *Rnf157* are insufficient to cause a phenotype alone, but they increase the penetrance of phenotypes caused by mutations in a different gene (*Mgrn1*).

### MEGF8 Binds to MGRN1

Mouse embryos and cells that lack MEGF8 are indistinguishable from those that lack both MGRN1 and RNF157 (Figure 2 and Table S1), leading us to speculate that MEGF8, MGRN1, and RNF157 may work together to regulate SMO trafficking. We transiently expressed MEGF8 in HEK293T cells and observed that it could be co-immunoprecipitated (coIP) with either endogenous or over-expressed MGRN1 (Figures 3A and 3C). Deleting the ~170 amino-acid (aa)-long cytoplasmic tail (hereafter called the “Ctail”) of MEGF8 (*MEGF8<sup>ΔCtail</sup>*), but not its large ~2,500-aa extracellular domain (*MEGF8<sup>ΔN</sup>*), abolished the interaction with MGRN1 (Figures 3A–3C). The MEGF8 Ctail contains a peptide motif (with the sequence “MASRPFA”) that is highly conserved across a family of single-pass transmembrane proteins found in Filozoa, animal-like eukaryotes, including Filasterea, Choanoflagellata, and Metazoa (Figures 3B and S4A) (Gunn et al., 1999; Haqq et al., 2003; Nagle et al., 1999). The deletion of this motif (*MEGF8<sup>ΔMASRPFA</sup>*) abrogated the interaction between MEGF8 and MGRN1 (Figure 3C), establishing an E3 ligase recruitment function for this mysterious sequence element.

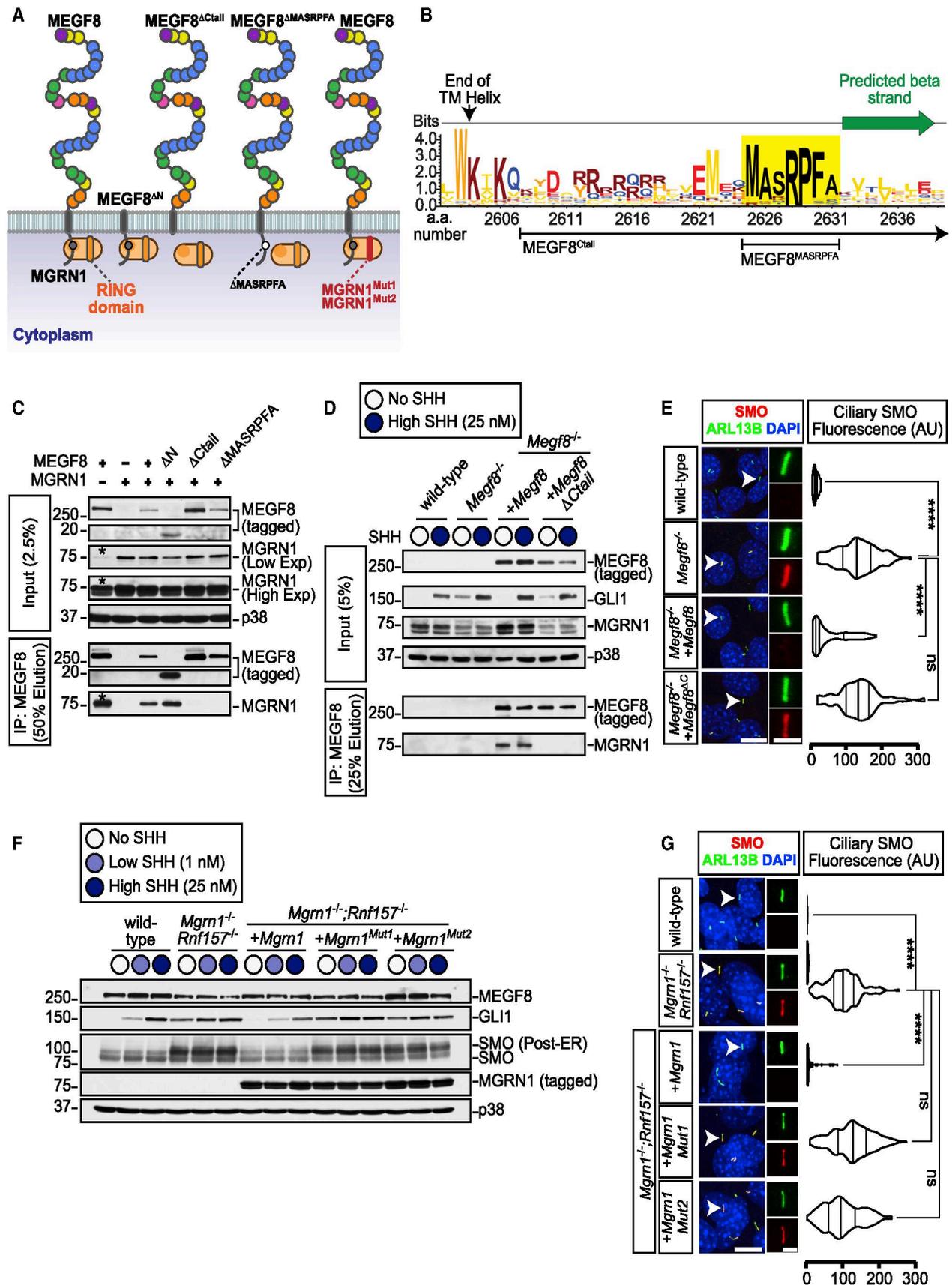
To test if the association between MEGF8 and MGRN1 was relevant for the regulation of Hh signaling, we stably expressed wild-type MEGF8 or the interaction-defective *MEGF8<sup>ΔCtail</sup>* mutant in *Megf8<sup>-/-</sup>* NIH/3T3 cells (Figure 3D). Stably expressed MEGF8, but not its truncated *MEGF8<sup>ΔCtail</sup>* variant, bound to endogenous MGRN1 (Figure 3D) and suppressed the elevated basal GLI1 and ciliary SMO seen in *Megf8<sup>-/-</sup>* cells (Figures 3D and 3E). The MEGF8-MGRN1 interaction was unchanged when signaling was activated by the addition of SHH (Figure 3D). These data establish that MGRN1 in the cytoplasm stably associates with the Ctail of MEGF8, and this interaction is required to suppress ciliary SMO levels and attenuate Hh signaling.

(C) Violin plots (left) with horizontal lines denoting the median and interquartile range and corresponding representative confocal fluorescence microscopy images (right) of SMO (red) at primary cilia (green, marked by ARL13B) in NIH/3T3 cells with the indicated genotypes ( $n \sim 70$  cilia/condition). Arrowheads identify individual cilia captured in the zoomed images above each panel. Statistical significance was determined by the Kruskal-Wallis test; \*\*p value  $\leq 0.01$  and \*\*\*\*p value  $\leq 0.0001$ . Scale bars, 10  $\mu\text{m}$  in merged panels and 2  $\mu\text{m}$  in zoomed displays. See Figure S3D for analysis of additional clonal cell lines.

(D) Necropsy (top row) and ECM (bottom row) images of embryonic hearts from e13.5–14.5 embryos of the indicated genotypes. Scale bars, 200  $\mu\text{m}$ .

(E) Forelimbs of embryos show preaxial digit duplication (PDD). Asterisks (\*) mark the duplicated digits. Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ .

(F) Table summarizes the frequency of CHDs, heterotaxy, and PDD in *Mgrn1<sup>mi/mi</sup>* ( $n = 15$ ), *Rnf157<sup>mi/mi</sup>* ( $n = 6$ ), *Megf8<sup>mi/mi</sup>* ( $n = 12$ ), and *Mgrn1<sup>mi/mi</sup>;Rnf157<sup>mi/mi</sup>* ( $n = 3$ ) embryos. A detailed list of phenotypes observed in each embryo can be found in Table S1. See also Figure S3, Table S1, and Data S1.



**Figure 3. The Interaction between MGRN1 and MEGF8 Is Required to Attenuate Hedgehog Signaling**

(A) Depictions of full-length MEGF8, truncated MEGF8 (MEGF8<sup>AN</sup>, MEGF8<sup>ΔCtail</sup>, MEGF8<sup>ΔMASRPFA</sup>), functional MGRN1, and catalytically inactive MGRN1 (MGRN1<sup>Mut1</sup> and MGRN1<sup>Mut2</sup>) proteins. The multiple domains in the extracellular region of MEGF8 are shown as circles and colored as in Figure S1A.

(legend continued on next page)

### The Ubiquitin Ligase Activity of MGRN1 Is Required to Attenuate Hh Signaling

MGRN1 regulates processes ranging from skin pigmentation to spongiform neurodegeneration by directly ubiquitinating multiple substrates (Chakrabarti and Hegde, 2009; Gunn et al., 2013; Jiao et al., 2009). We constructed two variants of MGRN1 (MGRN1<sup>Mut1</sup> and MGRN1<sup>Mut2</sup>) carrying mutations in highly conserved residues of the RING domain (Figure S4B). These mutations are known to abolish binding between RING domains and their cognate E2 partners, thereby preventing ubiquitin transfer to substrates (Garcia-Barcena et al., 2020; Gunn et al., 2013). We stably expressed wild-type MGRN1, MGRN1<sup>Mut1</sup>, or MGRN1<sup>Mut2</sup> in *Mgmn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells and measured the abundance of GLI1, post-ER SMO, and ciliary SMO (Figures 3F and 3G). In all three assays, wild-type MGRN1 was able to fully attenuate Hh signaling and SMO levels, but the MGRN1<sup>Mut1</sup> and MGRN1<sup>Mut2</sup> variants were inactive. Importantly, MGRN1<sup>Mut1</sup> and MGRN1<sup>Mut2</sup> were expressed at equivalent levels to MGRN1 (Figure 3F) and maintained their stable interaction with MEGF8 (Figure S4C), demonstrating their integrity. These results support the conclusion that both the stable interaction of MGRN1 with MEGF8 and its E3 ligase function are required to attenuate Hh signaling.

### The MEGF8-MGRN1 Complex Ubiquitinates SMO

At this point, our data suggested that MGRN1 functions as a membrane-tethered ubiquitin ligase complex that attenuates Hh signaling by reducing SMO abundance at the cell surface and primary cilium. Trafficking assays revealed that both the steady-state abundance and the stability of cell-surface SMO were markedly greater in *Megf8*<sup>-/-</sup> and *Mgmn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> cells compared with wild-type cells (Figures 4A and S5). Since the endocytosis and degradation of cell-surface receptors are often regulated by their ubiquitination, we sought to test whether SMO is a substrate of the MEGF8-MGRN1 complex.

We established an assay to measure SMO ubiquitination by expressing SMO and hemagglutinin (HA)-tagged ubiquitin (UB) together in HEK293T cells and then measuring the amount of HA-UB conjugated to SMO (Figures 4B and 4C). SMO was isolated by immunoprecipitation and the attached UB chains detected (as a smear) by immunoblotting with an anti-HA antibody. Co-expression of MGRN1 alone had no effect on SMO ubiquitination, co-expression of MEGF8 alone slightly increased SMO ubiquitination, but the co-expression of both MEGF8 and MGRN1 dramatically increased levels of ubiquitinated SMO and concomitantly reduced SMO abundance (Figure 4B). A ubiquitin mutant lacking all lysine residues (UB<sup>K0</sup>) was poorly conjugated to

SMO, suggesting that SMO is attached to poly-UB chains, rather than to a single ubiquitin (Figure S6A). Inactivating mutations in the RING domain of MGRN1 (MGRN1<sup>Mut1</sup> and MGRN1<sup>Mut2</sup>) failed to promote SMO ubiquitination (Figure 4B). SMO was a selective substrate for MGRN1 and MEGF8 because their co-expression did not change the abundance of a different ciliary GPCR, SSTR3 (Figure S6B). SMO contains 21 lysine (K) residues exposed to the cytoplasm that could function as acceptors for ubiquitin. Changing all of these lysines to arginines (R) impaired MGRN1-mediated ubiquitination (Figure S6C), but changing specific clusters of lysines in each of the cytoplasmic loops or the tail of SMO did not reduce ubiquitination (Figure S6C). Thus, MGRN1 does not seem to favor a particular lysine residue or set of lysine residues on the cytoplasmic surface of SMO, at least in this over-expression-based HEK293T assay.

Efficient SMO ubiquitination required both MEGF8 and the E3 ligase function of MGRN1. The small increase in SMO ubiquitination seen in the presence of MEGF8 alone is likely due to the presence of endogenous MGRN1 in HEK293T cells (see asterisks in the MGRN1 panel in Figure 4B). To directly test whether the physical interaction between MEGF8 and MGRN1 was required to mediate SMO ubiquitination, we co-expressed MGRN1 with one of three MEGF8 variants (diagrammed in Figure 3A): (1) MEGF8<sup>ΔCtail</sup>, (2) MEGF8<sup>ΔMASRPFA</sup> (both of which cannot bind to MGRN1; Figure 3C), or (3) MEGF8<sup>ΔN</sup>, which lacks the large extracellular domain of MEGF8 but retains its transmembrane (TM) helix and Ctail. MEGF8<sup>ΔCtail</sup> and MEGF8<sup>ΔMASRPFA</sup> failed to support SMO ubiquitination (Figure 4C). In contrast, MEGF8<sup>ΔN</sup>, which can still bind to MGRN1 (Figure 3C), efficiently promoted SMO ubiquitination and degradation (Figure 4C). Interestingly, MEGF8<sup>ΔN</sup> was much more active than full-length MEGF8 (despite both proteins being expressed at comparable levels), suggesting that the extracellular domain of MEGF8 may negatively regulate the function of the Ctail or interfere with its recognition of SMO. In addition to recruiting MGRN1 to the plasma membrane, the association between MEGF8 and MGRN1 promoted the intrinsic E3 ligase activity of MGRN1, evident through the ability of MEGF8<sup>ΔN</sup> to reduce the abundance of co-expressed wild-type MGRN1 (Figure 4C). Most E3 ligases catalyze their own ubiquitination and de-stabilization, a property that reflects their intrinsic catalytic activity.

Unexpectedly, MEGF8<sup>ΔN</sup>, which includes only the TM helix and Ctail of the protein (232 out of the 2,778 aa in the full-length protein), was sufficient to promote SMO ubiquitination (Figure 4C). To further narrow down the region of MEGF8 required for SMO recognition, we constructed a set of chimeric proteins

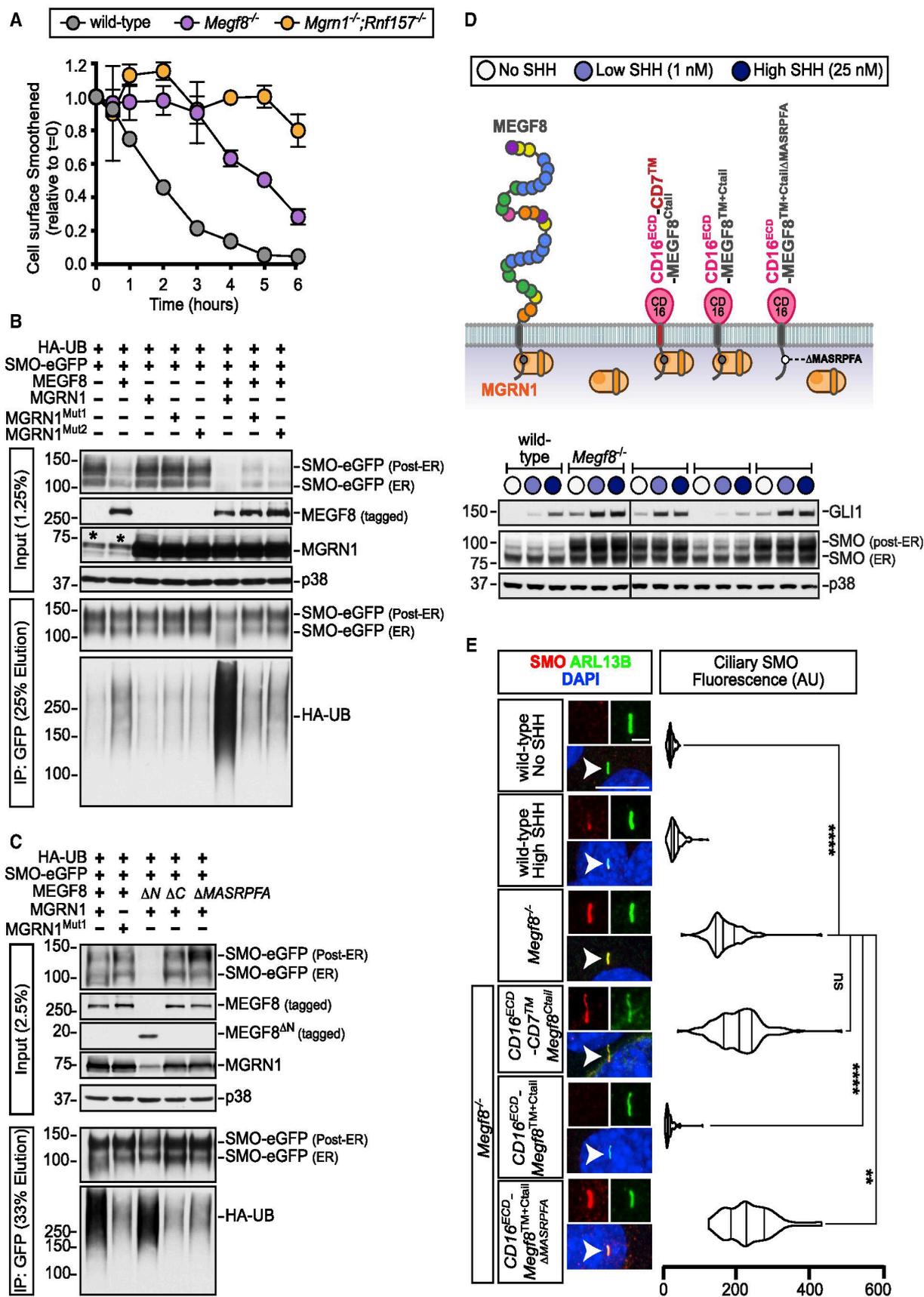
(B) Sequence logo showing the conservation in sequence entropy bits of the MASRPFA sequence (yellow shading) in the Ctail of MEGF8 and related proteins (alignment shown in Figure S4A). Deletion boundaries for the MEGF8 mutants shown in Figure 3A are noted below the logo.

(C) The interaction between MEGF8 or MEGF8 mutants (see Figure 3A, all 1D4 tagged) and MGRN1 (FLAG tagged) was tested by transient co-expression in HEK293T cells, followed by immunoprecipitation (IP) of MEGF8. Asterisk (\*) indicates endogenous MGRN1 in HEK293T cells.

(D and E) GLI1 abundance was measured by immunoblotting (D) and SMO ciliary abundance by confocal fluorescence microscopy (E) in *Megf8*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells stably expressing 1D4-tagged MEGF8 or MEGF8<sup>ΔCtail</sup> (see Figure 3A). The interaction between MEGF8 and endogenous MGRN1 was tested by colP in (D).

(F and G) GLI1, SMO, and MEGF8 abundances were measured by immunoblotting (F) and SMO ciliary abundance by confocal fluorescence microscopy (G) in *Mgmn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells stably expressing wild-type MGRN1 or variants carrying inactivating mutations in the RING domain (MGRN1<sup>Mut1</sup> and MGRN1<sup>Mut2</sup>, see Figures 3A and S4B).

Violin plots (E and G) with horizontal lines denoting the median and interquartile range summarize the quantification of SMO fluorescence (red) at ~50 individual cilia (green) per cell line from representative images of the type shown immediately to the left. Statistical significance was determined by the Kruskal-Wallis test; not-significant (ns) > 0.05 and \*\*\*\*p value ≤ 0.0001. Scale bars, 10 μm in merged panels and 2 μm in zoomed displays. See also Figure S4.



**Figure 4. Smoothed Is Ubiquitinated by the MEGF8-MGRN1 Complex**

(A) Degradation of cell-surface SMO in NIH/3T3 cells of the indicated genotypes. See Figure S5 for details. Circles represent the mean and error bars represent the standard error of two independent replicates.

(legend continued on next page)

that fused the MEGF8 Ctail, TM helix, or both to heterologous extracellular and TM domains from CD16 and CD7, respectively (diagrammed in Figure S6D). In the HEK293T assay, both the TM helix and the Ctail of MEGF8 were required to promote SMO ubiquitination, simply tethering the isolated Ctail to the plasma membrane by fusing it to a CD16-CD7 hybrid protein was not sufficient. Abrogating the interaction with MGRN1 by deleting the “MASRPFA” motif abolished the function of these chimeric proteins, demonstrating that they still require MGRN1 to promote SMO ubiquitination (Figure S6D).

If the biochemical function of MEGF8 in Hh signaling is to ubiquitinate SMO, a key prediction is that the CD16<sup>ECD</sup>-MEGF8<sup>TM+Ctail</sup> chimera, a minimal engineered protein that is sufficient to carry out this function, should be able to reverse the enhanced Hh signaling phenotype in *Megf8*<sup>-/-</sup> cells. To test this prediction, we stably expressed CD16<sup>ECD</sup>-CD7<sup>TM</sup>-MEGF8<sup>Ctail</sup>, CD16<sup>ECD</sup>-MEGF8<sup>TM+Ctail</sup>, and CD16<sup>ECD</sup>-MEGF8<sup>TM+CtailΔMASRPFA</sup> (a variant carrying the MASRPFA deletion) in *Megf8*<sup>-/-</sup> cells (Figure 4D). All three chimeras were expressed and localized properly to the cell surface as measured by flow cytometry using an antibody against the CD16<sup>ECD</sup> (Figure S6E). However, only the CD16<sup>ECD</sup>-MEGF8<sup>TM+Ctail</sup> chimera could completely suppress *Gli1* expression and both post-ER and ciliary SMO abundance (Figures 4D and 4E). These experiments again highlighted the importance of the TM helix of MEGF8 for SMO regulation: replacing it with a TM helix from CD7 abolished activity (Figures 4D and S6D). We conclude that the TM helix and Ctail of MEGF8 function as a minimal membrane-localized substrate adapter to recruit and activate the E3 ligase activity of MGRN1 toward SMO, catalyzing SMO ubiquitination and clearance from both the plasma and ciliary membrane, and consequently dampening sensitivity to Hh ligands.

### Genetic Interactions between *Megf8* and *Mgrn1*

After identifying the MEGF8-MGRN1 interaction and elucidating the ubiquitination-based mechanism through which it regulates the sensitivity of target cells to Hh ligands, we sought to investigate the role of this protein complex in embryonic development using the previously published *Megf8*<sup>mi/+</sup> and *Mgrn1*<sup>mi/+</sup> mouse lines (He et al., 2003; Phillips, 1963; Zhang et al., 2009). Notably, both *Megf8*<sup>mi/mi</sup> and *Mgrn1*<sup>mi/mi</sup> mutant embryos display CHDs, heterotaxy, and preaxial digit duplication. While these phenotypes are fully penetrant in the *Megf8*<sup>mi/mi</sup> mutants, they show lower penetrance in the *Mgrn1*<sup>mi/mi</sup> mutants (likely due to partial redundancy with *Rnf157*) (Figure 2F) (Cota et al., 2006; Zhang et al., 2009). To determine whether the developmental defects exhibited by these two mutants are a product of the same pathway (as predicted by our biochemical studies), we assessed for a genetic interaction by intercrossing the *Megf8*<sup>mi/+</sup> and *Mgrn1*<sup>mi/+</sup> mice and examining the phenotypes of the resultant double heterozygous *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos.

As reported previously (Cota et al., 2006; Zhang et al., 2009), the single heterozygous *Megf8*<sup>mi/+</sup> and *Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos were normal without any developmental defects, consistent with the adult viability of *Megf8*<sup>mi/+</sup> and *Mgrn1*<sup>mi/+</sup> mice (Figures 5 and 6; Tables S2 and S3). In contrast, the *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> double heterozygous embryos showed preaxial digit duplication, heterotaxy, and CHDs, phenotypes similar to those seen in homozygous *Megf8*<sup>mi/mi</sup> and *Mgrn1*<sup>mi/mi</sup> embryos (Figures 5 and 6; Table S4). Detailed anatomic phenotyping was conducted on e13.5–14.5 *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos using both necropsies (Figures 5B and 5C) and episcopic confocal microscopy (ECM) to generate 3D histological reconstructions of intracardiac anatomy (Figure 6B).

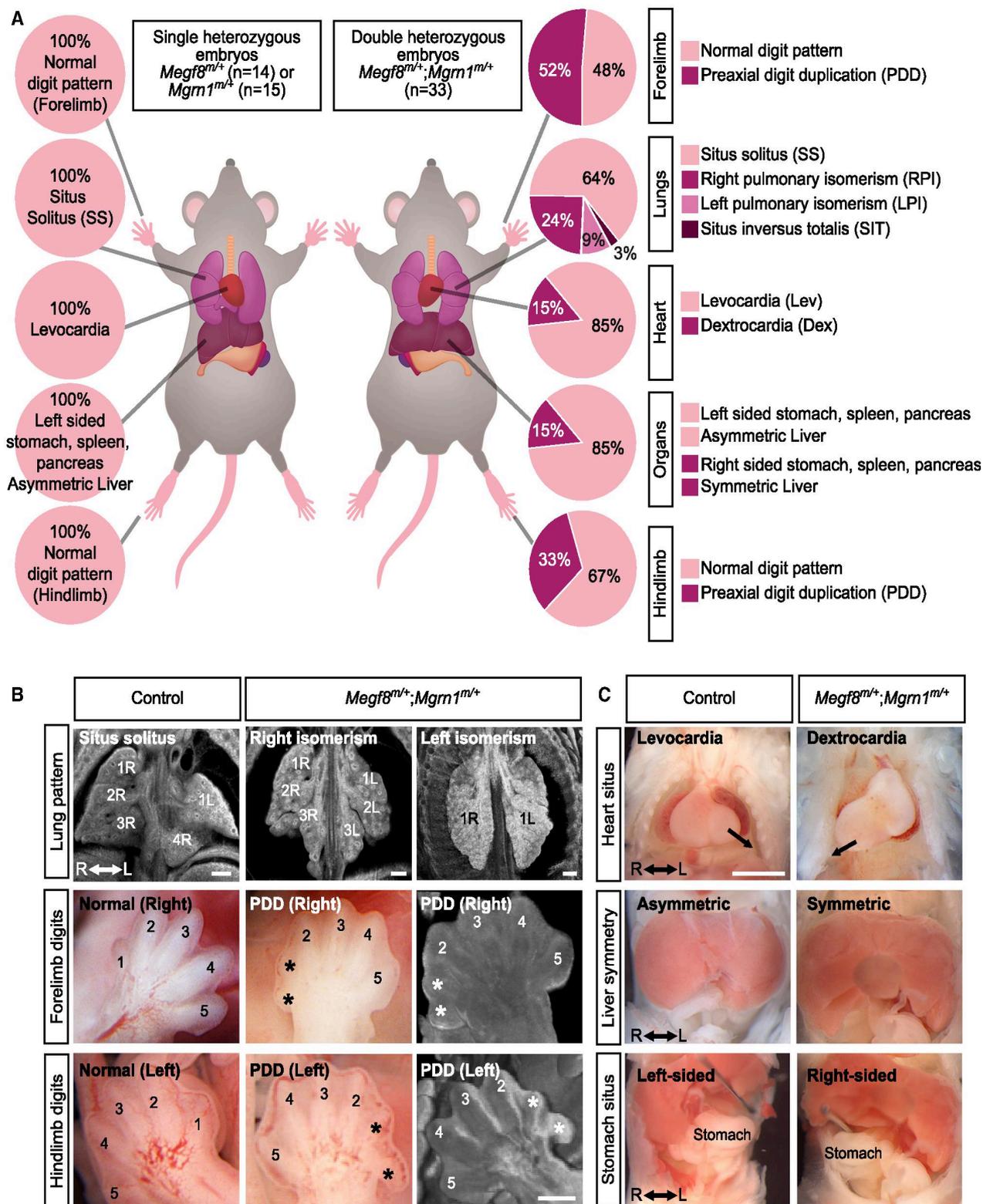
The limb, heart, and left-right patterning defects observed in 100% of *Megf8*<sup>mi/mi</sup> embryos (Table S1) were incompletely penetrant in *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> double heterozygous embryos (Figures 5 and 6; Table S4). Preaxial digit duplication, a hallmark of elevated Hh signaling in the limb bud, was observed in only 61% of *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos (Figures 5A and 6C). Defects in left-right patterning were seen in only 36% of *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos (Figures 5A and 6C). Heart defects were seen in ~52% of *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos.

In addition to reduced penetrance, the CHDs seen in *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> double heterozygous embryos were also milder compared with *Megf8*<sup>mi/mi</sup> embryos. All *Megf8*<sup>mi/mi</sup> embryos suffered from a transposition of the great arteries (TGA), an outflow tract (OFT) malalignment defect in which the aorta emerges from the right ventricle and the pulmonary artery from the left ventricle (Figures 6A and 6B; Table S1). Among the 52% of *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos with CHDs, only 41% of these embryos displayed TGA and 47% displayed double outlet right ventricle (DORV) with or without atrioventricular septal defect (AVSD) (Figures 6A and 6B; Table S4).

Given the known co-occurrence of heterotaxy with severe CHDs in clinical data from human birth registries (Lin et al., 2014; Pradat et al., 2003), we examined the correlation between these two types of birth defects in our mutant mouse embryos. All *Megf8*<sup>mi/mi</sup> embryos had both heterotaxy and TGA (Figures 2F and 6C; Table S1). In *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos, heterotaxy was associated 100% of the time with CHDs and, conversely, CHDs were associated 64% of the time with heterotaxy (Figure 6C; Tables S4, S6, and S7). Interestingly, the presence of heterotaxy was also correlated with different CHDs: ~60% of these embryos also had TGA (Figure 6A). In contrast, *Megf8*<sup>mi/+</sup>;*Mgrn1*<sup>mi/+</sup> embryos with normal left-right patterning (situated solitus) did not have TGA and instead had DORV in ~20% of cases (Figure 6A). These correlations are remarkably similar to data from human birth registries, which report that ~85% of the heterotaxy cases are associated with CHDs that include DORV, TGA, and AVSD (Lin et al., 2014; Pradat et al., 2003).

(B and C) SMO ubiquitination was assessed after transient co-expression of the indicated proteins in HEK293T cells (see Figure 3A). Cells were lysed under denaturing conditions, SMO was purified by IP, and the amount of HA-UB covalently conjugated to SMO was assessed using immunoblotting with an anti-HA antibody. An asterisk (\*) indicates endogenous MGRN1.

(D and E) Total GLI1 and SMO abundances were measured by immunoblotting (D) and ciliary SMO (n~50 cilia) by fluorescence confocal microscopy (E) in *Megf8*<sup>-/-</sup> cells expressing various CD16/CD7/MEGF8 chimeras. The ability of these chimeras to support SMO ubiquitination is shown in Figure S6D and the abundances of chimeras at the cell surface is shown in Figure S6E. SMO fluorescence was quantified and represented as violin plots in (E), with horizontal lines denoting the median and interquartile range. Statistical significance in (E) was determined by the Kruskal-Wallis test; not-significant (ns) > 0.05, \*\*p value ≤ 0.01, and \*\*\*\*p value ≤ 0.0001. Scale bars, 10 μm in merged panels and 2 μm in zoomed displays. See also Figures S5 and S6.

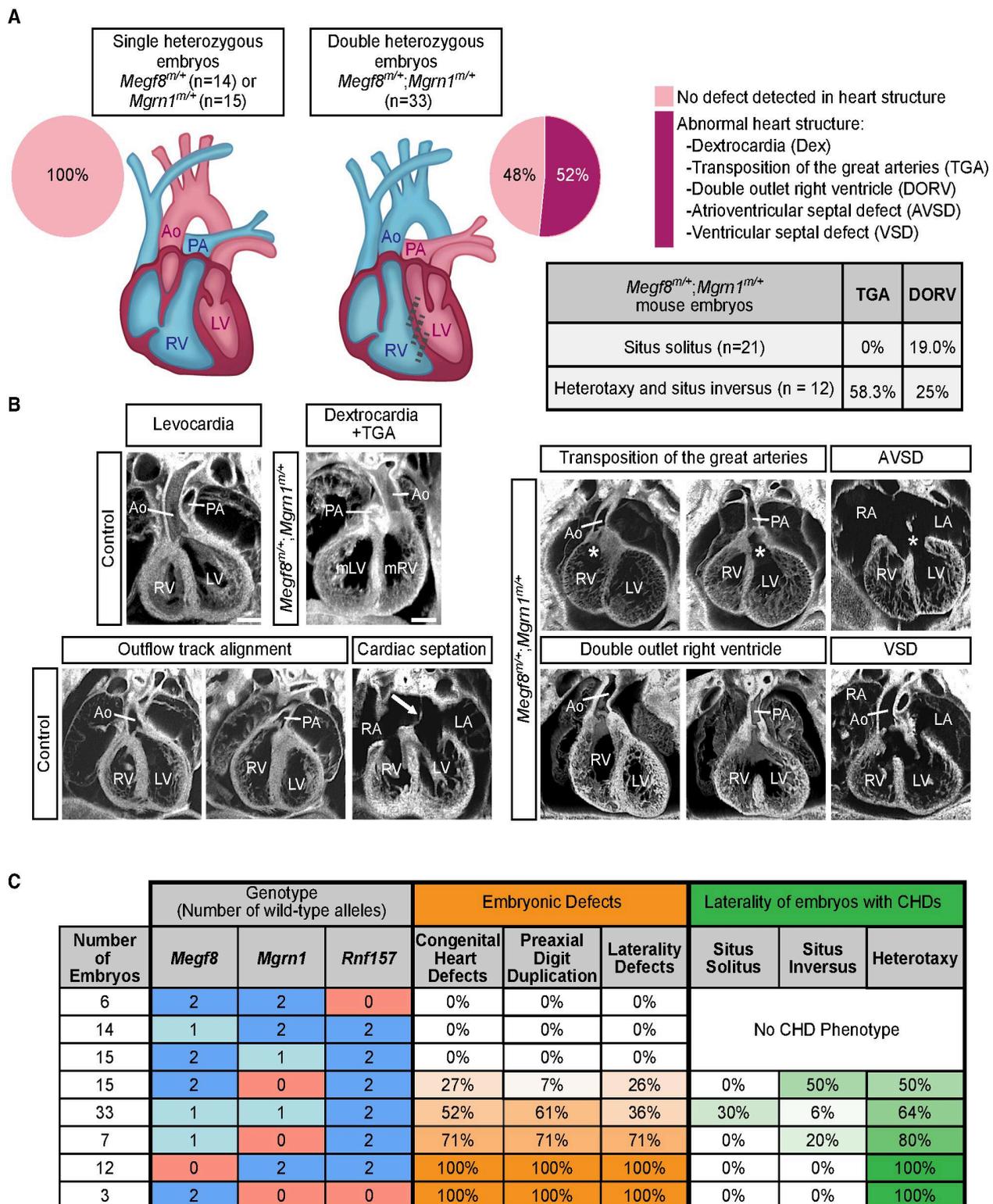


**Figure 5. A Genetic Interaction between *Megf8* and *Mgrn1* Causes Heart Defects and Heterotaxy**

(A) Summary of phenotypes observed in mouse embryos with the indicated genotypes (e13.5–14.5). Dex, dextrocardia; Lev, levocardia; LPI, left pulmonary isomerism; PDD, preaxial digit duplication; RPI, right pulmonary isomerism; SIT, situs inversus; SS, situs solitus. A detailed list of phenotypes observed in each embryo can be found in [Tables S2–S4](#).

(B) Representative light microscopy and ECM images of the developing lungs and limbs of single (control) and double heterozygous embryos. The normal right lung has 4 lobes (1R, 2R, 3R, and 4R) and the left lung has one lobe (1L). Asterisks (\*) mark the duplicated preaxial digits. Scale bars, 200  $\mu$ m.

(C) Representative necropsy images showing the position of the heart, symmetry of the liver, and location of the stomach in single (control) and double heterozygous embryos. Arrow (top row) denotes the direction of the cardiac apex. Scale bar, 1000  $\mu$ m. See also [Tables S2, S3, and S4](#).



**Figure 6. Spectrum of Heart Defects in Mice Carrying Mutant Alleles of *Megf8* and *Mgrn1***

(A and B) Summary of CHDs in mouse embryos of various genotypes (e13.5–14.5) as determined by ECM imaging. (B) shows representative ECM images of the many defects observed in double heterozygous embryos, along with normal hearts from control (single heterozygous) embryos. The white arrow in the control cardiac septation panel denotes an intact atrial primum. The asterisk (\*) in the *Megf8*<sup>m/+</sup>;*Mgrn1*<sup>m/+</sup> AVSD panel marks an ostium primum atrial septal defect (a failure of the septum primum to fuse with the endocardial cushions). Ao, aorta; AVSD, atrioventricular septal defect; Dex, dextrocardia; LA, left atrium; LV, left ventricle; mLV, morphological left ventricle; mRV, morphological right ventricle; PA, pulmonary artery; RA, right atrium; RV, right ventricle; VSD, ventricular septal defect. A detailed phenotypic analysis of each embryo can be found in [Tables S2–S4](#). Scale bars, 100  $\mu$ m.

(legend continued on next page)

The tight association between CHD and heterotaxy is also supported by the observation that all seven embryos with only preaxial digit duplication (but no CHD) had normal situs solitus (Table S4). Thus, the double heterozygous *Megf8<sup>m/+</sup>;Mgmn1<sup>m/+</sup>* embryos recapitulate the known association between severe CHD and heterotaxy seen in human clinical data. The wider spectrum of CHDs seen in these embryos, including DORV, compared with homozygous *Megf8<sup>m/m</sup>* embryos resembles the more diverse range of CHDs seen in human patients with heterotaxy (Figure 6A; Table S7) (Lin et al., 2014; Pradat et al., 2003).

### Gene Dosage Effects Involving *Mgmn1*, *Megf8*, and *Rnf157*

Our comparison of double heterozygous *Megf8<sup>m/+</sup>;Mgmn1<sup>m/+</sup>* embryos to homozygous *Megf8<sup>m/m</sup>* embryos suggested that both the penetrance and expressivity of birth defect phenotypes may be determined by the precise magnitude of ubiquitin ligase activity, which, in turn, determines the abundance of SMO and the strength of Hh signaling. This hypothesis predicts that the dosage of *Megf8*, *Mgmn1*, and *Rnf157* should influence the penetrance of birth defect phenotypes.

We analyzed embryos carrying varying numbers of loss-of-function *Megf8<sup>m</sup>*, *Mgmn1<sup>m</sup>*, and *Rnf157<sup>m</sup>* alleles (Figure 6C). *Megf8<sup>m/m</sup>* and *Mgmn1<sup>m/m</sup>;Rnf157<sup>m/m</sup>* embryos have a 100% penetrance of CHDs, heterotaxy, and preaxial digit duplication, presumably because the functions of both the transmembrane adaptor (MEGF8) and the cytoplasmic E3 ligases (MGRN1 or RNF157) are essential for SMO ubiquitination. Loss of one allele of *Megf8* (*Megf8<sup>m/+</sup>* embryos), one allele of *Mgmn1* (*Mgmn1<sup>m/+</sup>* embryos), or both alleles of *Rnf157* (*Rnf157<sup>m/m</sup>* embryos) did not lead to birth defects, likely because the abundance of the MEGF8-MGRN1/RNF157 complex remains above the threshold required for normal development. However, between these two extremes, decreasing the cumulative gene dosage (by increasing the number of mutant alleles) of *Mgmn1* and *Megf8* led to a progressive increase in the penetrance of CHDs, heterotaxy, and preaxial digit duplication (Figure 6C; Tables S5 and S6). In addition, the incidence of TGA (Table S6) and the co-occurrence of heterotaxy (Figure 6C) increased with decreasing gene dosage. These striking gene dosage effects support the model that a progressive decrease in ubiquitin ligase function leads to a progressive increase in the penetrance and expressivity of birth defects, likely by driving a graded increase in Hh signaling strength.

The exquisite sensitivity of heart development to mutations in *Megf8*, *Mgmn1*, and *Rnf157* seen in mouse embryos prompted us to look for potentially damaging variants in these genes in patients with CHDs. Using whole-exome sequencing data from a cohort of 652 CHD patients, we searched for missense variants in all three genes with a combined annotation dependent depletion (CADD) score >10. We additionally used a stringent mean allele frequency (MAF) filter of <0.5% for *MEGF8* and *MGRN1*, but a more relaxed MAF filter (< 5%) for *RNF157*, since the

*Rnf157<sup>m/m</sup>* mouse has no phenotype. Using these criteria, we identified one patient (7501) with two mutations each in *MEGF8* and *MGRN1* and one mutation in *RNF157* (Figures S7A and S7B; Table S8). Genotyping the parents of patient 7501 revealed that the two mutations in *MEGF8* and *MGRN1* were both present in the same allele, with the former transmitted from the mother and the latter from the father (along with the *RNF157* variant). Patient 7501 clinically presented with OFT anomalies: pulmonary atresia, a severely hypoplastic right ventricle with an intact interventricular septum and an atrial septal defect (Figures 7B and S7C). Primary fibroblasts from patient 7501 displayed an increased abundance of ciliary SMO (Figure 7C) and elevated *Gli1* expression (Figure 7D), both at baseline and in response to SHH when compared with fibroblasts generated from a subject without CHD. Collectively, our mouse and human data support a model where disruption of the MEGF8-MGRN1/RNF157 ubiquitin ligase complex can lead to elevated SMO, increased Hh signaling strength and, consequently, to the emergence of CHDs.

### DISCUSSION

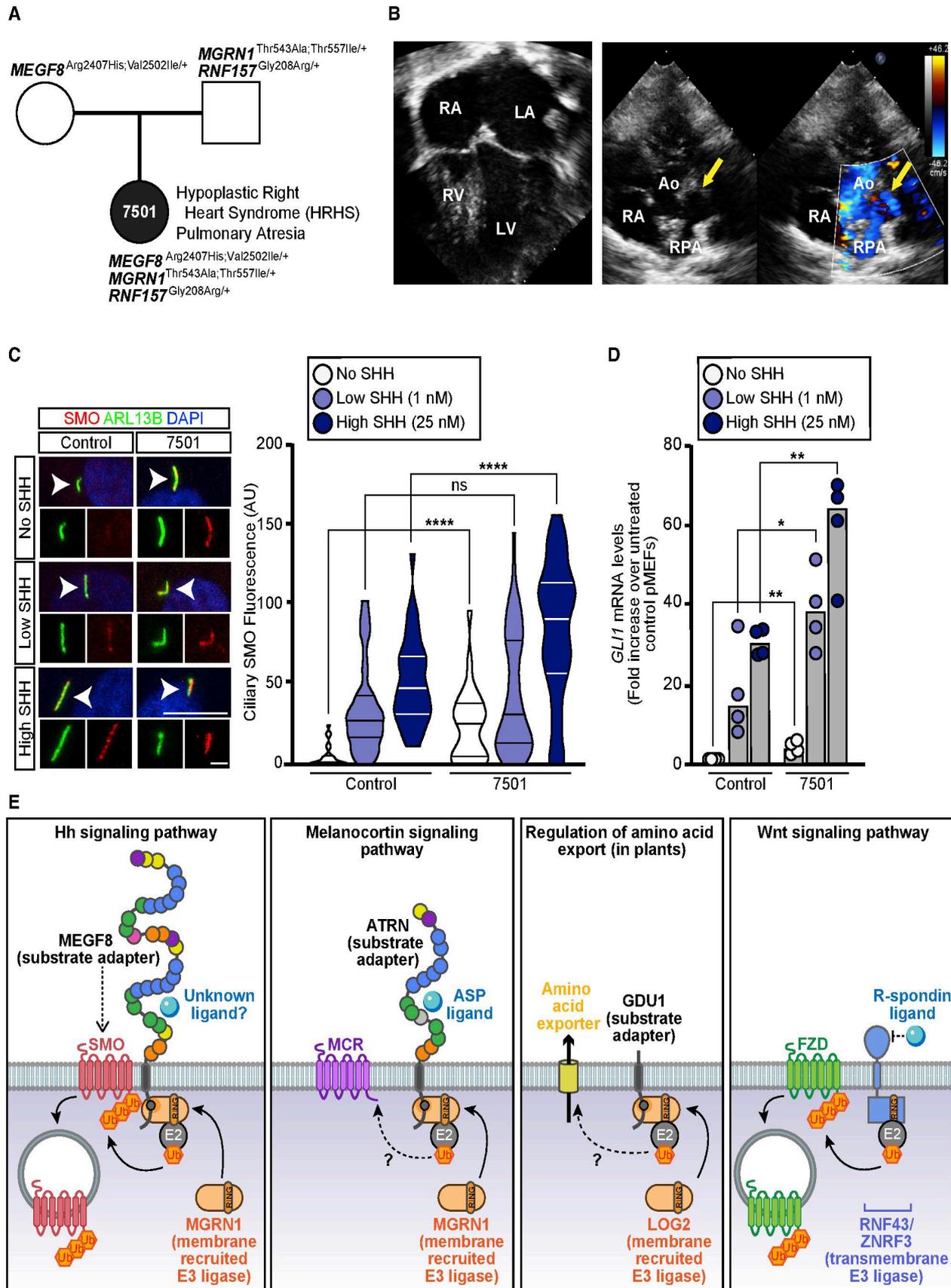
Using a combination of mechanistic studies, mouse genetics, and deep anatomical phenotyping, we uncovered a unique membrane-tethered ubiquitination pathway that regulates developmental patterning in a variety of tissues by controlling the trafficking of signaling receptors. MEGF8 functions as a TM substrate adaptor that recruits a cytoplasmic E3 ligase (MGRN1) to catalyze the ubiquitination of SMO, leading to its endocytosis and degradation (Figure 7E). This ubiquitination reaction reduces the abundance of SMO at the cell surface and primary cilium, and consequently, dampens Hh signaling in target cells.

While cilia-localized ubiquitination is emerging as a mechanism that regulates ciliary trafficking (Desai et al., 2020; Shinde et al., 2020), the function of the MEGF8-MGRN1 complex is unlikely to be related to cilia or ciliary trafficking. Cell-surface biotinylation experiments (see Figure S5) clearly show that overall cell-surface SMO (not just ciliary SMO) rises dramatically in mutant cells. In addition, we have not been able to detect MGRN1 or MEGF8 in cilia. Hence, the ciliary accumulation of SMO in *Megf8<sup>m/m</sup>* and *Mgmn1<sup>m/m</sup>* cells and embryos is likely to be a secondary consequence of increased cell-surface SMO.

### Receptor-like Ubiquitin Ligases Attenuate Signaling Strength

The architecture of the MEGF8-MGRN1 complex is notable for the presence of a membrane-spanning component with an extracellular or luminal domain (Figure 7E). This feature suggests a receptor-like function, conceptually analogous to receptor kinases, to transmit extracellular or luminal signals across the membrane to alter the ubiquitination of substrates in the cytoplasm. Interestingly, Frizzled (FZD) proteins, receptors for WNT

(C) Table shows the frequencies of CHDs, preaxial digit duplication, and laterality defects observed in mouse embryos carrying increasing numbers of mutant alleles of *Megf8*, *Mgmn1*, and *Rnf157*. Darker shades of orange and green indicate a higher penetrance of the indicated birth defect and laterality phenotype, respectively. A detailed phenotypic analysis of every embryo of each genotype can be found in Tables S1–S5 and a full compilation of the penetrance of various phenotypes is provided in Table S6. For a more detailed analysis of the correlation between laterality and CHD phenotypes observed in *Megf8<sup>m/+</sup>;Mgmn1<sup>m/+</sup>* embryos, refer to Table S7. See also Tables S1–S7.



(legend on next page)

ligands that are the closest relatives of SMO in the GPCR superfamily (Bjarnadóttir et al., 2006) are regulated by transmembrane E3 ligases (RNF43 and ZNRF3) in which the RING-containing domain is directly fused to the membrane-spanning component (Figure 7E). While a ligand for MEGF8 remains unknown, ZNRF3 and RNF43 are regulated by R-Spondin ligands, critical regulators of progenitor cells during development, and stem cells in adult tissues (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012). The ubiquitination of receptors by membrane-tethered E3 ligases represents an attractive post-transcriptional mechanism to control the sensitivity of tissues to signaling ligands during development or tissue renewal.

Evolutionary sequence analysis supports a widespread role for MGRN1-based TM E3 ligase complexes in ubiquitin signaling. In animals and their immediate sister lineages, MGRN1 and RNF157 likely function as common components of multiple membrane-tethered E3 ligase complexes featuring members of the MEGF8 family of cell-surface proteins, all of which contain an equivalent of the cytoplasmic MASRPFA motif (Figure S4A) (Gunn et al., 1999; Haqq et al., 2003; Nagle et al., 1999). For example, MGRN1 and a different member of this family, Attractin (ATRN), have been implicated in the regulation of melanocortin receptor levels (Figure 7E) (Cooray et al., 2011; Walker, 2010). A plant ubiquitin ligase, LOG2, which belongs to the MGRN1 family, associates with and ubiquitinates a single TM protein Glutamine dumper-1 (GDU1), which in turn regulates aa transport (Figure 7E) (Guerra et al., 2013). Strikingly, human MGRN1 can functionally replace LOG2 in plants (Guerra et al., 2013). We propose that the MGRN1 family of RING E3 ligases can associate more generally across eukaryotes with single-pass TM proteins, each of which functions as a substrate adaptor to target the ubiquitination of specific receptors or transporters (Figure 7E).

It will be interesting to unravel how these TM E3 ligases are regulated in cells. Key questions include the potential role of phosphorylation in modulating ligase activity or substrate recognition, the type of molecular linkages used in the ubiquitin chains attached to SMO, and the identity of the deubiquitinase that opposes the function of MGRN1. Most interesting is the mysterious function of the large MEGF8 extracellular domain, which may allow regulation of Hh signaling by an extracellular ligand, extracellular matrix protein, or homotypic interaction (Figure 7E).

### Role of Hh Signaling in Left-Right Patterning and Heart Development

Our vismodegib rescue experiments (Figure 1) strongly suggest that preaxial digit duplication phenotypes in mice carrying mutant alleles of *Megf8* and *Mgrn1* are caused by elevated Hh signaling. However, further work will be required to determine whether the heterotaxy and CHD phenotypes are also caused entirely by increased Hh signaling.

Both decreased and increased Hh signaling has previously been implicated in left-right patterning, a very early event in development that directs the correct asymmetric development of the heart and other visceral organs (Levin et al., 1995; Tsiairis and McMahon, 2009; Zhang et al., 2001). The genetic deletion of SMO, which reduces Hh signaling strength, disrupts left-right patterning and causes a midline heart tube that fails to loop to the right and an embryo that fails to turn (Zhang et al., 2001). Conversely, ablation of the conserved negative regulator SUFU, which causes increased Hh signaling, also leads to left-right patterning defects (Cooper et al., 2005). *Sufu*<sup>-/-</sup> embryos fail to undergo embryonic turning, have a ~30%–40% frequency of reversed heart looping (L-looping), and show either bilateral or absent expression of *Pitx2*, an established determinant of organ situs. These seemingly discordant results may be explained by the idea that left-right patterning (like digit patterning, see Figure 1F) depends on a just-right “goldilocks” level of Hh signal amplitude or duration.

Hh signaling also influences multiple aspects of heart development: development of the secondary heart field and proper septation of the atria and outflow tract (Dyer and Kirby, 2009; Hoffmann et al., 2009; Washington Smoak et al., 2005). Thus, CHDs seen in our mutant mice may be caused by both early defects in left-right patterning and by later defects in Hh-mediated patterning of the cardiac septa and outflow tract. The common link of both processes to the precisely calibrated level of Hh signaling may explain the tight association between heterotaxy and CHDs that has been long-noted in clinical studies and is recapitulated in our mutant mouse embryos (Pradat et al., 2003).

We acknowledge that MEGF8 and MGRN1/RNF157 may regulate signaling receptors other than SMO, and some of the birth defect phenotypes we observe may be related to the disruption of other signaling pathways. Genetic and pharmacological experiments that attenuate Hh signaling or disrupt

### Figure 7. Damaging Variants in *MEGF8*, *MGRN1*, and *RNF157* Are Associated with Congenital Heart Defects in Humans

(A) Trio pedigree analysis showing the inheritance of *MEGF8*, *MGRN1*, and *RNF157* variants from two affected parents to a progeny (patient 7501) with a severe CHD. The position of these variants in *MEGF8*, *MGRN1*, and *RNF157*, their evolutionary conservation, allele frequency, and predicted damaging effect on protein function are shown in Figures S7A and S7B. Whole-exome sequencing results can be found in Table S8.

(B) Four-chamber view (left) or short axis view (right) of an echocardiogram from patient 7501 demonstrating a hypoplastic right ventricle (RV) and membranous pulmonary atresia (yellow arrows). RA, right atrium; LA, left atrium; LV, left ventricle; RPA, Right Pulmonary Artery; Ao, Aorta.

(C and D) Ciliary SMO (C) or *GLI1* qRT-PCR (D) was used to assess Hh signaling in primary fibroblasts from patient 7501 (A) and from an unaffected control. Scale bars are 10  $\mu$ m in merged panels and 2  $\mu$ m in zoomed displays. The violin plot in (C) summarizes the quantification of SMO at ~20–50 cilia for each condition, where the horizontal lines denote the median and interquartile range. The bars in (D) denote the median *GLI1* mRNA values derived from the four individual measurements shown. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney test (C) and unpaired t-test (D); not-significant (ns) > 0.05, \*p value  $\leq$  0.05, \*\*p value  $\leq$  0.01, and \*\*\*\*p value  $\leq$  0.0001.

(E) Regulation of signaling and transport by receptor-like E3 ubiquitin ligases. A model for the mechanism of SMO regulation by the MEGF8-MGRN1 complex (far left) highlights its conceptual similarity to the regulation of melanocortin receptors (MCRs) by the ATRN-MGRN1 complex (middle left), aa export by the GDU1-LOG2 complex in plants (middle right), and FZD receptors for WNT ligands by the ZNRF3/RNF43 family of TM E3 ligases (far right). MEGF8 functions as a TM substrate adaptor, recruiting MGRN1 (and presumably an unknown E2 enzyme) through its Ctail to promote the ubiquitination of SMO. SMO ubiquitination leads to its internalization and degradation, thus attenuating responses to Hh ligands. See also Figure S7 and Table S8.

the MEGF8-MGRN1 complex at earlier time points in development or in specific tissues (such as the lateral plate mesoderm or developing cardiac outflow tract) will be required to uncover the molecular and cellular mechanisms through which these proteins regulate left-right patterning and heart development.

### Oligogenic Interactions and Gene Dosage Effects Underlie Birth Defects

While single heterozygous *Megf8*<sup>m/+</sup> and *Mgrn1*<sup>m/+</sup> embryos are normal, double heterozygous *Megf8*<sup>m/+</sup>;*Mgrn1*<sup>m/+</sup> embryos display CHDs with heterotaxy. This phenomenon has been called “synthetic haploinsufficiency” and can result in an oligogenic pattern of inheritance, where mutations in one gene affect the phenotypic outcome of mutations in a different gene (Kousi and Katsanis, 2015; Veitia et al., 2013). Synthetic haploinsufficiency is most commonly seen between genes that encode subunits of a protein complex, like MEGF8 and MGRN1 (Veitia, 2010). Pioneering studies of Bardet-Biedl Syndrome (BBS) and other inherited retinopathies have demonstrated the importance of oligogenic interactions for understanding the genetic etiology of human diseases (Badano et al., 2006; Katsanis et al., 2000).

Beyond binary genetic interactions, the penetrance and expressivity of birth defect phenotypes progressively increase as an inverse function of the gene dosage of *Megf8*, *Mgrn1*, and *Rnf157*. We propose that this quantitative effect of mutations in this pathway is explained by the central role of the MEGF8-MGRN1 pathway in calibrating the amplitude of Hh signaling in target cells. The inheritance of increasing numbers of *Megf8*, *Mgrn1*, and *Rnf157* mutant alleles will lead to a progressive decrease in the abundance (and hence activity) of the MEGF8-MGRN1/RNF157 complex. Decreasing E3 ligase activity will result in progressive increases in cell-surface and ciliary SMO and, thus, increases in target cell sensitivity to Hh ligands. More generally, our results show that developmental patterning events can be tightly regulated by mechanisms in target cells that function to precisely tune sensitivity to extracellular morphogens.

We finish by noting that our genetic analyses highlight how interactions between a small number of genes can produce a complex inheritance pattern (common to many human diseases). Homozygous mutations in *Megf8* result in a uniform phenotypic spectrum, with 100% of embryos displaying TGA, heterotaxy, and preaxial digit duplication. However, the co-inheritance of one mutant allele of *Megf8* with one mutant allele of *Mgrn1* (even in the homogeneous genetic background of inbred mice) results in both incomplete penetrance and variable expressivity of phenotypes, manifested by a wider range of CHDs, such as TGA, DORV, and septal defects. Indeed, whole-exome sequencing studies of human CHD cohorts increasingly support a prominent role for such oligogenic inheritance mechanisms in the genetic etiology of CHDs (Gifford et al., 2019; Jin et al., 2017; Liu et al., 2017, 2020; Priest et al., 2016).

### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead Contact
  - Materials Availability
  - Data and Code Availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - NIH/3T3 and HEK293T Cell Culture
  - Generation of Primary Mouse Embryonic Fibroblasts
  - Patient Recruitment and Nasal Sampling for Patient Derived Fibroblast Cultures
  - Hh Signaling Assays in NIH/3T3 Cells and Primary Fibroblasts
  - Neural Progenitor Differentiation Assay
  - Generation of Knockout Cell Lines
  - Generation of Stable Cell Lines Expressing Transgenes
  - Established Mouse Lines
  - Generation and Validation of *Rnf157*<sup>-/-</sup> Mutant Mice
- METHOD DETAILS
  - Constructs
  - Reagents and Antibodies
  - Protein Sequence Analysis
  - Immunoprecipitation and Western Blotting
  - Flow Cytometry of Live Cells
  - SMO Internalization Assay
  - Ubiquitination Assay
  - Immunofluorescence Staining of Cells and Tissue and Image Quantifications
  - Vismodegib Dosing via Oral Gavage
  - Mouse Embryo Phenotyping Analysis
  - Variant Discovery and Validation
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.08.012>.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Robert Lipinski for invaluable advice on the *in utero* treatment of embryos with vismodegib, Derek Silvius and Janet Peters for genotyping, the McLaughlin Research Institute Animal Resource staff for animal care, and Connie Chuy for her mouse and heart diagrams. R.R. was supported by a grant from the National Institutes of Health (GM118082), G.P. by a postdoctoral fellowship from the American Heart Association (14POST20370057), and J.K. by a postdoctoral fellowship from the American Heart Association (19POST34380734) and a K99/R00 award from the NIH (GM13251801). C.W.L., C.B.Y., and S.H. were supported by grants from the NIH (HL142788 and HL132024) and the DOD (W81XWH-15-1-0649 and W81XWH-16-1-0613). A.K. and L.A. are supported by the intramural funds of the National Library of Medicine, NIH.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, J.H.K., G.V.P., R.R., C.W.L., and T.M.G.; Methodology, J.H.K., C.B.Y., and T.M.G.; Formal analysis, A.K., L.A., J.H.K., and C.B.Y.; Investigation, J.H.K., G.V.P., C.B.Y., T.M.G., C.P., S.H., J.-H.I.L., W.D., A.M.d.B., and T.S.A.; Resources, R.R., C.W.L., T.M.G., J.I.L., and W.D.; Writing – Original Draft, J.H.K., R.R., and C.W.L.; Writing – Revision and Editing, J.H.K., R.R., C.W.L., T.M.G., G.V.P., and C.B.Y.; Visualization, J.H.K., G.V.P., C.B.Y., A.K., L.A., and C.B.Y.; Supervision, R.R., C.W.L., T.M.G., and L.A.; Project Administration, J.H.K.; Funding Acquisition, R.R., C.W.L., T.M.G., and L.A.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 10, 2020

Revised: July 23, 2020

Accepted: August 27, 2020

Published: September 22, 2020

## REFERENCES

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 44, W344–W350.
- Aune, C.N., Chatterjee, B., Zhao, X.Q., Francis, R., Bracero, L., Yu, Q., Rosenthal, J., Leatherbury, L., and Lo, C.W. (2008). Mouse model of heterotaxy with single ventricle spectrum of cardiac anomalies. *Pediatr. Res.* 63, 9–14.
- Van der Auwera, G.A., Carneiro, M.O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., et al. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 43, 11.10.1–11.10.33.
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., and Katsanis, N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 125–148.
- Berberi, N.F., Johnson, A.D., Lewis, J.S., Askwith, C.C., and Mykityn, K. (2008). Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell* 19, 1540–1547.
- Bishop, B., Aricescu, A.R., Harlos, K., O’Callaghan, C.A., Jones, E.Y., and Siebold, C. (2009). Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 698–703.
- Bjarnadóttir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88, 263–273.
- Byrne, E.F.X., Sircar, R., Miller, P.S., Hedger, G., Luchetti, G., Nachtergaele, S., Tully, M.D., Mydock-McGrane, L., Covey, D.F., Rambo, R.P., et al. (2016). Structural basis of smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature* 535, 517–522.
- Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P.K., and Kaufman, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4, e6529.
- Chakrabarti, O., and Hegde, R.S. (2009). Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. *Cell* 137, 1136–1147.
- Cooper, A.F., Yu, K.P., Brueckner, M., Brailey, L.L., Johnson, L., McGrath, J.M., and Bale, A.E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development* 132, 4407–4417.
- Cooray, S.N., Guasti, L., and Clark, A.J.L. (2011). The E3 ubiquitin ligase Mahogunin ubiquitinates the melanocortin 2 receptor. *Endocrinology* 152, 4224–4231.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021.
- Cota, C.D., Bagher, P., Pelc, P., Smith, C.O., Bodner, C.R., and Gunn, T.M. (2006). Mice with mutations in Mahogunin ring finger-1 (Mgmn1) exhibit abnormal patterning of the left-right axis. *Dev. Dyn.* 235, 3438–3447.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
- DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* 43, 491–498.
- Desai, P.B., Stuck, M.W., Lv, B., and Pazour, G.J. (2020). Ubiquitin links smoothed to intraflagellar transport to regulate Hedgehog signaling. *J. Cell Biol.* 219.
- Dickinson, M.E., Flenniken, A.M., Ji, X., Teboul, L., Wong, M.D., White, J.K., Meehan, T.F., Weninger, W.J., Westerberg, H., Adissu, H., et al. (2016). High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* 537, 508–514.
- Dorn, K.V., Hughes, C.E., and Rohatgi, R. (2012). A smoothed-Evc2 complex transduces the hedgehog signal at primary cilia. *Dev. Cell* 23, 823–835.
- Durkin, M.E., Qian, X., Popescu, N.C., and Lowy, D.R. (2013). Isolation of mouse embryo fibroblasts. *Bio Protoc.* 3 e908.
- Dyer, L.A., and Kirby, M.L. (2009). Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. *Dev. Biol.* 330, 305–317.
- Engelhard, C., Sarsfield, S., Merte, J., Wang, Q., Li, P., Beppu, H., Kolodkin, A.L., Sucov, H.M., and Ginty, D.D. (2013). MEGF8 is a modifier of BMP signaling in trigeminal sensory neurons. *eLife* 2, e01160.
- García-Barcelona, C., Osinalde, N., Ramirez, J., and Mayor, U. (2020). How to inactivate human ubiquitin E3 ligases by mutation. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 39.
- Gifford, C.A., Ranade, S.S., Samarakoon, R., Salunga, H.T., de Soysa, T.Y., Huang, Y., Zhou, P., Effenbein, A., Wyman, S.K., Bui, Y.K., et al. (2019). Oligogenic inheritance of a human heart disease involving a genetic modifier. *Science* 364, 865–870.
- Guerra, D.D., Pratelli, R., Kraft, E., Callis, J., and Pilot, G. (2013). Functional conservation between mammalian MGRN1 and plant LOG2 ubiquitin ligases. *FEBS Lett.* 587, 3400–3405.
- Gunn, T.M., Miller, K.A., He, L., Hyman, R.W., Davis, R.W., Azarani, A., Schlossman, S.F., Duke-Cohan, J.S., and Barsh, G.S. (1999). The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* 398, 152–156.
- Gunn, T.M., Silvius, D., Bagher, P., Sun, K., and Walker, K.K. (2013). MGRN1-dependent pigment-type switching requires its ubiquitination activity but not its interaction with TSG101 or NEDD4. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, 263–268.
- Gunn, T.M., Silvius, D., Lester, A., and Gibbs, B. (2019). Chronic and age-dependent effects of the spongiform neurodegeneration-associated MGRN1 E3 ubiquitin ligase on mitochondrial homeostasis. *Mamm. Genome* 30, 151–165.
- Hao, H.X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195–200.
- Haq, A.M., René, P., Kishi, T., Khong, K., Lee, C.E., Liu, H., Friedman, J.M., Elmquist, J.K., and Cone, R.D. (2003). Characterization of a novel binding partner of the melanocortin-4 receptor: attractin-like protein. *Biochem. J.* 376, 595–605.
- Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., and Tabin, C.J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118, 517–528.
- He, L., Lu, X.Y., Jolly, A.F., Eldridge, A.G., Watson, S.J., Jackson, P.K., Barsh, G.S., and Gunn, T.M. (2003). Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* 299, 710–712.
- Heyne, G.W., Melberg, C.G., Doroodchi, P., Parins, K.F., Kietzman, H.W., Everson, J.L., Ansen-Wilson, L.J., and Lipinski, R.J. (2015). Definition of critical

- periods for Hedgehog pathway antagonist-induced holoprosencephaly, cleft lip, and cleft palate. *PLoS One* **10**, e0120517.
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., and Vinh, L.S. (2018). UFBBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 518–522.
- Hoffmann, A.D., Peterson, M.A., Friedland-Little, J.M., Anderson, S.A., and Moskowitz, I.P. (2009). sonic hedgehog is required in pulmonary endoderm for atrial septation. *Development* **136**, 1761–1770.
- Jiao, J., Sun, K., Walker, W.P., Bagher, P., Cota, C.D., and Gunn, T.M. (2009). Abnormal regulation of TSG101 in mice with spongiform neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1027–1035.
- Jin, S.C., Homsy, J., Zaidi, S., Lu, Q., Morton, S., DePalma, S.R., Zeng, X., Qi, H., Chang, W., Sierant, M.C., et al. (2017). Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat. Genet.* **49**, 1593–1601.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermini, L.S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **14**, 587–589.
- Katsanis, N., Beales, P.L., Woods, M.O., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Ansley, S.J., Davidson, W.S., and Lupski, J.R. (2000). Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **26**, 67–70.
- Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O’Roak, B.J., Cooper, G.M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315.
- Koo, B.K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., and Clevers, H. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* **488**, 665–669.
- Kousi, M., and Katsanis, N. (2015). Genetic modifiers and oligogenic inheritance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a017145.
- Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc* **4**, 1073–1081.
- Lassmann, T., Frings, O., and Sonnhammer, E.L.L. (2009). Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Res* **37**, 858–865.
- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803–814.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760.
- Lim, K.L., Chew, K.C.M., Tan, J.M.M., Wang, C., Chung, K.K.K., Zhang, Y., Tanaka, Y., Smith, W., Engelender, S., Ross, C.A., et al. (2005). Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J. Neurosci.* **25**, 2002–2009.
- Lin, A.E., Krikov, S., Riehle-Colarusso, T., Frias, J.L., Belmont, J., Anderka, M., Geva, T., Getz, K.D., Botto, L.D., and Study, N.B.D.P. (2014). Laterality defects in the national birth defects prevention study (1998–2007): birth prevalence and descriptive epidemiology. *Am. J. Med. Genet.* **164**, 2581–2591.
- Lipinski, R.J., Holloway, H.T., O’Leary-Moore, S.K., Ament, J.J., Pecevich, S.J., Cofer, G.P., Budin, F., Everson, J.L., Johnson, G.A., and Sulik, K.K. (2014). Characterization of subtle brain abnormalities in a mouse model of Hedgehog pathway antagonist-induced cleft lip and palate. *PLoS One* **9**, e102603.
- Litingtung, Y., Dahn, R.D., Li, Y., Fallon, J.F., and Chiang, C. (2002). Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* **418**, 979–983.
- Liu, X., Chen, W., Li, W., Priest, J.R., Fu, Y., Pang, K., Ma, B., Han, B., Liu, X., Hu, S., and Zhou, Z. (2020). Exome-based case-control analysis highlights the pathogenic role of ciliary genes in transposition of the great arteries. *Circ. Res.* **126**, 811–821.
- Liu, X., Tobita, K., Francis, R.J., and Lo, C.W. (2013). Imaging techniques for visualizing and phenotyping congenital heart defects in murine models. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **99**, 93–105.
- Liu, X., Yagi, H., Saeed, S., Bais, A.S., Gabriel, G.C., Chen, Z., Peterson, K.A., Li, Y., Schwartz, M.C., Reynolds, W.T., et al. (2017). The complex genetics of hypoplastic left heart syndrome. *Nat. Genet.* **49**, 1152–1159.
- Milenkovic, L., Scott, M.P., and Rohatgi, R. (2009). Lateral transport of smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J. Cell Biol.* **187**, 365–374.
- Nagle, D.L., McGrail, S.H., Vitale, J., Woolf, E.A., Dussault, B.J., Jr., DiRocco, L., Holmgren, L., Montagnò, J., Bork, P., Huszar, D., et al. (1999). The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* **398**, 148–152.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., and Minh, B.Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274.
- Phillips, R.J. (1963). New mutant: non-agouti curly. *Mouse News Lett.* **29**, 38.
- Pradat, P., Francannet, C., Harris, J.A., and Robert, E. (2003). The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large registries of congenital malformations. *Pediatr. Cardiol.* **24**, 195–221.
- Priest, J.R., Osoegawa, K., Mohammed, N., Nanda, V., Kundu, R., Schultz, K., Lammer, E.J., Girirajan, S., Scheetz, T., Waggott, D., et al. (2016). De novo and rare variants at multiple loci support the oligogenic origins of atrioventricular septal heart defects. *PLoS Genet* **12**, e1005963.
- Pusapati, G.V., Hughes, C.E., Dorn, K.V., Zhang, D., Sugianto, P., Aravind, L., and Rohatgi, R. (2014). EFCAB7 and IQCE regulate hedgehog signaling by tethering the EVC-EVC2 complex to the base of primary cilia. *Dev. Cell* **28**, 483–496.
- Pusapati, G.V., Kong, J.H., Patel, B.B., Krishnan, A., Sagner, A., Kinnebrew, M., Briscoe, J., Aravind, L., and Rohatgi, R. (2018). CRISPR screens uncover genes that regulate target cell sensitivity to the morphogen sonic hedgehog. *Dev. Cell* **44**, 271.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401–1416.
- Rio, D.C., Ares, M., Jr., Hannon, G.J., and Nilsen, T.W. (2010). Purification of RNA using Trizol (TRI reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb.prot5439.
- Rivera, G.M., Vasilescu, D., Papayannopoulos, V., Lim, W.A., and Mayer, B.J. (2009). A reciprocal interdependence between Nck and PI(4,5)P(2) promotes localized N-WASP-mediated actin polymerization in living cells. *Mol. Cell* **36**, 525–535.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372–376.
- Rosset, A., Spadola, L., and Ratib, O. (2004). OsiriX: an open-source software for navigating in multidimensional DICOM images. *J. Digit. Imaging* **17**, 205–216.
- Sagner, A., Gaber, Z.B., Delille, J., Kong, J.H., Rousso, D.L., Pearson, C.A., Weicksel, S.E., Melchionda, M., Mousavy Gharavy, S.N., Briscoe, J., and Novitch, B.G. (2018). Olig2 and Hes regulatory dynamics during motor neuron differentiation revealed by single cell transcriptomics. *PLoS Biol.* **16**, e2003127.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682.
- Shinde, S.R., Nager, A.R., and Nachury, M.V. (2020). Lysine63-linked ubiquitin chains earmark GPCRs for BBSome-mediated removal from cilia. *bioRxiv* [bioRxiv](https://doi.org/10.1101/2020.03.05.2020.03.04.977090) **2020.03.05.2020.03.04.977090**.full.pdf.

- Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S.V., Mynett, A., and Briscoe, J. (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* *19*, 626–641.
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F., and Zeller, R. (2002). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* *298*, 827–830.
- Tröder, S.E., Ebert, L.K., Butt, L., Assenmacher, S., Schermer, B., and Zevnik, B. (2018). An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes. *PLoS One* *13*, e0196891.
- Tsiairis, C.D., and McMahon, A.P. (2009). An Hh-dependent pathway in lateral plate mesoderm enables the generation of left/right asymmetry. *Curr. Biol.* *19*, 1912–1917.
- Twigg, S.R., Lloyd, D., Jenkins, D., Elçioglu, N.E., Cooper, C.D., Al-Sanna, N., Annagür, A., Gillissen-Kaesbach, G., Hüning, I., Knight, S.J.L., et al. (2012). Mutations in multidomain protein MEGF8 identify a Carpenter syndrome subtype associated with defective lateralization. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 897–905.
- UniProt Consortium (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* *47*, D506–D515.
- Veitia, R.A. (2010). A generalized model of gene dosage and dominant negative effects in macromolecular complexes. *FASEB J.* *24*, 994–1002.
- Veitia, R.A., Bottani, S., and Birchler, J.A. (2013). Gene dosage effects: nonlinearities, genetic interactions, and dosage compensation. *Trends Genet.* *29*, 385–393.
- Walker, W. (2010). Studies of the pigment-type switching genes *ATRN* and *MGRN1*: evidence for a defect in endosomal/lysosomal protein trafficking as a cause of hyperpigmentation and spongiform neurodegeneration, Phd Dissertation (Cornell University).
- Washington Smoak, I., Byrd, N.A., Abu-Issa, R., Goddeeris, M.M., Anderson, R., Morris, J., Yamamura, K., Klingensmith, J., and Meyers, E.N. (2005). Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev. Biol.* *283*, 357–372.
- Zhang, X.M., Ramalho-Santos, M., and McMahon, A.P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* *106*, 781–792.
- Zhang, Z., Alpert, D., Francis, R., Chatterjee, B., Yu, Q., Tansey, T., Sabol, S.L., Cui, C., Bai, Y., Koriabine, M., et al. (2009). Massively parallel sequencing identifies the gene *Megf8* with ENU-induced mutation causing heterotaxy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 3219–3224.
- Zhao, Z., Lee, R.T.H., Pusapati, G.V., Iyu, A., Rohatgi, R., and Ingham, P.W. (2016). An essential role for *Grk2* in Hedgehog signalling downstream of smoothed. *EMBO Rep.* *17*, 739–752.

**STAR★METHODS**

**KEY RESOURCES TABLE**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse monoclonal anti-1D4	The University of British Columbia	RRID: AB_325050
Guinea pig polyclonal anti-ARL13B	<a href="#">Dorn et al., 2012</a>	N/A
Mouse monoclonal anti-CD16 (clone 3G8)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-19620; RRID: AB_626924
Mouse monoclonal anti-CD16 (clone DJ130c)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-20052; RRID: AB_626925
Mouse monoclonal anti-FLAG (clone M2)	MilliporeSigma	Cat#F1804; RRID: AB_26204
Mouse monoclonal anti-GLI1 (clone L42B10)	Cell Signaling	Cat#2643; RRID: AB_2294746
Goat polyclonal anti-GFP	Rockland Immunochemicals	Cat#600-101-215; RRID: AB_218182
Rabbit polyclonal anti-GFP	Novus Biologicals	Cat#NB600-308; RRID: AB_10003058
Mouse monoclonal anti-HA.11 (clone 16B12)	Biologend	Cat#901513; RRID: AB_256335
Mouse monoclonal anti-HA (clone 2-2.2.14)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#26183; RRID: AB_10978021
Rabbit polyclonal anti-MEGF8	This paper	N/A
Rabbit polyclonal anti-p38	Abcam	Cat#ab7952; RRID: AB_306166
Rabbit polyclonal anti-RNF156 (anti-MGRN1)	Proteintech	Cat#11285-1-AP; RRID: AB_2143351
Rabbit polyclonal anti-SMO	<a href="#">Rohatgi et al., 2007</a>	N/A
Rabbit polyclonal anti-SMO-N	<a href="#">Milenkovic et al., 2009</a>	N/A
Mouse monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin (clone DM1A)	MilliporeSigma	Cat#T6199; RRID: AB_477583
Mouse monoclonal anti-Tubulin, acetylated	MilliporeSigma	Cat#T6793; RRID: AB_477585
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	Cat#715-035-150; RRID: AB_2340770
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	Cat#111-035-144; RRID: AB_2307391
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	Cat#705-035-003; RRID: AB_2340390
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) High Ly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#A-21206; RRID: AB_2535792
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#A-21207; RRID: AB_141637
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#A-21202; RRID: AB_141607
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#A-31571; RRID: AB_162542
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	Cat#706-545-148; RRID: AB_2340472
Alexa Fluor 647 AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	Cat#706-605-148; RRID: AB_2340476
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
Rosetta2(DE3)pLysS competent cells	MilliporeSigma (Novagen)	Cat#71403
<b>Biological Samples</b>		
Patient derived fibroblast cultures	Children's Hospital of Pittsburgh (University of Pittsburgh)	N/A
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#31350010
Bafilomycin A1	Cayman Chemical	Cat#11038
Bortezomib, Free Base	LC Laboratories	Cat#B-1408
Cas9 2NLS Nuclease	Synthego	N/A
CHIR 99021	Axon Medchem	Cat#Axon 1386
Recombinant mouse FGF basic/FGF2/bFGF protein	R&D Systems	Cat#31339-FB
Hygromycin B (50 mg/ml in solution, Ultra Pure Grade)	VWR Life Science	Cat#97064-454

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Hoechst 33342 solution (20uM)	Thermo Fisher Scientific	Cat#62249
ESGRO recombinant mouse leukemia inhibitory factor (LIF) protein	MilliporeSigma	Cat#ESG1106
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Fisher Scientific	Cat#21331
Gateway LR Clonase II enzyme	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#11791020
Gibson Assembly Master Mix	New England Biolabs	Cat#E2611
GoTaq Green Master Mix	Promega Corporation	Cat#M712
Methyl cellulose (viscosity: 4000 cP)	MilliporeSigma	Cat#M0512
N-Ethylmaleimide	MilliporeSigma	Cat#E3876
PD 98059	Axon Medchem	Cat#Axon 1223
Penicillin:Streptomycin solution	Gemini Bioproducts	Cat#400-109
PhosSTOP	MilliporeSigma	Cat#PHOSS-RO
Polyethylenimine (PEI), Linear, MW 25000, Transfection Grade	Polysciences	Cat#23966-1
Retinoic Acid	MilliporeSigma	Cat#R2625
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	MilliporeSigma	Cat#107689
Puromycin dihydrochloride	MilliporeSigma	Cat#P8833
SAG (Smoothened agonist)	Enzo Life Sciences	Cat#NC9953751
SIGMAFAST protease inhibitor tablets	MilliporeSigma	Cat# S8820
Sonic hedgehog (recombinant)	<a href="#">Bishop et al., 2009</a>	N/A
Vismodegib, Free Base	LC Laboratories	Cat#V-4050
X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent	Roche Molecular Systems	Cat#XTG9-RO
B-27 Supplement (50x), minus antioxidants	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#10889038
Bovine serum albumin solution (30% in DPBS)	MilliporeSigma	Cat#A9576
Bovine serum albumin	MilliporeSigma	Cat#A3059
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) high glucose without L-glutamine and sodium pyruvate (Hyclone)	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#SH30081FS
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)/F12, no glutamine	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#21331020
Dynabeads Protein A for immunoprecipitation	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#10002D
Dynabeads M-270 carboxylic acid	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#14305D
EmbryoMax advanced KSOM embryo medium	MilliporeSigma	Cat#MR-101-D
EmbryoMax nucleosides (100x)	MilliporeSigma	Cat#ES-008-D
L-glutamine solution	Gemini Bioproducts	Cat#400-106
MEM Non-essential amino acids solution	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#11140050
N-2 Supplement (100x)	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#17502048
Neurobasal Medium	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#21103049
NuPAGE-LDS sample buffer (4X)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#NP0007
Opti-MEM reduced serum medium	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#3985062
RPMI medium	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#11875135
Sodium pyruvate	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#11360070
Streptavidin agarose ultra performance resin	TriLink Biotechnologies	Cat#N-1000
Tissue-Plus OCT compound	Thermo Fisher Scientific	Cat#23-730-571
TRIZOL reagent	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#15596026
Trypsin-EDTA solution (0.05%), phenol red	Gemini Bioproducts	Cat#400-150
Trypsin-EDTA solution (0.25%), phenol red	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	Cat#25200072
<b>Critical Commercial Assays</b>		
SureSelect XT Human All Exon V4	Agilent	Cat#5190-4635
Direct-zol RNA miniprep kit	Zymo Research	Cat#R2050

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	Cat#74134
High-capacity RNA-to-cDNA kit	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems)	Cat#4387406
iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR	Bio-rad Laboratories	Cat#1708840
SuperScript III first-strand synthesis system	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#18080051
PAXgene blood DNA kit	Qiagen	Cat#761133
Mouse embryonic stem cell nucleofector kit	Lonza Bioscience	Cat#VAPH-1001
Universal mycoplasma detection kit	ATCC	Cat#30-1012K
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
Flp-In-3T3	Thermo Fisher Scientific	Cat#R76107
293T	ATCC	Cat#CRL-3216
HM1 mESC cells with dual reporters (Olig2::T2A-mKate2 and 8xGBS-H2B::Venus)	<a href="#">Sagner et al., 2018</a>	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup>	<a href="#">Pusapati et al., 2018</a>	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + <i>MEGF8</i> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + <i>MEGF8</i> <sup>ΔN</sup> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + <i>MEGF8</i> <sup>ΔCtail</sup> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + <i>MEGF8</i> <sup>ΔMASRPFA</sup> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + CD16 <sup>ECD</sup> -CD7 <sup>TM</sup> - <i>MEGF8</i> <sup>Ctail</sup> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + CD16 <sup>ECD</sup> - <i>MEGF8</i> <sup>TM+Ctail</sup> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Megf8</i> <sup>-/-</sup> + CD16 <sup>ECD</sup> - <i>MEGF8</i> <sup>TM+CtailΔMASRPFA</sup> -1D4	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Mgrn1</i> <sup>-/-</sup>	<a href="#">Pusapati et al., 2018</a>	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Mgrn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Rnf157</i> <sup>-/-</sup>	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Mgrn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Rnf157</i> <sup>-/-</sup> + <i>Mgrn1</i> -3xFLAG	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Mgrn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Rnf157</i> <sup>-/-</sup> + <i>Mgrn1</i> <sup>Mut1</sup> -3xFLAG	This paper	N/A
NIH/3T3-Flp In <i>Mgrn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Rnf157</i> <sup>-/-</sup> + <i>Mgrn1</i> <sup>Mut1</sup> -3xFLAG	This paper	N/A
HM1 mESC <i>Mgrn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Rnf157</i> <sup>-/-</sup>	This paper	N/A
<b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>		
Mouse: <i>Mgrn1</i> <sup>m/m</sup> ; <i>Mgrn1</i> <sup>md-nc/md-nc</sup>	<a href="#">Phillips, 1963</a>	MGI#3704004
Mouse: <i>Megf8</i> <sup>m/m</sup> ; <i>Megf8</i> <sup>C193R/C193R</sup>	<a href="#">Zhang et al., 2009</a>	MGI#3722325
Mouse: <i>Rnf157</i> <sup>m/m</sup> ; <i>Rnf157</i> <sup>em1Tmg em1Tmg</sup>	This paper	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
<i>mGli1</i> and <i>mGapdh</i> qRT-PCR Primers, See <a href="#">Table S9</a>	<a href="#">Pusapati et al., 2018</a>	N/A
<i>hGLI1</i> and <i>hGAPDH</i> qRT-PCR Primers, See <a href="#">Table S9</a>	This paper	N/A
<i>mRnf157</i> qRT-PCR Primers, See <a href="#">Table S9</a>	This paper	N/A
<i>mGpi</i> qRT-PCR Primers (mice), See <a href="#">Table S9</a>	<a href="#">Gunn et al., 2013</a>	N/A
<i>mRnf157</i> genotyping PCR Primers (3T3 cells, neural progenitor cells, and mice), See <a href="#">Table S9</a>	This paper	N/A
<i>mRnf157</i> sgRNA target sequence PCR Primer (mice), See <a href="#">Table S9</a>	This paper	N/A
<i>Mgrn1</i> <sup>md-nc</sup> genotyping PCR primers, See <a href="#">Table S9</a>	<a href="#">Gunn et al., 2019</a>	N/A
<i>Megf8</i> <sup>C193R</sup> genotyping PCR Primers, See <a href="#">Table S9</a>	This paper	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
MGC premier cDNA clone for <i>MEGF8</i> (NM_001410.3)	Transomic Technologies, Inc	Cat#TCHS1003(BC153880 – glycerol stock)
pEF5/FRT/V5-DEST- <i>MEGF8</i> -1D4	This paper	N/A
pEF5/FRT/V5-DEST- <i>MEGF8</i> <sup>ΔCtail</sup> -1D4	This paper	N/A

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Mgrn1 (NM_001252437.1) gBlock	Integrated DNA Technologies	N/A
pEF5/FRT/V5-DEST- <i>Mgrn1</i> -3xFLAG	This paper	N/A
Smo <sup>KO</sup> gBlock fragment	Twist Bioscience	N/A
CD16 <sup>ECD</sup> -CD7 <sup>TM</sup> -mCherry-Nck-HA	<a href="#">Rivera et al., 2009</a>	N/A
pCS2-mSmo	<a href="#">Byrne et al., 2016</a>	N/A
pCS2-mSmo-eGFP	<a href="#">Zhao et al., 2016</a>	N/A
pEGFPN3-Sstr3	<a href="#">Berbari et al., 2008</a>	Addgene#35623
pEF5/FRT/V5-DEST gateway vector	Thermo Fisher Scientific	Cat#V602020
pLenti CMV Puro DEST	<a href="#">Campeau et al., 2009</a>	Addgene#17452
pLenti CMV Puro DEST- <i>MEGF8</i> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>MEGF8</i> <sup>ΔN</sup> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>MEGF8</i> <sup>ΔCtail</sup> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>MEGF8</i> <sup>ΔMASRPFA</sup> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>CD16</i> <sup>ECD</sup> - <i>CD7</i> <sup>TM</sup> - <i>MEGF8</i> <sup>Ctail</sup> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>CD16</i> <sup>ECD</sup> - <i>MEGF8</i> <sup>TM+Ctail</sup> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>CD16</i> <sup>ECD</sup> - <i>MEGF8</i> <sup>TM+CtailΔMASRPFA</sup> -1D4	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>Mgrn1</i> -3xFLAG	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>Mgrn1</i> <sup>Mut1</sup> -3xFLAG	This paper	N/A
pLenti CMV Puro DEST- <i>Mgrn1</i> <sup>Mut1</sup> -3xFLAG	This paper	N/A
pMD2.G	Didier Trono Lab (École Polytechnique fédérale de Lausanne)	Addgene#12259
psPAX2	Didier Trono Lab (École Polytechnique fédérale de Lausanne)	Addgene#12260
pOG44 Flp-Recombinase expression vector	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	Cat#V600520
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	<a href="#">Lim et al., 2005</a>	Addgene#17608
pRK5-HA-Ubiquitin-K0	<a href="#">Lim et al., 2005</a>	Addgene#17603
pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	<a href="#">Ran et al., 2013</a>	Addgene#48138
pSpCas9(BB)-2A-mCherry	<a href="#">Pusapati et al., 2018</a>	N/A
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	<a href="#">Ran et al., 2013</a>	Addgene#48139
pGEX vector (modified with FseI/AsclI restriction enzyme cleavage sites)	GE Healthcare	N/A
pGEX- <i>MEGF8</i> -Ctail(2738-2778)	This paper	N/A
<b>Software and Algorithms</b>		
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems	<a href="https://adobe.com/products/illustrator.html">https://adobe.com/products/illustrator.html</a>
Adobe Photoshop CS6	Adobe System	<a href="https://adobe.com/products/photoshop.html">https://adobe.com/products/photoshop.html</a>
Benchling	Benchling	<a href="https://www.benchling.com">https://www.benchling.com</a>
BlastClust	National Center for Biological Information (NCBI)	<a href="ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/documents/blastclust.html">ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/documents/blastclust.html</a>
Broad Institute Genetic Perturbation Platform (GPP) sgRNA Designer	Broad Institute	<a href="https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design">https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design</a>
ConSurf	<a href="#">Ashkenazy et al., 2016</a>	<a href="https://consurf.tau.ac.il">https://consurf.tau.ac.il</a>
Fiji	<a href="#">Schindelin et al., 2012</a>	<a href="https://fiji.sc">https://fiji.sc</a>

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
GraphPad Prism (version 8)	GraphPad Software	<a href="https://graphpad.com">https://graphpad.com</a>
IQ-TREE	<a href="#">Nguyen et al., 2015</a>	<a href="http://www.iqtree.org">http://www.iqtree.org</a>
Kalign2	<a href="#">Lassmann et al., 2009</a>	<a href="http://msa.sbc.su.se/">http://msa.sbc.su.se/</a>
Leica Application Suite X	Leica Microsystems	<a href="https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/">https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/</a>
Logo software	<a href="#">Crooks et al., 2004</a>	<a href="https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi">https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi</a>
ModelFinder	<a href="#">Kalyaanamoorthy et al., 2017</a>	<a href="http://www.iqtree.org">http://www.iqtree.org</a>
OsiriX software	<a href="#">Rosset et al., 2004</a>	<a href="https://osirix-viewer.com">https://osirix-viewer.com</a>
Position-Specific Iterated BLAST (PSI-BLAST) program	<a href="#">Altschul et al., 1997</a>	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins</a>
SnapGene (version 4.3) software	GSL Biotech	<a href="https://snappgene.com">https://snappgene.com</a>
Synthego ICE analysis	Synthego Corporation	<a href="https://ice.synthego.com/#/">https://ice.synthego.com/#/</a>
UFBoot2 program	<a href="#">Hoang et al., 2018</a>	<a href="http://www.iqtree.org">http://www.iqtree.org</a>
UniProt Align software	The UniProt Consortium	<a href="https://uniprot.org/align">https://uniprot.org/align</a>

**RESOURCE AVAILABILITY**

**Lead Contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Rajat Rohatgi ([rrohhatgi@stanford.edu](mailto:rrohhatgi@stanford.edu)).

**Materials Availability**

All unique/stable reagents generated in this study are available from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement.

**Data and Code Availability**

The published article contains all datasets generated and analyzed during this study.

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

**NIH/3T3 and HEK293T Cell Culture**

Flp-In-3T3 (a derivative of NIH/3T3 cells and referred to as “NIH/3T3” cells throughout the text) and HEK293T cell lines were purchased from Thermo Fisher Scientific and ATCC, respectively. Information on the gender of the cell lines is not available. NIH/3T3 and HEK293T cells were cultured in Complete Medium: Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) containing high glucose (Thermo Fisher Scientific, Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (MilliporeSigma), 2 mM L-Glutamine (Gemini Bioproducts), 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1x MEM non-essential amino acids solution (Thermo Fisher Scientific, Gibco), and penicillin (40 U/ml) and streptomycin (40 µg/ml) (Gemini Bioproducts). The NIH/3T3 and HEK293T cells were passaged with 0.05% Trypsin/EDTA (Gemini Bioproducts). All cells were housed at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell lines and derivatives were free of mycoplasma contamination as determined by PCR using the Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC).

**Generation of Primary Mouse Embryonic Fibroblasts**

Primary mouse embryonic fibroblasts (pMEFs) were generated using a modified published protocol ([Durkin et al., 2013](#)). Briefly, e12.5-14.5 embryos were harvested and rinsed thoroughly with PBS to remove any excess blood. Using forceps, the head and internal organs (heart and liver) were removed. The embryos were then separated into individual dishes and a sterile razor blade was used to physically mince the tissue in 0.25% Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco). After pipetting the minced tissue up and down several times to further break up the tissue, the dishes were placed in a 37 °C tissue culture incubator for 10-15 min. If there were still large tissue pieces present, the minced tissue was pipetted further and the dish was placed in the incubator for an additional 5-10 min. The trypsin was then deactivated using Complete Medium (containing 10% FBS). The cells were then centrifuged, resuspended in fresh Complete Medium, and plated. Each clonal cell line represents pMEFs generated from a single embryo. The gender of the embryos were not determined prior to generating the pMEF cultures. Cells were housed at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### Patient Recruitment and Nasal Sampling for Patient Derived Fibroblast Cultures

Patients and parents were recruited from the Children's Hospital of Pittsburgh with informed consent obtained under a human study protocol approved by the University of Pittsburgh Institutional Review Board. Control, CHD patient, and parents recruited had blood drawn for DNA extraction. CHD diagnosis was confirmed with examination of the patient's medical records. Nasal tissue was obtained from the patient by curettage of the inferior nasal turbinate using a rhino probe. The nasal epithelial tissue was plated in RPMI medium (Thermo Fisher Scientific, Gibco) with 10% FBS (MilliporeSigma) and the fibroblast outgrowths that emerged were expanded and used for Hh signaling assays (below). Both primary fibroblast cell lines (control and patient 7501) were derived from cells collected from female patients.

### Hh Signaling Assays in NIH/3T3 Cells and Primary Fibroblasts

For Hh signaling assays, NIH/3T3 cells, pMEFs, and primary human fibroblasts were first grown to confluence in Complete Medium (containing 10% FBS) and then ciliated by changing the cell medium to Low Serum Medium (Complete Medium containing 0.5% FBS) for 24 h. Cells were treated with either no SHH, a low concentration of SHH (1 nM), a high concentration of SHH (25 nM), or SAG (100 nM) for at least 4 h prior to fixation (for NIH/3T3 immunofluorescence assays), 24 h prior to lysis (for NIH/3T3 Western blot assays or NIH/3T3 RNA extraction for qRT-PCR), or 48 h prior to experimentation (for pMEF and primary human fibroblast immunofluorescence, western blot, and qRT-PCR assays).

Hh signaling activity was measured using real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). RNA was extracted from NIH/3T3 cells and mouse pMEFs using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) as previously described (Rio et al., 2010). Equal amounts of RNA were used as template for cDNA synthesis using the iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad Laboratories). qRT-PCR for *mGli1* and *mGapdh* was performed on a QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with the following custom designed primers: *mGli1* (Fwd 5'-CCAAGCCAACCTTATGTCAGGG-3' and Rev 5'-AGCCCGCTTCTTTGTTAATTTGA-3') and *mGapdh* (Fwd 5'-AGTGGCAAAGTGGAGATT-3' and Rev 5'-GTGGAGTCATACTGGAACA-3'). Similarly, RNA was isolated from primary human fibroblasts using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Equal amounts of RNA were used as template for human cDNA synthesis using the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems). qRT-PCR for *hGLI1* and *hGAPDH* was performed on a 7900HT Real-Time PCR System (Life Technologies) with the following primers: *hGLI1* (Fwd 5'-CAGGGAGGAAAGCAGACTGA-3' and Rev 5'-ACTGCTGCAGGATGACTGG-3') and *hGAPDH* (Fwd 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3' and Rev 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'). For all qRT-PCR experiments, *Gli1* transcript levels were calculated relative to *Gapdh* and reported as a fold change across conditions using the comparative  $C_T$  method ( $\Delta\Delta C_T$  method).

### Neural Progenitor Differentiation Assay

Maintenance of HM1 mouse embryonic stem cells (mESCs) harboring the GLI-Venus and OLIG2-mKate dual reporter system and their differentiation into neural progenitor cells (NPCs) was performed as described previously (Pusapati et al., 2018). The parental HM1 mESC line was derived from a male mouse. mESCs were grown and maintained on feeder cells in mESC Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing high glucose (Thermo Fisher Scientific, Gibco) and supplemented with 15% FBS (MilliporeSigma), 2 mM L-Glutamine (Gemini Bioproducts), 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1x MEM non-essential amino acids solution (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gemini Bioproducts), 1% EmbryoMax nucleosides (MilliporeSigma), 55  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, Gibco), and 1000 U/ml ESGRO LIF (MilliporeSigma). mESCs were differentiated into spinal neural progenitor cells using a previously described protocol (Sagner et al., 2018). mESCs were panned to clear the feeder cells, then plated on 6-well gelatin-coated CellBIND plates (Corning) at a density of 100,000 cells/well. Differentiation was conducted in N2B27 Medium: DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Gibco) and Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific, Gibco) (1:1 ratio) supplemented with 1x N-2 supplement (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1x B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-Glutamine, 55  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, Gibco), and 40  $\mu$ g/ml bovine serum albumin (MilliporeSigma). On Day 0 (the day the cells were plated) and Day 1, the N2B27 medium was supplemented with 10 ng/ml bFGF (R&D Systems). On Day 2, the N2B27 medium was supplemented with 10 ng/ml bFGF (R&D Systems) and 5  $\mu$ M CHIR 99021 (Axon Medchem). On Day 3, the N2B27 medium was supplemented with 100 nM Retinoic Acid (RA) (MilliporeSigma) and either no SHH, 5 nM (low SHH), or 25 nM (high SHH). The cells were cultured in RA and SHH for a total of 3 days, where the medium was changed every 24 h. On Day 6, the cells were washed with PBS and trypsinized with 0.25% Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco) for flow cytometry analysis. GLI-Venus and OLIG2-mKate fluorescence was measured on a FACScan Analyzer at the Stanford Shared FACS Facility. To detect GLI-Venus, a 488 nm (blue) laser was used with a 525/50 filter and B525 detector. To detect OLIG2-mKate, a 561 nm (yellow) laser was used with a 615/25 filter and Y615 detector.

### Generation of Knockout Cell Lines

Clonal *Mgrn1*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 lines were previously generated using a dual single guide (sgRNA) strategy and validated (Pusapati et al., 2018). Clonal double knockout *Mgrn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 lines were generated using the same dual sgRNA strategy to target *Rnf157* in *Mgrn1*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells. Briefly, sgRNAs targeting *Rnf157* were designed using the Broad Institute Genetic Perturbation Platform sgRNA Designer Tool (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgma-design>): Exon 6, 5'-CCACAGCGTGCCTACTACCAGA-3' and Exon 7, 5'-CAAAAGTGCCCAAGCAGCAG-3'. The sgRNAs were then cloned into pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene) (Ran et al., 2013) and pSpCas9(BB)-2A-mCherry (Pusapati et al., 2018) and transfected into

NIH/3T3 cells using X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche Molecular Systems). Five days post transfection, GFP and mCherry double positive single cells were sorted into a 96-well plate using a FACS Aria II at the Stanford Shared FACS Facility. To detect the GFP, a 488 nm (blue) laser was used with a 530/30 filter and B530 detector. To detect the mCherry, a 561 nm (yellow) laser was used with a 616/23 filter and G616 detector. Clonal lines were screened by PCR (Fwd 5'-GAGCAGAGAGGAGGTTAGCG-3' and Rev 5'-CAAGCTAGACCTCCCGAGG-3') to detect excision of the genomic DNA (317 bp) between the two sgRNA cut sites (Figure S3B).

Clonal *Mgrn1*<sup>-/-</sup> HM1 mouse embryonic stem cells (mESCs) with both GLI-Venus and OLIG2-mKate reporters were previously created using a dual sgRNA strategy and validated (Pusapati et al., 2018). Similar to what was done in NIH/3T3 cells, clonal double knockout *Mgrn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> mESC lines were generated using a dual sgRNA strategy to target *Rnf157* in *Mgrn1*<sup>-/-</sup> mESCs. Briefly, the same sgRNAs used to target *Rnf157* in NIH/3T3 cells were used in mESCs, but these sgRNAs were cloned into pSpCas9(BB)-2A-Puro (Addgene) (Ran et al., 2013). Prior to any manipulation, the mESCs were maintained for three passages under feeder free conditions in 2i Medium: DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Gibco) and Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific, Gibco) (1:1 ratio) supplemented with 1x N-2 supplement (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1x B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gemini Bioproducts), 2 mM L-Glutamine (Gemini Bioproducts), 55 μM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, Gibco), 40 μg/ml bovine serum albumin (MilliporeSigma), 5 μM CHIR 99021 (Axon Medchem), 1 μM PD 98059 (Axon Medchem), and 1000 U/ml ESGRO LIF (MilliporeSigma). Cells were trypsinized in 0.25% Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco) and rinsed once in PBS. Plasmids were nucleofected into the mESCs using the Lonza Cell nucleofector kit (VAPH-1001) and program A-023 on the Lonza Nucleofector 2b Device (Lonza Bioscience). After the cells were nucleofected, they were plated in 2i Medium onto a 10 cm gelatin-coated CellBIND plate. 24 h post nucleofection, selection was started and the medium was changed to 2i Medium containing 1.5 μg/ml puromycin (MilliporeSigma) for 48 h (or until all the cells on the non-nucleofected control plate died). Approximately 1 week after nucleofection, individual mESC colonies were manually picked, expanded, and screened by PCR using the same primers used to screen the *Mgrn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells (Figure S3B).

### Generation of Stable Cell Lines Expressing Transgenes

Clonal *Megf8*<sup>-/-</sup> and *Mgrn1*<sup>-/-</sup> Flp-In-3T3 cell lines were previously generated and validated (Pusapati et al., 2018). Stable addback cell lines expressing tagged MEGF8 and MEGF8<sup>ΔCtail</sup> (featured in Figures 3D and 3E), were generated using Flp recombinase-mediated DNA recombination (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) as previously described (Pusapati et al., 2014). Briefly, the pOG44 Flp-recombinase expression vector (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) and either pEF5/FRT/V5-DEST-MEGF8-1D4 or pEF5/FRT/V5-DEST-MEGF8<sup>ΔCtail</sup>-1D4 were transfected into *Megf8*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells using the X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche Molecular Systems). Approximately 48 h post transfection the cells were split to 25% confluence and 12-16 h post split the medium was changed to Complete Medium containing 200 μg/ml Hygromycin B (VWR Life Science). The medium was replenished every 3-4 days and antibiotic selection was conducted for about 2 weeks or until all the cells on the control plate were dead.

Stable addback cell lines expressing tagged MGRN1 (featured in Figures 3F and 3G) in *Mgrn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells or tagged MEGF8 in *Megf8*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells (featured in Figures 4D and 4E) were generated using the lentiviral expression system. Briefly, to generate lentivirus, four million HEK293T cells were seeded onto a 10 cm plate and 24 h later these cells were transfected with 1 μg pMD2.G (Addgene), 5 μg psPAX2 (Addgene), and 6 μg of the desired pLenti CMV Puro DEST construct using 36 μl of 1 mg/ml polyethylenimine (PEI) (Polysciences). Approximately 48 h post transfection, the lentivirus was harvested and filtered through a 0.45 μm filter. 2 ml of the filtered lentivirus solution was mixed with 2 ml of Complete Medium containing 16 μg/mL polybrene (MilliporeSigma). The diluted virus was then added to NIH/3T3 cells seeded on 6-well plates. Approximately 48 h post infection, cells were split and selected with puromycin (2 μg/ml) for 5-7 days or until all the cells on the control plate were dead.

### Established Mouse Lines

All mouse studies were conducted using animal study protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Stanford University, the University of Pittsburgh, and the McLaughlin Research Institute for Biomedical Sciences. *Mgrn1*<sup>md-nc/md-nc</sup> null mutant mice (referred to in the paper as *Mgrn1*<sup>m/m</sup>) (MGI:3704004) and *Megf8*<sup>C193R/C193R</sup> mice (referred to in the paper as *Megf8*<sup>m/m</sup>) (MGI:3722325) have been described previously (Gunn et al., 2013; He et al., 2003; Zhang et al., 2009). *Mgrn1*<sup>md-nc/+</sup> animals crossed to *Megf8*<sup>C193R/+</sup> heterozygotes had been outcrossed to FVB/N/Mri and intercrossed for up to 3 generations. Animals were genotyped for the *Mgrn1*<sup>md-nc</sup> mutation by allele-specific PCR using the following primers: wild-type (Fwd 5'-GCCTGCATGGATAGATGGAT-3' and Rev 5'-AGGAAGTTGCCACAGAACGCA-3') and mutant (Fwd 5'-CAAGAACAACCGAGACTAAGGA-3' and Rev 5'-GCCCAAGTCTAAACCTCT-3') (Gunn et al., 2019). Amplification was performed using GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation), the initial 10 cycles with an annealing temperature of 60 °C, followed by 30 cycles with an annealing temperature of 57 °C. Animals were genotyped for the *Megf8*<sup>C193R</sup> mutation by either (1) sequencing of a PCR product generated using primers Fwd 5'-ACGACCCATATCTCTGCCTT-3' and Rev 5'-GCCTCCAGACCCTCCAAG-3' or (2) using allele-specific PCR with primers Fwd 5'-CTCAGCTCTGCACCCCTAAC-3' and Rev (wild-type) 5'-TCCCAAGAATCCAGGTTTACA-3' or Rev (mutant) 5'-CCAAGAATCCAGGTTTACG-3'. Amplification was performed using GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation), 30 cycles with an annealing temperature of 62 °C.

### Generation and Validation of *Rnf157*<sup>-/-</sup> Mutant Mice

*Rnf157*<sup>-/-</sup> mutant mice (referred to in the paper as *Rnf157*<sup>m/m</sup> mice) were generated by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. The website Benchling ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)) was used to design sgRNAs that target exon 4 of *Rnf157*: (5'-CTACTACCAGGCCACTG-3'

and 5'-TGAACCTCGACATTGTAG-3') (Figure S3B). Synthetic sgRNAs and Cas9 2NLS nuclease were purchased from Synthego and electroporated into one cell mouse embryos following the Easy Electroporation of Zygotes (EEZy) protocol (Tröder et al., 2018). Briefly, fertilized eggs/1-cell embryos were collected from superovulated C57BL/6J females mated to C57BL/6J males into M2 or EmbryoMax Advanced KSOM medium (MilliporeSigma). Cas9/sgRNA ribonucleoproteins (RNPs) were assembled by combining 4  $\mu$ M Cas9 protein with 4  $\mu$ M of sgRNAs in 20  $\mu$ l Opti-MEM reduced serum medium (ThermoFisher Scientific, Gibco) and incubating 10 min at room temperature. For each electroporation, up to 60 embryos were washed through one drop of Opti-MEM and added to the 20  $\mu$ l of Cas9 RNP mix. The entire solution was immediately transferred to a 1 mm cuvette (Bio-Rad Laboratories) and placed in a Bio-Rad Gene Pulser XCell electroporator. Two square wave pulses were applied (30V, 3 ms pulse duration, 100 ms interval). Embryos were retrieved from the cuvette by flushing twice with 100  $\mu$ l of pre-warmed KSOM, transferred to a droplet of KSOM under oil and maintained in a 37 °C incubator with 15% CO<sub>2</sub> for 1-24 h. Embryos were subsequently moved through a droplet of M2 medium and transferred to the oviduct of 0.5 dpc (days post coitum) pseudopregnant ICR females. At weaning, a small piece of tail tissue was taken from each pup and the DNA was isolated and genotyped using the following primers to PCR amplify the region around the sgRNA target sequences: Fwd 5'-AACAAAGTCCCGATCCACTG-3' and Rev1 5'-CAAGCTAGACCTCCCCGAGG-3' or Rev2 5'-CCTTTCAGCATGGCTTCTC-3'. Sequence data was analyzed using Synthego's ICE tool (<https://ice.synthego.com/#/>) and animals carrying modified alleles predicted to result in a loss of RNF157 function were mated to C57BL/6J animals. *Rnf157<sup>em1Tmg</sup>* carries a single nucleotide deletion at each sgRNA target site: a cysteine at position 58 of exon 4 and another cysteine at position 120 (Figure S3B). Animals carrying this allele were genotyped by sequencing, as described above, or by allele-specific PCR using the following genotyping primers: Fwd (wild-type) 5'-AGGCAAAGCTAAGGTCCACTAC-3', Fwd (mutant) 5'-AGGCAAAGC TAAGGTCCACTAA-3', and Rev 5'-CCTGCTATGCCGTCTTACCT-3').

RT-PCR was used to verify loss of *Rnf157* expression in *Rnf157<sup>em1Tmg</sup>* mice. Briefly, brains (which express high levels of *Rnf157*) were collected from wild-type mice and *Rnf157<sup>em1Tmg</sup>* heterozygote and homozygote animals (Figure S3B). DNase-I treated RNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) and the Direct-zol RNA miniprep kit (Zymo Research). Equal amounts of RNA were used as template for cDNA synthesis using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen). PCR was performed using GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation) the following RT-PCR primers: Fwd 5'-ATCCCGTCCAATTCCGTGTA-3' and Rev 5'-GTACCAGGTGCGATGTAGGA-3'.

## METHOD DETAILS

### Constructs

*MEGF8* constructs: Mammalian Gene Collection (MGC) cDNA clone for human *MEGF8* (NM\_001410.3) was purchased from Transomic Technologies, Inc and used as a template for the generation of all *MEGF8* constructs. All *MEGF8* constructs were tagged with a C-terminal 1D4 and cloned into pEF5/FRT/V5-DEST (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) or pLenti CMV PURO DEST (Campeau et al., 2009) using Gateway recombination methods (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen). *MEGF8<sup>ΔN</sup>* (aa 2573-2778) was generated using restriction enzymes SrfI and SapI (New England Biolabs) to remove the N-terminal region (aa 26-2572 deleted). *MEGF8<sup>ΔCtail</sup>* (aa 1-2607) and *MEGF8<sup>ΔMASRPFA</sup>* (aa 2625-2631 deleted) were created using a combination of overlap extension PCR and restriction enzyme cloning methods. *MEGF8* chimeras were generated using Gibson assembly methods (New England Biolabs). *CD16<sup>ECD</sup>-CD7<sup>TM</sup>-MEGF8<sup>Ctail</sup>* (aa 2604-2778), *CD16<sup>ECD</sup>-MEGF8<sup>TM+Ctail</sup>* (aa 2573-2778), and *CD16<sup>ECD</sup>-MEGF8<sup>TM+CtailΔMASRPFA</sup>* (aa 2573-2778 with aa 2625-2631 deleted) were all cloned using *MEGF8<sup>ΔN</sup>* and *CD16<sup>ECD</sup>-CD7<sup>TM</sup>-mCherry-Nck-HA* (gift from Bruce Mayer (Rivera et al., 2009)). Lastly, for the bacterial production of *MEGF8* Ctail recombinant protein, the C-terminal end of the Ctail (aa 2738-2778) was cloned into the pGEX vector using restriction enzyme cloning methods.

### Mgrn1 Constructs

Mouse full-length *Mgrn1* (NM\_001252437.1) with a C-terminal 3xFLAG tag was synthesized as a gBlock (Integrated DNA Technologies) and used as a template for the generation of all *Mgrn1* constructs. Overlap extension PCR was used to generate *MGRN1<sup>Mut1</sup>* (C279A;C282A) and *MGRN1<sup>Mut2</sup>* (L307A;R308A). All constructs were cloned into pEF5/FRT/V5-DEST (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) or pLenti CMV PURO DEST (Campeau et al., 2009) using Gateway recombination cloning methods (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen).

### Smo Constructs

*mSmo*-EGFP was a gift from Philip Ingham (Zhao et al., 2016). For Figure S6C, *pCS2-mSmo* (Byrne et al., 2016), and a *mSmo* gBlock fragment with all 21 intracellular lysines mutated to arginines (Twist Bioscience) were used as templates to generate the following constructs: untagged full-length *Smo* (WT), intracellular lysine-less *Smo* (K0), C-tail lysine-less *Smo* (Ctail<sup>K0</sup>), intracellular loop 2 and 3 lysine-less *Smo* (ICL<sup>K0</sup>), intracellular loop 2 lysine-less *Smo* (ICL2<sup>K0</sup>), and intracellular loop 3 lysine-less *Smo* (ICL3<sup>K0</sup>). Constructs were generated using PCR amplification followed by Gibson assembly methods (New England Biolabs).

### Other Constructs

SSTR3-GFP was a gift from Kirk Mykityn (Berbari et al., 2008) and pRK5-HA-Ubiquitin-WT and pRK5-HA-Ubiquitin-K0 were purchased from Addgene (Lim et al., 2005).

### Reagents and Antibodies

Recombinant SHH was expressed in bacteria and purified in the lab as previously described (Bishop et al., 2009). Briefly, His-tagged SHH-N (C24II followed by human SHH aa 25-193) was expressed in *Escherichia coli* (BL21 strain; Rosetta2 (DE3)pLysS). Cells were

lysed in 10 mM Phosphate Buffer pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, and 1x SIGMAFAST protease inhibitor cocktail, followed by centrifugation at 20,000 xg for 30 min at 4°C. Clarified samples were incubated with Ni-NTA resin (Qiagen) for 1 h at 4°C. The resin was washed with 20 column volumes of wash buffer A (lysis buffer without protease inhibitors), followed by wash buffer B (wash buffer A+10 mM Imidazole) and bound proteins eluted with elution buffer (wash buffer A+250 mM Imidazole). Peak fractions were pooled, concentrated using a 5 kDa cut-off VIVASPIN 15R (Life Technologies), and loaded onto a Superdex 75 gel filtration column (Amersham Biosciences) equilibrated with column buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM DTT). The recombinant protein was >98% pure, as assessed from coomassie staining and stored at -80 °C. SAG was purchased from Thermo Fisher Scientific (Enzo Life Sciences). The selection antibiotic puromycin was purchased from MilliporeSigma and hygromycin B from VWR Life Science. The transfection reagent XtremeGENE 9 was purchased from Roche Molecular Systems and polybrene from MilliporeSigma. Bafilomycin A1 was purchased from Cayman Chemical. Vismodegib and Bortezomib were purchased from LC labs. The following primary antibodies were purchased from the following vendors: mouse anti-1D4 (The University of British Columbia, 1:5000); mouse anti-CD16 (clone 3G8, Santa Cruz Biotechnology, 1 µg per 1 million cells in 100ul); mouse anti-CD16 (clone DJ130c, Santa Cruz Biotechnology, 1 µg per 1 million cells in 100ul); mouse anti-FLAG (clone M2, MilliporeSigma, 1:2000); goat anti-GFP (Rockland Immunochemicals, 1:1000); rabbit anti-GFP (Novus Biologicals, 1:5000); mouse anti-GLI1 (clone L42B10, Cell Signaling, 1:1000); mouse anti-HA.11 (clone 16B12, BioLegend, 1:2000); mouse anti-HA (clone 2-2.2.14, Thermo Fisher Scientific, 1:2000); rabbit anti-p38 (Abcam, 1:2000); and rabbit anti-RNF156 (anti-MGRN1, Proteintech, 1:500); mouse anti- $\alpha$ -Tubulin (Clone DM1A, MilliporeSigma, 1:10000); mouse anti-acetylated-Tubulin (MilliporeSigma, 1:10000). The following primary antibodies were generated in the lab or received as a gift: Guinea pig anti-ARL13B (1:1000) (Dorn et al., 2012); rabbit anti-SMO (designed against an intracellular epitope, 1:2000) (Rohatgi et al., 2007); and rabbit anti-SMO-N (designed against an extracellular epitope, 1:2000) (Milenkovic et al., 2009). The anti-MEGF8 rabbit polyclonal antibody was produced against amino acids 2738-2778 of the mouse MEGF8 protein and affinity purified before use (Cocalico Biologicals, 1:2000). Hoechst 33342 and secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) or Alexa Fluor dyes were obtained from Jackson Laboratories and Thermo Fisher Scientific.

### Protein Sequence Analysis

Iterative sequence profile searches were performed using the PSI-BLAST program run against the NCBI non-redundant (NR) protein database (Altschul et al., 1997). Multiple sequence alignments were built using the Kalign2 software (Lassmann et al., 2009) and were later manually adjusted based on profile-profile, secondary structure information, and structural alignments. Similarity-based clustering for both classification and discarding of nearly identical sequences was performed using the BLASTClust program (Figure S4A). Maximum-likelihood (ML) tree topology was derived using an edge-linked partition model as implemented in the IQ-TREE software (Nguyen et al., 2015). ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) was used to automatically identify the best-fit substitution model and estimated “JTT+F+R9” as the suitable model for the given dataset. Branch supports were obtained using the ultrafast bootstrap (UFBoot) approximation method (1,000 replicates) (Hoang et al., 2018). To further assess the branch supports, Shimodaira-Hasegawa(SH)-JaLRT branch test was also computed as implemented in the IQ-TREE software (Figure 2B). The sequence logo was generated using the Logo software (Crooks et al., 2004) (Figure 3B). An alignment comprising a collection of all unique members of the MEGF8-Attractin family from the RefSeq database was utilized as input. The UniProt align tool was used to compare two protein sequences with the Clustal Omega program (Figure S3A) (UniProt Consortium, 2019). Sequence analysis of the MGRN1 RING domain was done using ConSurf (Ashkenazy et al., 2016). Briefly, 200 MGRN1 homologs were collected from UniProt using the homolog search algorithm HMMER and a color coded multiple sequence alignment was built using ClustalW (Figure S4B).

### Immunoprecipitation and Western Blotting

Whole-cell extracts from HEK293T and NIH/3T3 cells were prepared in Immunoprecipitation (IP) Lysis Buffer: 50 mM Tris at pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1x SIGMAFAST protease inhibitor cocktail (MilliporeSigma), and 1x PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche). Cells were lysed for 1 h on a shaker at 4 °C, supernatants were clarified by centrifugation, and 1D4 tagged MEGF8 was captured by a 1D4 antibody (The University of British Columbia) covalently conjugated to Protein A Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen). Immunoprecipitates were washed once with IP Wash Buffer A (50 mM Tris at pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, and 1 mM DTT), once with IP Wash Buffer B (50 mM Tris at pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, and 1 mM DTT), and finally with IP Wash Buffer C (50 mM Tris at pH 8.0, 0.1% NP-40, and 1 mM DTT). Proteins were eluted by resuspending samples in 1xNuPAGE LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) supplemented with 100 mM DTT, incubated at 37 °C for 30 min, and subjected to SDS-PAGE (Figures 3C, 3D, and S4C).

For all other immunoblotting data presented in the manuscript, whole cell extracts were prepared in RIPA lysis buffer: 50 mM Tris at pH 8.0, 150 mM NaCl, 2% NP-40, 0.25% Deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM TCEP, 10% glycerol, 1x SIGMAFAST protease inhibitor cocktail (MilliporeSigma), and 1x PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche). The resolved proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories) using a wet electroblotting system (Bio-Rad Laboratories) followed by immunoblotting.

### Flow Cytometry of Live Cells

As described above, a lentiviral expression system was used to stably express CD16/CD7/MEGF8 chimeras in *Megf8*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells (diagramed in Figure S6D). A modified live cell immunostaining protocol from Santa Cruz Biotechnology and Cell Signaling

Technology was used to label and analyze cell surface CD16/CD7/MEGF8 chimeras (Figure S6E). Briefly, four cell lines were analyzed: *Megf8*<sup>-/-</sup>, *Megf8*<sup>-/-</sup> with *CD16*<sup>ECD</sup>-*CD7*<sup>TM</sup>-*Megf8*<sup>Ctail</sup> adback, *Megf8*<sup>-/-</sup> with *CD16*<sup>ECD</sup>-*Megf8*<sup>TM+Ctail</sup> adback, and *Megf8*<sup>-/-</sup> with *CD16*<sup>ECD</sup>-*Megf8*<sup>TM+Ctail</sup>ΔMASRPFA adback. Prior to staining, the cells were serum starved for 24 h to allow for primary cilia growth. On staining day, the Complete Medium was removed, the cells were rinsed with PBS, and then dissociated in 0.2% EDTA (prepared in PBS) for approximately 5 min at 37 °C. Upon seeing the cells lift from the plate, the cells were pipetted up and down five times to create a single cell suspension, and Complete Medium (containing 10% FBS) was added to neutralize the EDTA. A small sample was taken to determine the total number of cells present. The cells were then resuspended in Flow Cytometry (FCM) Blocking Buffer (0.5% bovine serum albumin prepared in PBS) at a concentration of 10 million cells/ml. The cells were blocked for 10 min on ice, 1 million cells (100 ul of the cell suspension) were then transferred to a fresh tube, and 1 ug of an anti-CD16 antibody (Santa Cruz Biotechnology, clones 3G8 and DJ130c) was added directly to the cells. The cells were incubated with primary antibodies for 30 min on ice. Primary antibodies were rinsed off with 2 washes in FCM Blocking Buffer. The cells were then incubated for 30 min on ice in 1 ug of donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) diluted in FCM Blocking Buffer. The cells were washed 2 times in FCM Blocking Buffer then analyzed on a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences).

### SMO Internalization Assay

Cell surface internalization assay for SMO was performed as described previously for Figures 4A, S5A, and S5B (Pusapati et al., 2018). Briefly, wild-type, *Megf8*<sup>-/-</sup>, and *Mgrn1*<sup>-/-</sup>; *Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 cells were plated on 15 cm plates in Complete Medium (containing 10% FBS). Once the cells were confluent they were switched to Low Serum Medium (Complete Medium containing 0.5% FBS) for 24 h. On biotinylation day, the cells were removed from the 37 °C incubator and placed on an ice-chilled metal rack in a 4 °C cold room. The medium was removed and cells were quickly washed 3 times with ice-cold DPBS+ buffer (Dulbecco's PBS supplemented with 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5.6 mM dextrose, and 0.3 mM sodium pyruvate). Biotinylation of cell surface proteins using a non-cell permeable and thiol-cleavable probe was initiated by incubating cells with 0.4 mM EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) in DPBS+ buffer for 30 min. Unreacted Sulfo-NHS-SS-Biotin was quenched with 50 mM Tris (pH 7.4) for 10 min. Cells were then washed 3 times with a 1x Tris-buffered saline (25 mM Tris at pH 7.4, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl) and whole cell extracts were prepared in Biotinylation Lysis Buffer A (50 mM Tris at pH 8.0, 150 mM NaCl, 2% NP-40, 0.25% Deoxycholate, 1x SIGMAFAST protease inhibitor cocktail (MilliporeSigma), and 1x PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche)). Biotinylated proteins from clarified supernatants were captured on a streptavidin agarose resin (TriLink Biotechnologies), washed once with Biotinylation Lysis Buffer A, once with Biotinylation Wash Buffer A (Biotinylation Lysis Buffer A + 0.5% SDS), once with Biotinylation Wash Buffer B (Biotinylation Wash Buffer A + 150 mM NaCl), and finally once again with Biotinylation Wash Buffer A. Biotinylated proteins captured on streptavidin agarose resin were eluted in 1x NuPAGE-LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) containing 100 mM DTT at 37 °C for 1 h and assayed by immunoblotting for SMO (Figure S5B).

### Ubiquitination Assay

8 million HEK293T cells were plated onto a 15 cm plate. 24 h after plating, the cells were transfected using PEI. 6 ug of each construct was transfected into the cells (at a DNA:PEI ratio of 1:3). An empty plasmid construct was used as filler DNA to ensure that each plate was transfected with the same amount of DNA. 36 h post transfection, cells were pre-treated with 10 μM Bortezomib (a proteasome inhibitor) and 100 nM Bafilomycin A1 (a lysosome inhibitor) for 4 h to enrich for ubiquitinated proteins. Cells were washed twice with chilled 1x PBS and lysed in Ubiquitination Lysis Buffer A comprised of: 50 mM Tris at pH 8.0, 150 mM NaCl, 2% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 6M urea, 1 mM DTT, 10 μM Bortezomib, 100 nM Bafilomycin A1, 20 mM N-Ethylmaleimide (NEM, MilliporeSigma), and 1x SIGMAFAST protease inhibitor cocktail (MilliporeSigma). Clarified supernatants were diluted ten-fold with Ubiquitination Lysis Buffer B (Ubiquitination Lysis Buffer A prepared without urea) to adjust the urea concentration to 600 mM. For these assays, we assessed ubiquitination on both GFP tagged and untagged SMO. Ubiquitinated GFP tagged SMO (Figures 4B, 4C, S6A, and S6D) was captured using a GFP binding protein (GBP) covalently conjugated to carboxylic acid decorated Dynabeads (Dynabeads M-270 carboxylic acid, Thermo Fisher Scientific). Untagged SMO (Figure S6C) was captured using SMO antibody covalently conjugated to Protein A Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen). Immunoprecipitates were washed once with Ubiquitination Wash Buffer A (Ubiquitination Lysis Buffer B + 0.5% SDS), once with Ubiquitination Wash Buffer B (Ubiquitination Wash Buffer A + 1 M NaCl), and finally once again with Ubiquitination Wash Buffer A. Proteins bound to dynabeads were eluted in 2x NuPAGE-LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) containing 30 mM DTT at 37 °C for 30 min and assayed by immunoblotting for GFP or SMO antibodies for GFP tagged SMO and endogenous SMO, respectively.

### Immunofluorescence Staining of Cells and Tissue and Image Quantifications

Mouse embryos (e12.5) were harvested and fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in 1x PBS for 2 h at 4 °C and then rinsed thoroughly in chilled PBS. To cryopreserve the tissue, the embryos were transferred to 30% sucrose in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) and allowed to equilibrate overnight. To allow for better analysis of the tissue, the embryos were further dissected into five pieces: 2 hands (forelimbs), head, upper body, and lower body. All five pieces were then mounted and frozen into Tissue-Plus OCT (optimal cutting temperature) compound (Thermo Fisher Scientific) and 12-14 μm sections were collected. Prior to staining,

the tissue was blocked for 1 h in immunofluorescence (IF) Blocking Buffer: 1% normal donkey serum (NDS) and 0.1% Triton-X diluted in 1x PBS. In a humidified chamber, the sections were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C, rinsed 3 times in PBST (1x PBS + 0.1% Triton-X), incubated with secondary antibodies and Hoescht for 1 h at room temperature, rinsed 3 times in PBST, and then mounted in Prolong Gold antifade mountant (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen).

NIH/3T3 cells, pMEFs, and primary human fibroblasts were fixed in chilled 4% PFA in 1x PBS for 10 min and then rinsed with chilled PBS. Cells were incubated in IF Blocking Buffer for 30 min, primary antibodies for 1 h, and secondary antibodies for 30 min.

Fluorescent images were acquired on an inverted Leica SP8 confocal microscope equipped with a 63X oil immersion objective (NA 1.4). Z-stacks (~4 μm sections) were acquired with identical acquisition settings (laser power, gain, offset, frame and image format) within a given experiment. An 4-8X optical zoom was used for imaging cilia to depict representative images. For the quantification of SMO at cilia, images were opened in Fiji (Schindelin et al., 2012) with projections of the maximum fluorescent intensities of z-stacks. Ciliary masks were constructed based on ARL13B images and then applied to corresponding SMO images to measure the fluorescence intensity of SMO at cilia.

### Vismodegib Dosing via Oral Gavage

Vismodegib treatment was performed as described previously (Heyne et al., 2015). Briefly, *Megf8<sup>m/+</sup> x Megf8<sup>m/+</sup>* and *Mgrn1<sup>m/m</sup> x Mgrn1<sup>m/+</sup>* mouse crosses were set up and monitored daily. E0 was defined as midnight prior to visualization of the copulation plug. Female mice were weighed at ~e0.25 (the morning the plug was visualized) and ~e7.25. Only mice that gained 1.75 grams over 7 days were deemed “likely pregnant” and treated with either vehicle or Vismodegib. For Vismodegib treatment, a 3 mg/ml Vismodegib solution was prepared in 0.5% methyl cellulose (MilliporeSigma) with 0.2% Tween. Vismodegib (40 mg/kg) was administered via oral gavage every 12 h (~7am and 7pm) for a total of three days (e8.25, e8.75, e9.25, e9.75, e10.25, and e10.75). Embryos were harvested at e14.5, fixed in 4% (w/v) PFA in 1x PBS for 2-3 days, and analyzed for limb and patterning defects.

### Mouse Embryo Phenotyping Analysis

Mouse embryos (e13.5-14.5) were fixed in 4% (w/v) PFA in 1x PBS for 2-3 days. Necropsy was performed to determine visceral organ situs (i.e. lung and liver lobation, heart and stomach situs, and spleen and pancreas structure). The samples were embedded in paraffin and processed for episcopic confocal microscopy as previously described (Liu et al., 2013). Briefly, this entailed sectioning of the tissue block using a Leica sledge microtome with serial images of the block face captured with a Leica confocal microscope. The serial two-dimensional (2D) image stacks generated were three-dimensionally (3D) reconstructed using the Osirix software (Rosset et al., 2004) and digitally resliced in different orientations to aid in the analysis of intracardiac anatomy and the diagnosis of congenital heart defects (Liu et al., 2013).

### Variant Discovery and Validation

Genomic DNA was extracted from blood using the PAXgene Blood DNA kit (Qiagen). Patient genomic DNA was analyzed using whole-exome sequencing performed using the Agilent V5 Exome Capture kit followed by sequencing with the Illumina HiSeq2000 with 150 base paired-end reads with 100X coverage. Reads were aligned to the human reference genome (version hg19) using Burrows-Wheeler Alignment (BWA, version 0.5.9) (Li and Durbin, 2009) with default parameters, and further processed according to the recommendations of the Genome Analysis Toolkit (GATK) Best Practices (Van de Auwera et al., 2013; DePristo et al., 2011). GATK HaplotypeCaller was used for single-nucleotide polymorphism (SNP) and insertion/deletion mutation (INDEL) discovery and variants that passed the GATK Variant Score Quality Recalibration (VQSR) and standard GATK filters with minor allele frequency <5% based on the Genome Aggregation Database (GnomAD). Only variants with Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) PHRED (Kircher et al., 2014) score of at least 10 were considered, and PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010) and SIFT (Kumar et al., 2009) were used to assess variant pathogenicity. MEGF8/MGRN1/RNF157 variants recovered were validated by Sanger sequencing and heritable transmission was determined by further Sanger sequencing of genomic DNA from the parents.

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All data analysis and graphs were generated using GraphPad Prism 8. Violin plots were created using the “Violin Plot (truncated)” appearance function. In Prism 8, the frequency distribution curves of the violin plots are calculated using kernel density estimation. By using the “truncated” violin plot function, the frequency distributions shown are confined within the minimum to maximum values of the data set. On each violin plot, the median (central bold line) and quartiles (adjacent thin lines, representing the first and third quartiles) are labeled.

In Prism 8, the statistical significance between two groups was determined using either Mann-Whitney or an unpaired t-test and the significance between three or more groups was determined using either one-way ANOVA or the Kruskal-Wallis test. For each figure, p-values were calculated using Prism 8 and reported in the figure legend. P-values were reported using the following key: not-significant (ns) *p-value* > 0.05, \**p-value* ≤ 0.05, \*\**p-value* ≤ 0.01, \*\*\**p-value* ≤ 0.001, and \*\*\*\**p-value* ≤ 0.0001. Additional figure details regarding the *n*-value and statistical test applied were reported in the individual figure legends.

All cell biological and biochemical experiments were performed two to three independent times, with similar results. To validate newly generated *Mgrn1*<sup>-/-</sup>;*Rnf157*<sup>-/-</sup> NIH/3T3 and neural progenitor cell lines, 3 independent clonal cell lines were analyzed. Analysis of one clonal NIH/3T3 cell line was featured in the main figures (Figures 2A and 2C) and data from the additional cell lines was presented in the supplementary figures (Figures S3C, S3D, and S3E). Similarly, 2–3 primary mouse embryonic fibroblast (pMEF) cell lines were analyzed from both *Megf8*<sup>m/m</sup> and *Mgrn1*<sup>m/m</sup> embryos, where each pMEF cell line was generated from a single embryo (Figures 1A, 1B, S1B, and S1C).

## **CHAPITRE IV : RESULTAT 2**

## I. Présentation de l'article 2

Ce deuxième travail s'est axé sur les **mécanismes moléculaires à l'origine de la rupture très précoce de la symétrie G-D** au sein du NE, c'est-à-dire au sein de la structure organisatrice G-D d'un certain nombre de vertébrés. Ce projet original s'est concentré sur les gènes perdus au cours de l'évolution et présents uniquement chez les espèces avec **structure organisatrice G-D ciliée** (versus les espèces avec structure organisatrice G-D non ciliée employant des mécanismes alternatifs d'établissement de la latéralisation G-D). Cette approche phylogénétique a permis d'identifier le **gène *TOUT-DE-TRAVERS (TDT)*** qui code pour une protéine extracellulaire très conservée au sein des vertébrés ayant gardé une structure organisatrice avec cils (poissons, amphibiens, souris, Hommes). Ce gène est par contre absent chez les oiseaux et les reptiles, et dégradé chez les cetartiodactyles (pseudogène). Il code pour une **métalloprotéinase zinc-dépendante** appartenant à la famille des Leishmanolysines du groupe des **Metzincins**. L'inactivation du gène par technique d'édition de gène CRISPR-Cas 9 chez le poisson-zèbre entraîne une randomisation de la boucle cardiaque et d'autres anomalies viscérales de la latéralité G-D (*situs ambigu*). Des mutations bi-alléliques ont été identifiées chez 21 patients présentant des syndromes d'hétérotaxie avec MCC sans aucun signe associé de ciliopathie.

Ce travail a permis d'illustrer le rôle des **métalloprotéases matricielles** dans la mise en place de l'asymétrie G-D au cours du développement embryonnaire. Il fait l'objet d'un **manuscrit en cours de soumission**. Il est dans la continuité d'un autre travail auquel j'ai participé et qui avait permis d'identifier le gène *MMP21* (Matrix Metallopeptidase 21) dans des cas d'hétérotaxie non syndromique et de malformations cardiaques par défaut de latéralité avec une très forte pénétrance. Ces résultats à l'échelle humaine et animale avaient fait l'objet d'une publication en 2016 et d'une partie du travail de thèse du Dr Anne Guimier (Guimier et al. 2015). Ils ne sont pas réimprimés dans ce manuscrit.

Ces métalloprotéases agissent en aval du flux nodal qu'elles ne perturbent pas même en cas de mutations bi-alléliques. Elles jouent par contre un rôle important dans l'établissement de la latéralité G-D et précèdent la cascade Nodal.

## **II. Article 2**





## **CHAPITRE VI : RESULTATS-AUTRES ARTICLES**

## I. Présentation des autres articles

Au cours de cette thèse, j'ai également activement participé à **deux autres travaux** s'intéressant à des malformations cardiaques plus fréquentes et plus simples : la communication inter-auriculaire (CIA) et la bicuspidie aortique. Cette dernière concerne 1% de la population générale et est le plus souvent asymptomatique jusqu'à l'âge adulte.

En réalisant le **séquençage génomique** et l'analyse de liaison d'une vaste famille associant plusieurs cas de CIA à travers différentes générations, nous avons mis en évidence la **co-ségrégation de mutations** dans deux gènes codant pour des protéines de liaison à l'actine (*actin binding protein* en anglais) que sont *TPM1* et *TLN2*. Lorsqu'elle est isolée, la mutation de *TPM1* est létale précocement pendant la vie fœtale du fait d'une activation majeure de l'apoptose avec réduction de la prolifération cellulaire au niveau des cardiomyocytes. Lorsqu'elle est associée à une mutation de *TLN2*, dite « **protectrice** », le phénotype cardiaque est alors plus modéré et responsable uniquement d'une CIA. Cette hypothèse a ensuite été vérifiée grâce à des *Xenopus* et des souris remaniés par technique de **CRISPR-Cas 9** avec l'une et/ou l'autre des mutations.

Le dernier travail réalisé est une étude de cohorte incluant 1519 patients avec **obstacle à l'éjection du cœur gauche** (bicuspidie aortique, coarctation aortique, hypoplasie du ventricule gauche) chez qui nous avons mis en évidence un significatif enrichissement de la délétion **16.7/13.3 kb du cluster *PCDHA*** versus une population contrôle sans malformation. Les patients homozygotes pour cette délétion ont un risque particulièrement élevé de coarctation et d'hypoplasie du ventricule gauche témoignant d'un effet de dosage génique pour la pénétrance phénotypique. D'autres **variants et des modificateurs épigénétiques** doivent participer à la modulation du phénotype clinique allant de la bicuspidie aortique très fréquente dans la population générale à l'hypoplasie du ventricule gauche extrêmement rare et grave.

Ces deux projets font l'objet de manuscrits actuellement en cours de soumission.

## II. Autres articles



## **CHAPITRE VII : DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse concernant les malformations cardiaques impliquées dans les anomalies de latéralisation G-D contribue à enrichir les connaissances sur le **développement cardiaque** précoce ainsi que sur les différentes **voies de signalisation** mises en jeu. La stratégie de séquençage exomique parmi des cas familiaux ou au sein de vastes cohortes de patients a permis d'identifier de nouveaux gènes dont les mécanismes moléculaires ont ensuite été confirmés par des études fonctionnelles à l'échelle cellulaire et animale. L'étude des causes génétiques des MCC chez l'Homme peut être rendue difficile par leur **pénétrance incomplète** et leur **expressivité variable**. Les modèles animaux et notamment murins sont alors d'une grande aide dans la mesure où ils partagent la même anatomie cardiaque et où le génome de la souris est maintenant bien caractérisé et proche de celui du génome humain. Toutefois, certains modèles animaux ne survivent pas in utero à la gravité de leur malformation cardiaque. Cela a aussi été prouvé chez l'Homme dont les fœtus avec hétérotaxie et MCC présentent un taux très élevé de mort fœtal in utero (30-60%) (Taketazu et al. 2006). Il existe donc un biais dans les études de population avec une sous-représentation significative des phénotypes les plus sévères à la naissance.

En utilisant les techniques moléculaires les plus récentes de **séquençage massif en parallèle** et des expérimentations d'édition de gène par **CRISPR/Cas 9** à l'échelle cellulaire et chez des poissons zèbre, *Xenopus* et souris, nous avons ainsi identifié des variants rares et également des variants beaucoup plus fréquents impliqués dans le développement de MCC.

L'identification de **protéines modulatrices** (MEGF8 et MGRN1) de la voie de signalisation Shh confirme le rôle de cette cascade moléculaire dans la morphogénèse du cœur en fonction de **gradients temporels et spatiaux**. Ces derniers influencent le devenir des cellules cibles selon la durée, le lieu et l'amplitude résiduelle du signal. L'implication de la voie Shh dans les anomalies de latéralisation G-D (perte ou augmentation du signal) a déjà été suggérée par le passé avec notamment une impossibilité de réaliser la loop cardiaque pour les souris avec mutation de *Smo* (X. M. Zhang, Ramalho-Santos, and McMahon 2001) et une boucle inversée dans 30 à 40% des cas lorsque le régulateur négatif *Sufu* est absent (Cooper et al. 2005). Nos travaux sont **une des premières démonstrations des interactions oligogéniques** qui peuvent intervenir dans la modulation du phénotype clinique des MCC (Gifford et al. 2019). Les souris hétérozygotes *Megf8<sup>m/+</sup>* et *Mgrn1<sup>m/+</sup>* sont normales tandis que les doubles hétérozygotes *Megf8<sup>m/+</sup> ; Mgrn1<sup>m/+</sup>* (haploinsuffisance synthétique) présentent des anomalies de latéralité et des MCC. En modulant l'intensité du signal Shh dans les cellules, le complexe protéique joue un rôle important dans la morphogénèse viscérale et notamment cardiaque. Il existe également un effet de **dosage génique**. Plus le nombre de gènes avec allèles

muté augmente, plus le signal Shh est réprimé (moins de complexes protéiques transmembranaires fonctionnelles disponibles). Enfin, la voie de signalisation Shh contribue aussi au développement du second champ cardiaque et participe à l'élaboration de la voie d'éjection. Ainsi, les cardiopathies observées chez les souris mutantes et chez les patients peuvent être expliquées à la fois par des anomalies précoces de la **mise en place de la latéralisation G-D** mais également par des anomalies plus tardives au moment du **wedging** et du développement de la voie d'éjection. Il est probable que d'autres facteurs génétiques et environnementaux participent encore à la modulation du phénotype clinique définitif.

Lors de ces travaux, nous avons mis en évidence le rôle de **deux métalloprotéases** matricielles impliquées dans la signalisation G-D au cours du développement embryonnaire (TDT et MMP21) à un stade très précoce et avec une action limitée dans le temps et dans l'espace. La perte de fonction de chacun de ces gènes est responsable de MCC. Les substrats et les potentiels partenaires de ces protéines ne sont pas encore identifiés. Leur mode d'action et leur régulation ne sont pas non plus encore connues. Nous suspectons que ces gènes qui suivent le même **patron de perte génomique** au cours de l'évolution sans être localisés sur les mêmes chromosomes, fassent partie d'un **opéron fonctionnel**. Des modèles animaux de co-invalidation de plusieurs de ces gènes pourraient faire l'objet de travaux ultérieurs pour mieux comprendre leur interrelation ainsi que la voie de signalisation qu'ils mettent en jeu pour participer au flux nodal extracellulaire déterminant pour l'établissement de l'asymétrie G-D. Il est encore difficile de savoir si la perte de cet opéron chez certains vertébrés est la cause ou la conséquence de la disparition du **caractère cilié** de l'organisateur G-D.

Les gènes étudiés dans cette thèse et impliqués dans les anomalies de latéralisation G-D n'ont étonnamment aucun impact sur la ciliogénèse contrairement à la plupart des gènes rapportés dans les hétérotaxies (cf. Introduction).

Parallèlement au modèle Mendélien de maladies monogéniques, ces travaux ont à plusieurs reprises mis en évidence **l'interaction oligogénique** qu'il existe dans la détermination du phénotype cardiaque des individus. Cela devait contribuer à expliquer l'origine des MCC jusqu'alors inconnue chez certains patients. Le rôle de **mutations protectrices** est également abordé. Celles-ci permettent de nuancer des mutations très délétères dans le développement embryonnaire, parfois même létales. Elles sont également une alternative proposée à la notion de **pénétrance incomplète** de nombreuses CC familiales.

Au-delà des perspectives fondamentales apportées par ces travaux, ces recherches ont également un impact clinique. Le **conseil génétique** est limité dans le domaine des cardiopathies congénitales excepté lorsque la mutation responsable est connue. Blue a montré que les consultations de conseil génétique dans le cadre des MCC permettaient d'améliorer la compréhension des patients et de leur famille sur la cardiopathie (Blue et al. 2015). Les nouveaux gènes identifiés dans ce projet seront inclus dans les panels de gènes diagnostiques explorés lors des **bilans familiaux** de cardiopathies congénitales, permettant d'identifier les porteurs de mutations et d'adapter pour eux le suivi clinique. Ils permettront également de mieux comprendre l'origine des anomalies précoces isolées de la cardiogénèse et d'offrir éventuellement la possibilité d'un diagnostic prénatal ou pré-implantatoire. Lorsqu'une anomalie génétique est identifiée, elle permet d'expliquer le mécanisme moléculaire impliqué dans la MCC du patient mais aussi d'envisager **son impact plus global sur le devenir cardiaque et extracardiaque** du malade. En effet, elle peut induire d'autres perturbations biologiques pendant la grossesse puis pendant toute la vie (dysfonction myocardique, trouble du rythme cardiaque, anomalie de la croissance, déficit cognitif, développement tumoral,...) (Russell et al. 2018). D'autre part, certaines MCC dont la TGV ont un meilleur pronostic lorsqu'elles sont diagnostiquées en période anténatale. La détection de facteurs prédisposant chez les parents permettrait d'adapter la surveillance échographique foetale avec une attention toute particulière portée à la recherche de CC.

D'autres **mécanismes génétiques restent donc encore à découvrir** (mutations somatiques, modification de la chromatine, variations des régions non codantes avec régions régulatrices et microARN,...) de même que des modificateurs épigénétiques dont certaines expositions environnementales. Cela laisse présager bien d'autres travaux de recherche et thèses à venir...

## **CHAPITRE VIII : BIBLIOGRAPHIE**

- Afzelius, B. A. 1976. "A Human Syndrome Caused by Immotile Cilia." *Science (New York, N.Y.)* 193 (4250): 317–19. <https://doi.org/10.1126/science.1084576>.
- Anderson, R. H. 1999. "Isomerism of the Atrial Appendages." *The American Journal of Cardiology* 83 (5): 818–19.
- Atkinson, David E., and Stacey Drant. 1998. "Diagnosis of Heterotaxy Syndrome by Fetal Echocardiography." *The American Journal of Cardiology* 82 (9): 1147–49. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(98\)00574-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(98)00574-8).
- Aw, Sherry, Joseph C. Koster, Wade Pearson, Colin G. Nichols, Nian-Qing Shi, Katia Carneiro, and Michael Levin. 2010. "The ATP-Sensitive K(+)-Channel (K(ATP)) Controls Early Left-Right Patterning in *Xenopus* and Chick Embryos." *Developmental Biology* 346 (1): 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.07.011>.
- Bamford, R. N., E. Roessler, R. D. Burdine, U. Saplakoglu, J. dela Cruz, M. Splitt, J. A. Goodship, et al. 2000. "Loss-of-Function Mutations in the EGF-CFC Gene *CFC1* Are Associated with Human Left-Right Laterality Defects." *Nature Genetics* 26 (3): 365–69. <https://doi.org/10.1038/81695>.
- Barnes, Ralston, and Brian Black. 2016. "Nodal Signaling and Congenital Heart Defects." In , 183–92. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54628-3\\_24](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54628-3_24).
- Belmont, John W., Bhagyalaxmi Mohapatra, Jeffrey A. Towbin, and Stephanie M. Ware. 2004. "Molecular Genetics of Heterotaxy Syndromes." *Current Opinion in Cardiology* 19 (3): 216–20.
- Blue, Gillian M., Nadine A. Kasparian, Gary F. Sholler, Edwin P. Kirk, and David S. Winlaw. 2015. "Genetic Counselling in Parents of Children with Congenital Heart Disease Significantly Improves Knowledge about Causation and Enhances Psychosocial Functioning." *International Journal of Cardiology* 178 (January): 124–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.10.119>.
- Blue, Gillian M., Edwin P. Kirk, Eleni Giannoulatou, Sally L. Dunwoodie, Joshua W. K. Ho, Desiree C. K. Hilton, Susan M. White, Gary F. Sholler, Richard P. Harvey, and David S. Winlaw. 2014. "Targeted Next-Generation Sequencing Identifies Pathogenic Variants in Familial Congenital Heart Disease." *Journal of the American College of Cardiology* 64 (23): 2498–2506. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.09.048>.
- Blue, Gillian M., Edwin P. Kirk, Eleni Giannoulatou, Gary F. Sholler, Sally L. Dunwoodie, Richard P. Harvey, and David S. Winlaw. 2017. "Advances in the Genetics of Congenital Heart Disease: A Clinician's Guide." *Journal of the American College of Cardiology* 69 (7): 859–70. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.060>.

- Bouvagnet, Patrice, and Anne Moreau de Bellaing. 2016. "Human Genetics of D-Transposition of the Great Arteries." *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart*, 439–47. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1883-2\\_35](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1883-2_35).
- Brodwall, Kristoffer, Gottfried Greve, Elisabeth Leirgul, Grethe S. Tell, Stein E. Vollset, and Nina Øyen. 2017. "Recurrence of Congenital Heart Defects among Siblings—a Nationwide Study." *American Journal of Medical Genetics. Part A* 173 (6): 1575–85. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38237>.
- Buckingham, Margaret, Sigolène Meilhac, and Stéphane Zaffran. 2005. "Building the Mammalian Heart from Two Sources of Myocardial Cells." *Nature Reviews Genetics* 6 (11): 826–35. <https://doi.org/10.1038/nrg1710>.
- "Cardiovascular Manifestations of Heterotaxy and Related Situs Abnormalities Assessed with CT Angiography." 2013. *Journal of Cardiovascular Computed Tomography* 7 (6): 408–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcct.2013.11.008>.
- Casey, B. 1998. "Two Rights Make a Wrong: Human Left-Right Malformations." *Human Molecular Genetics* 7 (10): 1565–71. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.10.1565>.
- Clark, E. B. 1996. "Pathogenetic Mechanisms of Congenital Cardiovascular Malformations Revisited." *Seminars in Perinatology* 20 (6): 465–72. [https://doi.org/10.1016/s0146-0005\(96\)80062-0](https://doi.org/10.1016/s0146-0005(96)80062-0).
- Cooper, Ayanna F., Kuan Ping Yu, Martina Brueckner, Lisa L. Brailey, Linda Johnson, James M. McGrath, and Allen E. Bale. 2005. "Cardiac and CNS Defects in a Mouse with Targeted Disruption of Suppressor of Fused." *Development (Cambridge, England)* 132 (19): 4407–17. <https://doi.org/10.1242/dev.02021>.
- Desgrange, Audrey, Jean-François Le Garrec, and Sigolène M. Meilhac. 2018. "Left-Right Asymmetry in Heart Development and Disease: Forming the Right Loop." *Development* 145 (22). <https://doi.org/10.1242/dev.162776>.
- Duong, Son Q., Justin Godown, Jonathan H. Soslow, Cary Thurm, Matt Hall, Sandeep Sainathan, Victor O. Morell, Debra A. Dodd, and Brian Feingold. 2019. "Increased Mortality, Morbidities, and Costs after Heart Transplantation in Heterotaxy Syndrome and Other Complex Situs Arrangements." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 157 (2): 730-740.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.11.022>.
- Fakhro, Khalid A., Murim Choi, Stephanie M. Ware, John W. Belmont, Jeffrey A. Towbin, Richard P. Lifton, Mustafa K. Khokha, and Martina Brueckner. 2011. "Rare Copy Number Variations in Congenital Heart Disease Patients Identify Unique Genes in Left-

- Right Patterning.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (7): 2915–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019645108>.
- Fesslova, Vlasta, Jelena Brankovic, Faustina Lalatta, Laura Villa, Valerio Meli, Luciane Piazza, and Cristian Ricci. 2011. “Recurrence of Congenital Heart Disease in Cases with Familial Risk Screened Prenatally by Echocardiography.” *Journal of Pregnancy* 2011: 368067. <https://doi.org/10.1155/2011/368067>.
- Garrod, Andrea S., Maliha Zahid, Xin Tian, Richard J. Francis, Omar Khalifa, William Devine, George C. Gabriel, Linda Leatherbury, and Cecilia W. Lo. 2014. “Airway Ciliary Dysfunction and Sinopulmonary Symptoms in Patients with Congenital Heart Disease.” *Annals of the American Thoracic Society* 11 (9): 1426–32. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201405-222OC>.
- Gifford, Casey A., Sanjeev S. Ranade, Ryan Samarakoon, Hazel T. Salunga, T. Yvanka de Soysa, Yu Huang, Ping Zhou, et al. 2019. “Oligogenic Inheritance of a Human Heart Disease Involving a Genetic Modifier.” *Science (New York, N.Y.)* 364 (6443): 865–70. <https://doi.org/10.1126/science.aat5056>.
- Gittenberger, Edmund. 1988. “SYMPATRIC SPECIATION IN SNAILS; A LARGELY NEGLECTED MODEL.” *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 42 (4): 826–28. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1988.tb02502.x>.
- Gros, Jerome, Kerstin Feistel, Christoph Viebahn, Martin Blum, and Clifford J. Tabin. 2009. “Cell Movements at Hensen’s Node Establish Left/Right Asymmetric Gene Expression in the Chick.” *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 941–44. <https://doi.org/10.1126/science.1172478>.
- Guimier, Anne, George C. Gabriel, Fanny Bajolle, Michael Tsang, Hui Liu, Aaron Noll, Molly Schwartz, et al. 2015. “MMP21 Is Mutated in Human Heterotaxy and Is Required for Normal Left-Right Asymmetry in Vertebrates.” *Nature Genetics* 47 (11): 1260–63. <https://doi.org/10.1038/ng.3376>.
- Hachisuga, Masahiro, Shinya Oki, Keiko Kitajima, Satomi Ikuta, Tomoyuki Sumi, Kiyoko Kato, Norio Wake, and Chikara Meno. 2015. “Hyperglycemia Impairs Left-Right Axis Formation and Thereby Disturbs Heart Morphogenesis in Mouse Embryos.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (38): E5300–5307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504529112>.
- Hamada, Hiroshi. 2016. “Roles of Motile and Immotile Cilia in Left-Right Symmetry Breaking.” In *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology*, edited by Toshio Nakanishi, Roger

- R. Markwald, H. Scott Baldwin, Bradley B. Keller, Deepak Srivastava, and Hiroyuki Yamagishi. Tokyo: Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500261/>.
- Hamada, Hiroshi, Chikara Meno, Daisuke Watanabe, and Yukio Saijoh. 2002. "Establishment of Vertebrate Left-Right Asymmetry." *Nature Reviews. Genetics* 3 (2): 103–13. <https://doi.org/10.1038/nrg732>.
- Harden, Brandon, Xin Tian, Rachel Giese, Nader Nakhleh, Safina Kureshi, Richard Francis, Sridhar Hanumanthaiah, et al. 2014. "Increased Postoperative Respiratory Complications in Heterotaxy Congenital Heart Disease Patients with Respiratory Ciliary Dysfunction." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 147 (4): 1291–1298.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.06.018>.
- Hernández-Díaz, S., M. M. Werler, A. M. Walker, and A. A. Mitchell. 2000. "Folic Acid Antagonists during Pregnancy and the Risk of Birth Defects." *The New England Journal of Medicine* 343 (22): 1608–14. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011303432204>.
- Houyel, L. 2009. "Embryologie du cœur normal." *EMC - Cardiologie* 4 (2): 1–26. [https://doi.org/10.1016/S1166-4568\(09\)47030-X](https://doi.org/10.1016/S1166-4568(09)47030-X).
- Jacobs, Jeffrey P., Robert H. Anderson, Paul M. Weinberg, Henry L. Walters, Christo I. Tchervenkov, Danny Del Duca, Rodney C. G. Franklin, et al. 2007. "The Nomenclature, Definition and Classification of Cardiac Structures in the Setting of Heterotaxy." *Cardiology in the Young* 17 Suppl 2 (September): 1–28. <https://doi.org/10.1017/S1047951107001138>.
- Jiang, Xiaobing, Bibha Choudhary, Esther Merki, Kenneth R. Chien, Robert E. Maxson, and Henry M. Sucov. 2002. "Normal Fate and Altered Function of the Cardiac Neural Crest Cell Lineage in Retinoic Acid Receptor Mutant Embryos." *Mechanisms of Development* 117 (1–2): 115–22. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00206-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00206-x).
- Kaasinen, Eevi, Kristiina Aittomäki, Marianne Eronen, Pia Vahteristo, Auli Karhu, Jukka-Pekka Mecklin, Eero Kajantie, Lauri A. Aaltonen, and Rainer Lehtonen. 2010. "Recessively Inherited Right Atrial Isomerism Caused by Mutations in Growth/Differentiation Factor 1 (GDF1)." *Human Molecular Genetics* 19 (14): 2747–53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq164>.
- Kapusta, L., M. L. Haagmans, E. A. Steegers, M. H. Cuyper, H. J. Blom, and T. K. Eskes. 1999. "Congenital Heart Defects and Maternal Derangement of Homocysteine Metabolism." *The Journal of Pediatrics* 135 (6): 773–74. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(99\)70102-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(99)70102-2).

- Kelly, R. G., N. A. Brown, and M. E. Buckingham. 2001. "The Arterial Pole of the Mouse Heart Forms from Fgf10-Expressing Cells in Pharyngeal Mesoderm." *Developmental Cell* 1 (3): 435–40. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00040-5](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00040-5).
- Kosaki, K., M. T. Bassi, R. Kosaki, M. Lewin, J. Belmont, G. Schauer, and B. Casey. 1999. "Characterization and Mutation Analysis of Human LEFTY A and LEFTY B, Homologues of Murine Genes Implicated in Left-Right Axis Development." *American Journal of Human Genetics* 64 (3): 712–21. <https://doi.org/10.1086/302289>.
- Kosaki, R., M. Gebbia, K. Kosaki, M. Lewin, P. Bowers, J. A. Towbin, and B. Casey. 1999. "Left-Right Axis Malformations Associated with Mutations in ACVR2B, the Gene for Human Activin Receptor Type IIB." *American Journal of Medical Genetics* 82 (1): 70–76.
- Li, You, Nikolai T. Klena, George C. Gabriel, Xiaoqin Liu, Andrew J. Kim, Kristi Lemke, Yu Chen, et al. 2015. "Global Genetic Analysis in Mice Unveils Central Role for Cilia in Congenital Heart Disease." *Nature* 521 (7553): 520–24. <https://doi.org/10.1038/nature14269>.
- Lin, Angela E., Sergey Krikov, Tiffany Riehle-Colarusso, Jaime L. Frías, John Belmont, Marlene Anderka, Tal Geva, Kelly D. Getz, and Lorenzo D. Botto. 2014. "Laterality Defects in the National Birth Defects Prevention Study (1998–2007): Birth Prevalence and Descriptive Epidemiology." *American Journal of Medical Genetics. Part A* 0 (10): 2581–91. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36695>.
- Liu, Chengyu, Wei Liu, Jennifer Palie, Mei Fang Lu, Nigel A. Brown, and James F. Martin. 2002. "Pitx2c Patterns Anterior Myocardium and Aortic Arch Vessels and Is Required for Local Cell Movement into Atrioventricular Cushions." *Development (Cambridge, England)* 129 (21): 5081–91.
- Liu, Xiaoqin, Richard Francis, Andrew J. Kim, Ricardo Ramirez, Guozhen Chen, Ramiah Subramanian, Shane Anderton, et al. 2014. "Interrogating Congenital Heart Defects with Noninvasive Fetal Echocardiography in a Mouse Forward Genetic Screen." *Circulation. Cardiovascular Imaging* 7 (1): 31–42. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.113.000451>.
- Luna-Zurita, Luis, Christian U. Stirnimann, Sebastian Glatt, Bogac L. Kaynak, Sean Thomas, Florence Baudin, Md Abul Hassan Samee, et al. 2016. "Complex Interdependence Regulates Heterotypic Transcription Factor Distribution and Coordinates Cardiogenesis." *Cell* 164 (5): 999–1014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.004>.

- Marian, Ali J. 2012. "Molecular Genetic Studies of Complex Phenotypes." *Translational Research* 159 (2): 64–79. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.08.001>.
- McElhinney, Doff B., Elizabeth Geiger, Joshua Blinder, D. Woodrow Benson, and Elizabeth Goldmuntz. 2003. "NKX2.5 mutations in Patients with Congenital Heart Disease." *Journal of the American College of Cardiology* 42 (9): 1650–55. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.05.004>.
- McGrath, James, Stefan Somlo, Svetlana Makova, Xin Tian, and Martina Brueckner. 2003. "Two Populations of Node Monocilia Initiate Left-Right Asymmetry in the Mouse." *Cell* 114 (1): 61–73. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00511-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00511-7).
- Meno, C., A. Shimono, Y. Saijoh, K. Yashiro, K. Mochida, S. Ohishi, S. Noji, H. Kondoh, and H. Hamada. 1998. "Lefty-1 Is Required for Left-Right Determination as a Regulator of Lefty-2 and Nodal." *Cell* 94 (3): 287–97. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81472-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81472-5).
- Meno, Chikara, Jun Takeuchi, Rui Sakuma, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Sachiko Ohishi, Yukio Saijoh, Jun-ichi Miyazaki, Peter ten Dijke, Toshihiko Ogura, and Hiroshi Hamada. 2001. "Diffusion of Nodal Signaling Activity in the Absence of the Feedback Inhibitor Lefty2." *Developmental Cell* 1 (1): 127–38. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00006-5).
- Mohapatra, Bhagyalaxmi, Brett Casey, Hua Li, Trang Ho-Dawson, Liana Smith, Susan D. Fernbach, Laura Molinari, et al. 2009. "Identification and Functional Characterization of NODAL Rare Variants in Heterotaxy and Isolated Cardiovascular Malformations." *Human Molecular Genetics* 18 (5): 861–71. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn411>.
- Nakamura, Tetsuya, and Hiroshi Hamada. 2012. "Left-Right Patterning: Conserved and Divergent Mechanisms." *Development (Cambridge, England)* 139 (18): 3257–62. <https://doi.org/10.1242/dev.061606>.
- Nakamura, Tetsuya, Daisuke Saito, Aiko Kawasumi, Kyosuke Shinohara, Yasuko Asai, Katsuyoshi Takaoka, Fenglan Dong, et al. 2012. "Fluid Flow and Interlinked Feedback Loops Establish Left-Right Asymmetric Decay of Cerl2 mRNA." *Nature Communications* 3: 1322. <https://doi.org/10.1038/ncomms2319>.
- Nakhleh, Nader, Richard Francis, Rachel A. Giese, Xin Tian, You Li, Maimoona A. Zariwala, Hisato Yagi, et al. 2012. "High Prevalence of Respiratory Ciliary Dysfunction in Congenital Heart Disease Patients with Heterotaxy." *Circulation* 125 (18): 2232–42. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079780>.

- Namigai, Erica K. O., Nathan J. Kenny, and Sebastian M. Shimeld. 2014. "Right across the Tree of Life: The Evolution of Left-Right Asymmetry in the Bilateria." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 52 (6): 458–70. <https://doi.org/10.1002/dvg.22748>.
- Nonaka, Shigenori, Hidetaka Shiratori, Yukio Saijoh, and Hiroshi Hamada. 2002. "Determination of Left-Right Patterning of the Mouse Embryo by Artificial Nodal Flow." *Nature* 418 (6893): 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature00849>.
- Nonaka, Shigenori, Yosuke Tanaka, Yasushi Okada, Sen Takeda, Akihiro Harada, Yoshimitsu Kanai, Mizuho Kido, and Nobutaka Hirokawa. 1998. "Randomization of Left-Right Asymmetry Due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein." *Cell* 95 (6): 829–37. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81705-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81705-5).
- Nonaka, Shigenori, Satoko Yoshiba, Daisuke Watanabe, Shingo Ikeuchi, Tomonobu Goto, Wallace F. Marshall, and Hiroshi Hamada. 2005. "De Novo Formation of Left-Right Asymmetry by Posterior Tilt of Nodal Cilia." *PLoS Biology* 3 (8): e268. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030268>.
- NORA, JAMES J. 1968. "Multifactorial Inheritance Hypothesis for the Etiology of Congenital Heart Diseases the Genetic-Environmental Interaction." *Circulation* 38 (3): 604–617.
- Norris, Dominic P. 2012. "Cilia, Calcium and the Basis of Left-Right Asymmetry." *BMC Biology* 10 (December): 102. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-102>.
- Nöthe-Menchen, Tabea, Julia Wallmeier, Petra Pennekamp, Inga M. Höben, Heike Olbrich, Niki T. Loges, Johanna Raidt, et al. 2019. "Randomization of Left-Right Asymmetry and Congenital Heart Defects: The Role of DNAH5 in Humans and Mice." *Circulation. Genomic and Precision Medicine*, October. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.119.002686>.
- Okada, Y., S. Nonaka, Y. Tanaka, Y. Saijoh, H. Hamada, and N. Hirokawa. 1999. "Abnormal Nodal Flow Precedes Situs Inversus in Iv and Inv Mice." *Molecular Cell* 4 (4): 459–68. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80197-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80197-5).
- Oki, Shinya, Ryuju Hashimoto, Yuko Okui, Michael M. Shen, Eisuke Mekada, Hiroki Otani, Yukio Saijoh, and Hiroshi Hamada. 2007. "Sulfated Glycosaminoglycans Are Necessary for Nodal Signal Transmission from the Node to the Left Lateral Plate in the Mouse Embryo." *Development (Cambridge, England)* 134 (21): 3893–3904. <https://doi.org/10.1242/dev.009464>.

- Ostrowski, Lawrence E., Susan K. Dutcher, and Cecilia W. Lo. 2011. "Cilia and Models for Studying Structure and Function." *Proceedings of the American Thoracic Society* 8 (5): 423–29. <https://doi.org/10.1513/pats.201103-027SD>.
- Paria, Nandina, Lawson A. Copley, John A. Herring, Harry K. W. Kim, Benjamin S. Richards, Daniel J. Sucato, Carol A. Wise, and Jonathan J. Rios. 2013. "Whole-Exome Sequencing: Discovering Genetic Causes of Orthopaedic Disorders." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 95 (23): e1851-1858. <https://doi.org/10.2106/JBJS.L.01620>.
- Pusapati, Ganesh V., Jennifer H. Kong, Bhaven B. Patel, Arunkumar Krishnan, Andreas Sagner, Maia Kinnebrew, James Briscoe, L. Aravind, and Rajat Rohatgi. 2018. "CRISPR Screens Uncover Genes That Regulate Target Cell Sensitivity to the Morphogen Sonic Hedgehog." *Developmental Cell* 44 (1): 113-129.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.003>.
- Rankin, C. T., T. Bunton, A. M. Lawler, and S. J. Lee. 2000. "Regulation of Left-Right Patterning in Mice by Growth/Differentiation Factor-1." *Nature Genetics* 24 (3): 262–65. <https://doi.org/10.1038/73472>.
- Russell, Mark W., Wendy K. Chung, Jonathan R. Kaltman, and Thomas A. Miller. 2018. "Advances in the Understanding of the Genetic Determinants of Congenital Heart Disease and Their Impact on Clinical Outcomes." *Journal of the American Heart Association* 7 (6): e006906. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006906>.
- Saijoh, Yukio, Shinya Oki, Sachiko Ohishi, and Hiroshi Hamada. 2003. "Left-Right Patterning of the Mouse Lateral Plate Requires Nodal Produced in the Node." *Developmental Biology* 256 (1): 160–72. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00121-5](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00121-5).
- Shiraishi, Isao. 2016. "Left-Right Asymmetry and Human Heterotaxy Syndrome." In *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*, edited by Toshio Nakanishi, Roger R. Markwald, H.Scott Baldwin, Bradley B. Keller, Deepak Srivastava, and Hiroyuki Yamagishi, 49–56. Tokyo: Springer Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54628-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54628-3_6).
- Shiraishi, Isao, and Hajime Ichikawa. 2012. "Human Heterotaxy Syndrome – from Molecular Genetics to Clinical Features, Management, and Prognosis –." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 76 (9): 2066–75.
- Simmons, M. Abigail, and Martina Brueckner. 2017. "The Genetics of Congenital Heart Disease... Understanding and Improving Long-Term Outcomes in Congenital Heart Disease: A Review for the General Cardiologist and Primary Care Physician." *Current*

<https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000538>.

- Spéder, Pauline, Astrid Petzoldt, Magali Suzanne, and Stéphane Noselli. 2007. “Strategies to Establish Left/Right Asymmetry in Vertebrates and Invertebrates.” *Current Opinion in Genetics & Development* 17 (4): 351–58. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.05.008>.
- Sperling, Silke, Christina H. Grimm, Ilona Dunkel, Siegrun Mebus, Hans-Peter Sperling, Arno Ebner, Raffaello Galli, et al. 2005. “Identification and Functional Analysis of CITED2 Mutations in Patients with Congenital Heart Defects.” *Human Mutation* 26 (6): 575–82. <https://doi.org/10.1002/humu.20262>.
- Srivastava, Deepak. 2006. “Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis.” *Cell* 126 (6): 1037–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.003>.
- Supp, D. M., M. Brueckner, M. R. Kuehn, D. P. Witte, L. A. Lowe, J. McGrath, J. Corrales, and S. S. Potter. 1999. “Targeted Deletion of the ATP Binding Domain of Left-Right Dynein Confirms Its Role in Specifying Development of Left-Right Asymmetries.” *Development (Cambridge, England)* 126 (23): 5495–5504.
- Tabin, Clifford J., and Kyle J. Vogan. 2003. “A Two-Cilia Model for Vertebrate Left-Right Axis Specification.” *Genes & Development* 17 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1101/gad.1053803>.
- Taketazu, Mio, Jane Lougheed, Shi-Joon Yoo, Joyce S. L. Lim, and Lisa K. Hornberger. 2006. “Spectrum of Cardiovascular Disease, Accuracy of Diagnosis, and Outcome in Fetal Heterotaxy Syndrome.” *The American Journal of Cardiology* 97 (5): 720–24. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.09.119>.
- Tan, Serena Y., Julie Rosenthal, Xiao-Qing Zhao, Richard J. Francis, Bishwanath Chatterjee, Steven L. Sabol, Kaari L. Linask, et al. 2007. “Heterotaxy and Complex Structural Heart Defects in a Mutant Mouse Model of Primary Ciliary Dyskinesia.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (12): 3742–52. <https://doi.org/10.1172/JCI33284>.
- Tanaka, Yosuke, Yasushi Okada, and Nobutaka Hirokawa. 2005. “FGF-Induced Vesicular Release of Sonic Hedgehog and Retinoic Acid in Leftward Nodal Flow Is Critical for Left-Right Determination.” *Nature* 435 (7039): 172–77. <https://doi.org/10.1038/nature03494>.
- Thienpont, Bernard, Luc Mertens, Thomy de Ravel, Benedicte Eyskens, Derize Boshoff, Nicole Maas, Jean-Pierre Fryns, Marc Gewillig, Joris R. Vermeesch, and Koen Devriendt. 2007. “Submicroscopic Chromosomal Imbalances Detected by Array-CGH Are a

- Frequent Cause of Congenital Heart Defects in Selected Patients.” *European Heart Journal* 28 (22): 2778–84. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl560>.
- Tsukui, T., J. Capdevila, K. Tamura, P. Ruiz-Lozano, C. Rodriguez-Esteban, S. Yonei-Tamura, J. Magallón, et al. 1999. “Multiple Left-Right Asymmetry Defects in Shh(-/-) Mutant Mice Unveil a Convergence of the Shh and Retinoic Acid Pathways in the Control of Lefty-1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11376–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11376>.
- Twigg, Stephen R. F., Deborah Lloyd, Dagan Jenkins, Nursel E. Elçioglu, Christopher D. O. Cooper, Nouriya Al-Sannaa, Ali Annagür, et al. 2012. “Mutations in Multidomain Protein MEGF8 Identify a Carpenter Syndrome Subtype Associated with Defective Lateralization.” *American Journal of Human Genetics* 91 (5): 897–905. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.027>.
- Van Praagh, R. 1985. “The Importance of Segmental Situs in the Diagnosis of Congenital Heart Disease.” *Seminars in Roentgenology* 20 (3): 254–71. [https://doi.org/10.1016/0037-198x\(85\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0037-198x(85)90009-4).
- Vandenberg, Laura N., and Michael Levin. 2013. “A Unified Model for Left-Right Asymmetry? Comparison and Synthesis of Molecular Models of Embryonic Laterality.” *Developmental Biology* 379 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.03.021>.
- Versacci, Paolo, Flaminia Pugnali, Maria Cristina Digilio, Carolina Putotto, Marta Unolt, Giulio Calcagni, Anwar Baban, and Bruno Marino. 2018. “Some Isolated Cardiac Malformations Can Be Related to Laterality Defects.” *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 5 (2). <https://doi.org/10.3390/jcdd5020024>.
- Waldo, K. L., D. H. Kumiski, K. T. Wallis, H. A. Stadt, M. R. Hutson, D. H. Platt, and M. L. Kirby. 2001. “Conotruncal Myocardium Arises from a Secondary Heart Field.” *Development (Cambridge, England)* 128 (16): 3179–88.
- Ware, Stephanie M., Jianlan Peng, Lirong Zhu, Susan Fernbach, Suzanne Colicos, Brett Casey, Jeffrey Towbin, and John W. Belmont. 2004. “Identification and Functional Analysis of ZIC3 Mutations in Heterotaxy and Related Congenital Heart Defects.” *American Journal of Human Genetics* 74 (1): 93–105.
- Wessels, Andy, and David Sedmera. 2003. “Developmental Anatomy of the Heart: A Tale of Mice and Man.” *Physiological Genomics* 15 (3): 165–76. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00033.2003>.

- Wolla, Christopher D., Anthony M. Hlavacek, U. Joseph Schoepf, Andreas M. Bucher, and Shahryar Chowdhury. 2013. "Cardiovascular Manifestations of Heterotaxy and Related Situs Abnormalities Assessed with CT Angiography." *Journal of Cardiovascular Computed Tomography* 7 (6): 408–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcct.2013.11.008>.
- Yokoyama, T., N. G. Copeland, N. A. Jenkins, C. A. Montgomery, F. F. Elder, and P. A. Overbeek. 1993. "Reversal of Left-Right Asymmetry: A Situs Inversus Mutation." *Science* 260 (5108): 679–82. <https://doi.org/10.1126/science.8480178>.
- Yoshida, Satoko, and Hiroshi Hamada. 2014. "Roles of Cilia, Fluid Flow, and Ca<sup>2+</sup> Signaling in Breaking of Left-Right Symmetry." *Trends in Genetics* 30 (1): 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.09.001>.
- Zaffran, Stéphane, and Manfred Frasch. 2002. "Early Signals in Cardiac Development." *Circulation Research* 91 (6): 457–69. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000034152.74523.a8>.
- Zaidi, Samir, and Martina Brueckner. 2017. "Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease." *Circulation Research* 120 (6): 923–40. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309140>.
- Zhang, X. M., M. Ramalho-Santos, and A. P. McMahon. 2001. "Smoothed Mutants Reveal Redundant Roles for Shh and Ihh Signaling Including Regulation of L/R Asymmetry by the Mouse Node." *Cell* 105 (6): 781–92.
- Zhang, Zhen, Deanne Alpert, Richard Francis, Bishwanath Chatterjee, Qing Yu, Terry Tansey, Steven L. Sabol, et al. 2009. "Massively Parallel Sequencing Identifies the Gene *Megf8* with ENU-Induced Mutation Causing Heterotaxy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9): 3219–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813400106>.
- Zhian, Samaneh, John Belmont, and Cheryl L. Maslen. 2012. "Specific Association of Missense Mutations in *CRELD1* with Cardiac Atrioventricular Septal Defects in Heterotaxy Syndrome." *American Journal of Medical Genetics. Part A* 158A (8): 2047–49. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35457>.

## ANNEXE 1 :

### CARDIOLOGIE PEDIATRIQUE, EN COURS DE REEDITION

#### SECTION IX : LE CŒUR ET LA PEDIATRIE GENERALE

#### PARTIE 6 : MALADIES GENETIQUES CONSTITUTIONNELLES, LE CŒUR ET LES VAISSEAUX

#### PARAGRAPHE C. : SYNDROMES

Dr Anne MOREAU DE BELLAING, Dr Fanny BAJOLLE

Unité Médico-Chirurgicale de Cardiologie Congénitale et Pédiatrique  
Centre de référence Malformations Cardiaques Congénitales Complexes - M3C  
Hôpital Necker Enfants Malades, APHP  
Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité  
149 rue de Sèvres-75015 Paris, France, EU

Les cardiopathies congénitales, indépendamment du phénotype et leur gravité, peuvent constituer un point d'appel majeur à des syndromes polymalformatifs d'origine chromosomique, génétique, métabolique ou environnementale (virus, agents tératogènes,...). Ainsi, environ 30% des malformations cardiaques congénitales (MCC) seraient associées à des anomalies extra-cardiaques (1). Ces dernières peuvent être parfois au premier plan et/ou constituer un risque surajouté important au phénotype clinique du patient.

Certaines associations sont constitutives de syndromes connus dont le mécanisme moléculaire en amont est souvent bien identifié. Les particularités dysmorphiques, le type de cardiopathie et/ou les lésions associées peuvent guider le diagnostic (**Tableau 1**). L'expertise d'un généticien clinicien est donc indispensable, en collaboration avec le cardiologue. Les analyses cytogénétiques (caryotype, analyse chromosomique sur puce à ADN ou ACPA) à la recherche d'une anomalie de nombre ou de structure des chromosomes peuvent également contribuer à la démarche diagnostique. Celles-ci peuvent être proposées dès la période anténatale lorsque le diagnostic de MCC est porté. La mise en évidence de lésions extra-cardiaques majeures ou d'anomalies chromosomiques sévères va fortement influencer la décision du couple quant à la poursuite ou non de la grossesse en cours (2).

Plus récemment, des anomalies à l'échelle du gène (gènes du développement cardiaque, voies de signalisation cellulaire, gènes des cils cellulaires,...) ont aussi été identifiées dans le cadre de séquences syndromiques précises. En cas de mutation familiale connue, un diagnostic pré-implantatoire ou un diagnostic pré-natal peuvent être proposés si la situation clinique le justifie.

Enfin, la même analyse sémiologique doit être appliquée pour les cardiomyopathies et les troubles congénitaux du rythme qui peuvent aussi être associés à des anomalies extra-cardiaques multiples.

Les syndromes associés aux MCC sont nombreux et leurs principales caractéristiques cliniques sont synthétisées dans le **Tableau 1**. Seuls les syndromes les plus fréquents seront détaillés dans les paragraphes suivants.

### **1. ANOMALIES CYTOGENETIQUES**

Historiquement, les aneuploïdies (anomalies du nombre de chromosomes) ont été les premières variations génétiques associées à la survenue de MCC. Lorsque ce sont seulement des régions chromosomiques qui sont manquantes ou anormalement répétées, on parle de CNV (Copy Number Variations). Ces derniers sont responsables des syndromes microdélétionnels.

#### **a. TRISOMIE 21**

Les MCC concernent presque un enfant sur deux ayant une trisomie 21. Il s'agit fréquemment d'un canal atrioventriculaire complet dont les deux ventricules sont équilibrés permettant une réparation chirurgicale le plus souvent de bon pronostic (3). A contrario, les patients avec trisomie 21 dont la MCC ne permet pas une correction complète mais seulement un montage palliatif de type univentriculaire, ont souvent un devenir plus défavorable étant plus sujets à développer une hypertension artérielle pulmonaire (4). A l'âge adulte, même en l'absence de MCC néonatale, les patients sont plus à risque de dysplasie valvulaire mitrale ou aortique et justifient donc d'une surveillance cardiologique à vie.

#### **b. AUTRES TRISOMIES**

Les trisomies 13 (syndrome de Patau) et 18 (syndrome d'Edwards) sont associées dans plus de 75% des cas à une MCC. En cas de trisomie 18, des anomalies fonctionnelles peuvent aussi être observées telles que des cardiomyopathies ou de la fibrose myocardique (5). Les lésions extra-cardiaques sont souvent multiples et sévères et conduisent à un diagnostic anténatal dans la majorité des cas.

#### **c. MONOSOMIE 45,X0**

La perte d'une partie ou de l'ensemble d'un des deux chromosomes X chez une femme est à l'origine du syndrome de Turner. Les principales MCC observées concernent la voie d'éjection du ventricule gauche allant de la simple bicuspidie aortique au syndrome d'hypoplasie du cœur gauche, en passant par la coarctation aortique. La sévérité globale des anomalies extra-cardiaques et notamment du développement neurocognitif est très variable et souvent difficile à prédire dans la mesure où la plupart des malades sont porteuses d'une monosomie en mosaïque (6). Même en l'absence de lésions congénitales, les patientes justifient d'une surveillance cardiovasculaire à vie puisqu'elles sont à plus risque de développer une hypertension artérielle et une dilatation de l'aorte ascendante, les exposant au risque de dissection aortique notamment pendant la grossesse lorsqu'elles sont dans un programme de procréation médicale assistée.

#### d. MICRODELETION 22q11.2

Le syndrome microdélétionnel 22q11 recouvre de nombreuses appellations telles que syndrome de Di George, syndrome vélo-cardio-facial ou association CATCH22. Il est hérité dans 10% des cas. Près de deux tiers des malades ont une MCC, le plus souvent de type conotruncal (tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, agénésie des valves pulmonaires, ventricule droit à double issue, interruption de la crosse aortique, tronc artériel commun). Il peut aussi s'agir d'anomalies des arcs aortiques et en particulier d'une aorte à droite détectable dès la période anténatale (7). Les MCC seraient liées à l'haploinsuffisance du gène *TBX1* emporté dans cette microdélétion. Les résultats chirurgicaux sont souvent moins bons en cas de délétion 22q11, probablement en partie à cause de l'incidence plus élevée de collatérales aorto-pulmonaires (MAPCA) (8). Le déficit immunitaire induit par l'hypoplasie thymique et les anomalies du métabolisme calcique sont à prendre en compte lors du management péri-opératoire, en particulier en période néonatale. Enfin, sur le plan extra-cardiaque, les malades sont aussi fréquemment concernés par un retard intellectuel et des troubles psychotiques à l'âge adulte.

#### e. MICRODELETION 7q11.23

Le syndrome de Williams Beuren peut être évoqué en présence d'un retard de croissance associé à une dysmorphie caractéristique incluant notamment un œdème péri-orbitaire, une grande bouche avec lèvre inférieure large et une racine du nez aplatie. Sur le plan neurocognitif, la personnalité *cocktail-party* et l'hypersensibilité à la musique sont assez constantes. Le phénotype cardiaque comprend typiquement une sténose aortique supra-valvulaire et une sténose des branches pulmonaires auquel s'ajoute souvent une hypertension artérielle sévère (+/- atteinte des artères rénales). Les lésions obstructives biventriculaires exposent les patients à un fort risque de mort subite en particulier lors de la sédation péri-opératoire (9). Les anomalies cardiaques sont liées au gène de l'élastine (*ELN*) emporté dans la délétion et composant majeur de la paroi des artères élastiques. Celui-ci peut également être le siège de mutations ponctuelles, responsables d'un phénotype cardiaque et vasculaire sans déficit neurodéveloppemental.

## 2. ANOMALIES GENIQUES

Les principales variations ponctuelles (anomalie d'une ou quelques bases nucléiques d'un gène) syndromiques peuvent être schématiquement réparties en quatre groupes : les RASopathies, les ciliopathies, les modificateurs de la machinerie transcriptionnelle et les anomalies de la voie de signalisation Notch.

#### a. RASOPATHIES

Les RASopathies (syndrome de Noonan, syndrome Cardio-Facio-Cutané, syndrome Costello, syndrome LEOPARD,...) composent un large sous-ensemble de pathologies impliquant des anomalies

des gènes de la cascade de signalisation des RAS-MAPkinases (10). Leur transmission est autosomique dominante. Dans plus de la moitié des cas, le gène *PTPN11*, codant pour la tyrosine phosphatase Shp2, est impliqué. Sur le plan cardiaque, le spectre phénotypique comprend des sténoses pulmonaires valvulaires et supra-valvulaires, souvent résistantes à la valvuloplastie percutanée (11). On retrouve plus rarement une cardiomyopathie hypertrophique. A l'électrocardiogramme, l'axe électrique du QRS est typiquement en aVR. Enfin, l'incidence importante d'anomalies lymphatiques explique que des chylothorax viennent régulièrement compliquer les suites post-opératoires thoraciques (12).

La neurofibromatose de type 1 et le syndrome de Légius sont également des phacomatoses impliquant cette voie de signalisation.

#### b. CILIOPATHIES

Les ciliopathies sont dues à une anomalie de la structure ou de la fonction des cils présents à la surface de presque toutes les cellules eucaryotes. Elles sont souvent associées à des anomalies de la latéralisation de l'embryon (hétérotaxie). Elles peuvent impliquer de nombreux organes et ainsi être responsables d'anomalies splanchniques, d'une atrésie des voies biliaires, d'une malrotation intestinale, d'une dyskinésie ciliaire primitive, d'une rétinite pigmentaire, d'une holoprosencéphalie, de reins polykystiques ou encore de diabète (13). Dans le syndrome d'Ellis-Van-Crevelde, des anomalies orthopédiques (petite taille, petit thorax, hexadactylie) sont fréquemment observées en association avec un canal atrioventriculaire de type oreillette unique.

#### c. MODIFICATEURS DE LA MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE

De nombreuses MCC syndromiques impliquent des facteurs de transcription exprimés précocement dans les précurseurs des cellules cardiaques. Il s'agit par exemple, du syndrome cardio-squelettique d'Holt-Oram associant typiquement des malformations du segment radial des membres supérieurs, une communication inter-auriculaire et un bloc auriculo-ventriculaire du premier degré. Il met en jeu le gène *TBX5* impliqué dans la spécification cellulaire et l'organogénèse précoce (14).

D'autres régulateurs de la machinerie transcriptionnelle peuvent être perturbés et altérés la structure ou la fonction des histones. Ainsi, des anomalies des gènes *KMT2D* et *KDM6A* sont impliquées dans le syndrome de Kabuki tandis que des variations du gène *CHD7* expliquent la majorité des syndromes CHARGE.

#### d. ANOMALIES DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

La voie de signalisation Notch est très conservée au fil de l'évolution et joue un rôle majeur dans la communication locale intercellulaire, en particulier lors du développement du système cardiaque. De nombreux gènes sont impliqués dans cette cascade de signalisation. Le syndrome d'Alagille est lié dans 90% des cas à des anomalies du ligand *JAG1* et est responsable le plus souvent d'une tétralogie de Fallot associée à des anomalies hépatiques sévères pour lesquelles le recours à la greffe peut être nécessaire (15).

**TABLEAU 1 : Principaux syndromes génétiques rencontrés en cardiologie congénitale.**

Pour chaque syndrome, le principal point d'appel extra-cardiaque (dysmorphologie, anomalie orthopédique, anomalie digestive ou anomalie cutanée) est surligné de couleur foncée tandis que les autres signes extra-cardiaques sont de couleur pastel.

**Abréviations**

A. : anomalies, Ao : aorte, AP : artère pulmonaire, APGA : artère pulmonaire gauche aberrante, APSO : atrésie pulmonaire à septum ouvert, AVP : agénésie des valves pulmonaires, BAV : bloc auriculo-ventriculaire, CAV : canal auriculo-ventriculaire, CCT : cardiopathie conotruncale (IIA, TAC, T4F, APSO, AVP, VDDI, CIV de la voie d'éjection), CFC : cardio-facio-cutané, CIA : communication inter-auriculaire, CIV : communication interventriculaire, CMH : cardiomyopathie hypertrophique, CoAo : coarctation de l'aorte, COG : cardiopathie obstructive du cœur gauche (bicuspidie aortique, SA, CoAo, sténose mitrale, hypoplasie du cœur gauche, syndrome de Shone) , DI : déficience intellectuelle, HTA : hypertension artérielle, HTAP : hypertension artérielle pulmonaire, IAA : interruption de l'arche aortique, MAR : malformation ano-rectale, MAV : malformation artério-veineuse, MS : membre supérieur, PCA : persistance du canal artériel, RCIU : retard de croissance intra-utérin, RGO : reflux gastro-œsophagien, RPN : retard de croissance post-natal, RVPA : retour veineux pulmonaire anormal, RVU : reflux vésico-urétéral, SA : sténose aortique, SP : sténose pulmonaire, T. : troubles, T4F : tétralogie de Fallot, TAC : tronc artériel commun, TDAH : troubles de déficit de l'attention et hyperactivité, TDC : trouble de conduction, TDR : trouble du rythme, VDDI : ventricule droit à double issu, VG : ventricule gauche, VU : ventricule unique.

## REFERENCES

1. Khoshnood B, Lelong N, Houyel L, Thieulin A-C, Jouannic J-M, Magnier S, et al. Prevalence, timing of diagnosis and mortality of newborns with congenital heart defects: a population-based study. *Heart*. 15 nov 2012;98(22):1667-73.
2. Bensemli M, Bajolle F, Ladouceur M, Fermont L, Lévy M, Le Bidois J, et al. Associated genetic syndromes and extracardiac malformations strongly influence outcomes of fetuses with congenital heart diseases. *Arch Cardiovasc Dis*. mai 2016;109(5):330-6.
3. St Louis JD, Jodhka U, Jacobs JP, He X, Hill KD, Pasquali SK, et al. Contemporary outcomes of complete atrioventricular septal defect repair: analysis of the Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database. *J Thorac Cardiovasc Surg*. déc 2014;148(6):2526-31.
4. Colquitt JL, Morris SA, Denfield SW, Fraser CD, Wang Y, Kyle WB. Survival in Children With Down Syndrome Undergoing Single-Ventricle Palliation. *Ann Thorac Surg*. mai 2016;101(5):1834-41.
5. Van Praagh S, Truman T, Firpo A, Bano-Rodrigo A, Fried R, McManus B, et al. Cardiac malformations in trisomy-18: a study of 41 postmortem cases. *J Am Coll Cardiol*. juin 1989;13(7):1586-97.
6. Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med*. 16 sept 2004;351(12):1227-38.
7. Oztunc F, Ugan Atik S, Dedeoglu R, Yuksel MA, Madazli R. Aortic arch anomalies detected in foetal life by echocardiography. *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol*. juill 2018;38(5):647-51.
8. Mahle WT, Crisalli J, Coleman K, Campbell RM, Tam VKH, Vincent RN, et al. Deletion of chromosome 22q11.2 and outcome in patients with pulmonary atresia and ventricular septal defect. *Ann Thorac Surg*. août 2003;76(2):567-71.
9. Hornik CP, Collins RT, Jaquiss RDB, Jacobs JP, Jacobs ML, Pasquali SK, et al. Adverse cardiac events in children with Williams syndrome undergoing cardiovascular surgery: An analysis of the Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database. *J Thorac Cardiovasc Surg*. juin 2015;149(6):1516-1522.e1.
10. Aoki Y, Niihori T, Inoue S, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *J Hum Genet*. janv 2016;61(1):33-9.
11. Prendiville TW, Gauvreau K, Tworog-Dube E, Patkin L, Kucherlapati RS, Roberts AE, et al. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Arch Dis Child*. juill 2014;99(7):629-34.
12. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*. oct 2010;126(4):746-59.
13. Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2017;18(9):533-47.
14. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, et al. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. janv 1997;15(1):30-5.
15. Martin BM, Ivanova MH, Sarukhanov A, Kim A, Power P, Pugash D, et al. Prenatal and postnatal findings in serpentine fibula polycystic kidney syndrome and a review of the NOTCH2 spectrum disorders. *Am J Med Genet A*. oct 2014;164A(10):2490-5.

## ANNEXE 2 :

### TRAITE CARDIOLOGIE ET MEDECINE VASCULAIRE, EDITION 2020

Cardiologie et Médecine Vasculaire  
Partie 11 : Cardiologie Pédiatrique

#### **Génétique des Cardiopathies Congénitales**

Dr Anne MOREAU DE BELLAING, MD, Chef de Clinique Assistante

Dr Fanny BAJOLLE, MD, PhD, Praticien Hospitalier

Unité Médico-Chirurgicale de Cardiologie Congénitale et Pédiatrique  
Centre de référence Malformations Cardiaques Congénitales Complexes - M3C  
Hôpital Necker Enfants Malades, APHP  
Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité  
149 rue de Sèvres-75015 Paris, France, EU

Nombre de caractères : 17 712

## 1. INTRODUCTION

Les malformations cardiaques congénitales (MCC) sont fréquentes et hétérogènes. Elles résultent d'une ou plusieurs anomalies survenues pendant le développement embryonnaire. Des facteurs environnementaux et génétiques interagissent précocement et contribuent, ensemble, au phénotype de l'enfant à naître.

Au cours de ces dix dernières années, l'identification des mécanismes génétiques n'a fait que progresser notamment grâce à l'utilisation à grande échelle des récentes technologies d'analyse moléculaire mais également grâce à l'étude de modèles animaux présentant des cardiopathies après inactivation spontanée ou induite de gènes.

Les facteurs génétiques impliqués dans le développement des MCC peuvent être de différentes natures en fonction du niveau d'atteinte de la molécule d'ADN. On parle d'aneuploïdie en cas d'anomalie du nombre total de chromosomes. Lorsque ce sont seulement des régions chromosomiques qui sont manquantes ou anormalement répétées, on parle de CNV (Copy Number Variations). Enfin, lorsque l'anomalie touche une ou quelques bases nucléiques d'un gène, il s'agit d'une mutation ponctuelle.

Les anomalies génétiques responsables des MCC peuvent être héritées d'un ou des deux parents, ou survenir accidentellement pendant la conception. L'anomalie est alors dite « *de novo* ».

Lorsqu'une anomalie génétique est identifiée, elle permet d'expliquer le mécanisme moléculaire impliqué dans la MCC du patient mais aussi d'envisager son impact plus global sur le devenir cardiaque et extracardiaque du malade. En effet, elle peut induire d'autres perturbations biologiques pendant la grossesse puis pendant toute la vie (dysfonction myocardique, trouble du rythme cardiaque, anomalie de la croissance, déficit cognitif, développement tumoral,...) (1).

La compréhension des bases moléculaires des MCC fait donc désormais partie de la prise en charge globale et multidisciplinaire des patients. Elle n'est plus réservée uniquement aux généticiens et ses grands principes doivent être maîtrisés par tout médecin prenant en charge un malade ayant une MCC.

## 2. PRINCIPALES ETIOLOGIES GENETIQUES DES MALFORMATIONS CARDIAQUES

On parle de cardiopathie « syndromique », par opposition à « isolée », lorsque la malformation cardiaque du patient est associée à une ou plusieurs anomalies extracardiaques. Les principaux syndromes génétiques impliquant une MCC sont résumés dans le **Tableau 1**. Leur diagnostic peut être guidé par les points d'appel extracardiaques, évolutifs avec l'âge (2).

Plus de la moitié des patients ayant une MCC n'a encore pas de diagnostic étiologique, en particulier en cas de forme isolée et sporadique (**Figure 1**) (3). D'autres mécanismes génétiques restent donc encore à découvrir (mutations somatiques, variations multigéniques, variations des régions non codantes,...) de même que des modificateurs épigénétiques dont certaines expositions environnementales.

### a. ANEUPLOÏDIES

Historiquement, les aneuploïdies ont été les premières variations génétiques associées à la survenue de MCC. Elles sont diagnostiquées à l'aide d'un caryotype et sont responsables de MCC syndromiques.

Les MCC concernent presque un enfant sur deux ayant une trisomie 21. Il s'agit le plus souvent d'un canal atrioventriculaire complet dont les deux ventricules sont équilibrés. A l'âge adulte, les patients sont plus à risque de développer précocement une dysplasie valvulaire mitrale ou aortique.

Les trisomies 13 et 18 sont presque toujours associées à des MCC. En cas de trisomie 18, des anomalies fonctionnelles peuvent aussi être observées telles que des cardiomyopathies ou de la fibrose myocardique. La gravité des lésions extra-cardiaques conduit souvent au diagnostic dès la période fœtale.

La perte d'un des deux chromosomes X chez une femme est à l'origine du syndrome de Turner. Les principales MCC observées concernent la voie d'éjection du ventricule gauche.

## b. SYNDROMES MICRODELETIONNELS

Les CNV sont responsables de la délétion ou de la duplication de plusieurs gènes contigus. Elles peuvent être diagnostiquées grâce à la réalisation d'une analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA ou CGH array en anglais). Les CNV les plus fréquentes peuvent aussi être recherchées directement à l'aide de sondes fluorescentes. Le phénotype cardiaque et extracardiaque de ces syndromes est en rapport avec la fonction des gènes impliqués. Tous les types de MCC peuvent être observés avec toutefois un déséquilibre de représentation en fonction du syndrome (**Tableau 1**).

Le syndrome de Di George (microdélétion 22q11.2) est le syndrome microdélétionnel le plus fréquent et est hérité dans 10% des cas. Une MCC est présente chez environ 2/3 des malades. Il s'agit le plus souvent d'une cardiopathie conotruncale ou d'une anomalie des arcs aortiques (aorte à droite, double arc) causée par l'haploinsuffisance du gène *TBX1*.

Le syndrome de Williams Beuren (microdélétion 7q11.23) est classiquement associé à une sténose aortique supra- valvulaire et une sténose pulmonaire. Le phénotype cardiaque des patients est lié au gène de l'élastine emporté dans la délétion et composant majeur de la paroi des artères élastiques. L'hypersociabilité (personnalité *cocktail-party*) et la sensibilité à la musique sont deux éléments marquants du profil comportemental des patients.

## c. MUTATIONS PONCTUELLES

### i. Introduction

Certaines variations rares peuvent modifier la séquence codante d'un gène et ainsi son expression protéique. Ces mutations ponctuelles peuvent concerner des gènes impliqués dans différentes voies biologiques (voie de signalisation Sonic Hedgehog, asymétrie gauche-droite de l'embryon,...). Il peut aussi s'agir de facteurs de transcription ou de gènes nécessaires au bon fonctionnement des cils de la surface cellulaire. Tous sont des gènes fortement exprimés dans le cœur en formation.

Une mutation ponctuelle peut être responsable d'une anomalie pendant le développement cardiaque mais peut aussi être impliquée de façon concomitante dans le développement

d'autres organes. Ainsi, on estime que 14% des patients ayant une MCC sans anomalie chromosomique identifiée associent tout de même des malformations extracardiaques (4).

Les principales variations ponctuelles syndromiques peuvent être regroupées en trois groupes de pathologies : les RASopathies, les ciliopathies et les modificateurs de la machinerie transcriptionnelle. Ces variations sont le plus souvent *de novo* contrairement aux mutations non syndromiques qui sont plus régulièrement héritées (3).

#### ii. RASopathies

Les RASopathies, dont le syndrome de Noonan est le chef de fil, sont des maladies autosomiques dominantes dues à des mutations dans la cascade de signalisation des RAS-MAP kinases. Une variation faux-sens du gène *PTPN11* est responsable de la moitié d'entre elles. La sténose pulmonaire valvulaire, souvent rebelle à la valvuloplastie percutanée, est la malformation cardiaque la plus typique.

#### iii. Ciliopathies

Les ciliopathies sont dues à une anomalie de la structure ou de la fonction des cils présents à la surface des cellules. Elles sont souvent associées à des anomalies de la latéralisation de l'embryon (hétérotaxie). Elles peuvent impliquer des anomalies splanchniques, une atésie des voies biliaires, une malrotation intestinale, une dyskinésie ciliaire primitive, une rétinite pigmentaire, une holoprosencéphalie, des reins polykystiques, un diabète... Plusieurs dizaines de gènes sont maintenant rapportées dans ces maladies.

#### iv. Modificateurs de la machinerie transcriptionnelle

Des mutations ponctuelles affectant des facteurs de transcription cardiaques peuvent être responsables de MCC syndromiques. Parmi elles, le syndrome d'Holt-Oram met en jeu le gène *TBX5* qui participe à la spécification cellulaire et à l'organogenèse précoce. D'autres régulateurs de la machinerie transcriptionnelle peuvent être perturbés et altérés la structure ou la fonction des histones comme dans le syndrome de Kabuki ou l'association CHARGE. Le remodelage de la chromatine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation des gènes.

#### v. Mutations ponctuelles non syndromiques

Les gènes responsables de MCC isolées sont eux aussi nombreux. Entre autres, il peut s'agir de protéines de structure telles que celles composant le sarcomère cardiaque (*MYH7*, *ACTC1*, *MYH6*). La malformation cardiaque est alors fréquemment associée à une cardiomyopathie.

De façon intéressante, parmi les autres gènes récemment identifiés, plusieurs avaient déjà été rapportés pour leur implication dans le développement cérébral. Cette découverte renforce le lien étroit entre embryogenèse cardiaque et cérébrale, déjà souligné par la surreprésentation des troubles neurodéveloppementaux chez les patients MCC indépendamment d'autres facteurs confondants tels que l'hématose ou les conditions opératoires (5).

### 3. CONSEIL GENETIQUE ET PRECONCEPTIONNEL

Les progrès médico-chirurgicaux des trente dernières années ont significativement transformé le devenir des patients porteurs de MCC, permettant désormais au plus grand nombre d'atteindre l'âge adulte et d'envisager la parentalité.

Un certain nombre d'anomalies génétiques sous-jacentes au développement des MCC suit une hérédité mendélienne. En d'autres termes, ces anomalies peuvent être transmises de génération en génération. Par ailleurs, le risque global de récurrence au sein d'une fratrie est élevé (presque 4 fois plus de risque que la population générale) et varie selon le type de MCC (6).

#### a. Bilan génétique

Le caractère familial ou syndromique d'une MCC peut conduire à adresser le patient vers une consultation spécialisée de génétique afin d'identifier une anomalie moléculaire sous-jacente. L'hétérogénéité génétique et phénotypique des MCC rend complexe leur approche étiologique, en particulier en cas de cardiopathie isolée, c'est-à-dire sans signes extracardiaques pour guider l'enquête biologique.

Désormais, un bilan moléculaire exhaustif, à l'occasion d'une prise de sang, peut d'emblée être proposé au patient lorsque le diagnostic de la MCC est fait. Il comprend, en première intention, un caryotype et une ACPA à la recherche d'une anomalie de nombre ou de structure des chromosomes. En cas de résultats cytogénétiques normaux, une analyse complémentaire à l'échelle du gène peut être envisagée. Il peut s'agir du séquençage à haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) d'un panel de gènes impliqués dans le développement du cœur ou du séquençage de l'ensemble des exons de l'ADN (Whole Exome Sequencing, WES). A l'heure actuelle, ces tests moléculaires requièrent encore un délai d'analyse de plusieurs mois et leur interprétation n'est pas toujours évidente. En conséquence, ils ne peuvent pas être proposés en routine clinique à tous les patients mais sont parfois discutés en cas de récurrence familiale.

#### b. Conseil génétique

Un conseil génétique peut être proposé à la famille lorsqu'une anomalie moléculaire a été identifiée chez le patient. Cela prend d'autant plus de sens lorsque le phénotype malformatif lié à la variation génétique est évolutif avec le temps (apparition de troubles du rythme, développement d'une cardiomyopathie, prédisposition à la tumorigenèse,...). Ainsi, même en cas d'anatomie cardiaque normale, certains porteurs d'anomalies moléculaires requièrent une surveillance cardiaque et/ou extracardiaque rapprochée.

#### c. Grossesse

Le risque de survenue d'une MCC est significativement plus élevé lorsque l'un ou les deux parents du futur enfant a une cardiopathie congénitale. Ce risque est plus important lorsqu'il s'agit de la mère et est variable selon le type de MCC et le mode de transmission de l'anomalie moléculaire. Comme le suggèrent les recommandations de l'European Society of Cardiology, un conseil pré-conceptionnel peut être proposé afin d'envisager le risque de récurrence de MCC pour la descendance (7). Cette évaluation prénatale doit être accompagnée d'un soutien psychologique du couple.

En cas d'anomalie moléculaire préalablement identifiée chez le patient, un diagnostic anténatal peut être proposé au couple. Il requiert l'analyse génétique de l'enfant à partir d'un prélèvement de villosités choriales ou d'une amniocentèse à la recherche de la même anomalie. Étant donnée la variabilité du phénotype cardiaque et extra-cardiaque pour une même mutation, l'identification de l'anomalie moléculaire n'est souvent pas suffisante pour prédire les conséquences anatomiques et fonctionnelles (1). La corrélation génotype-phénotype n'étant pas évidente, il est donc surtout proposé une imagerie d'expertise dès le 4<sup>ème</sup> mois de la grossesse afin de détecter une MCC dont la gravité pourrait faire envisager une interruption médicale de la grossesse (IMG) (7). Les lésions extra-cardiaques associées, notamment dans le cadre d'une forme syndromique, peuvent également justifier d'une IMG.

Lorsque l'anomalie moléculaire est identifiée et son mode de transmission clairement établi, un diagnostic pré-implantatoire peut aussi être envisagé. Celui-ci requiert de longs mois d'attente et un processus technique laborieux. D'autres méthodes de screening anténatal pourraient bientôt être envisagées comme les tests prénataux non-invasifs par simple prise de sang maternelle comme cela existe déjà pour le dépistage des aneuploïdies (8).

### Figure 1 : Étiologie des cardiopathies congénitales

#### Tableau 1 : Principaux syndromes rencontrés en cardiologie congénitale.

Les syndromes sont classifiés selon le principal point d'appel extra-cardiaque (dysmorphologie, anomalie orthopédique, anomalie digestive ou anomalie cutanée). Le principal point d'appel est surligné de couleur foncée tandis que les autres signes extra-cardiaques sont de couleur pastel.

A. : anomalies, Ao : aorte, AP : artère pulmonaire, APGA : artère pulmonaire gauche aberrante, APSO : atrésie pulmonaire à septum ouvert, AVP : agénésie des valves pulmonaires, BAV : bloc auriculo-ventriculaire, CAV : canal auriculo-ventriculaire, CCT : cardiopathie conotruncale (IIA, TAC, T4F, APSO, AVP, VDDI, CIV de la voie d'éjection), CFC : cardio-facio-cutané, CIA : communication inter-auriculaire, CIV : communication interventriculaire, CMH : cardiomyopathie hypertrophique, CoAo : coarctation de l'aorte, COG : cardiopathie obstructive du cœur gauche (bicuspidie aortique, SA, CoAo, sténose mitrale, hypoplasie du cœur gauche, syndrome de Shone) , DI : déficience intellectuelle, HTA : hypertension artérielle, HTAP : hypertension artérielle pulmonaire, IAA : interruption de l'arche aortique, MAR : malformation ano-rectale, MAV : malformation artério-veineuse, MS : membre supérieur, PCA : persistance du canal artériel, RCIU : retard de croissance intra-utérin, RGO : reflux gastro-œsophagien, RPN : retard de croissance post-natal, RVPA : retour veineux pulmonaire anormal, SA : sténose aortique, SP : sténose pulmonaire, T. : troubles, T4F : tétralogie de Fallot, TAC : tronc artériel commun, TDAH : troubles de déficit de l'attention et hyperactivité, TDC : trouble de conduction, TDR : trouble du rythme, VDDI : ventricule droit à double issu, VG : ventricule gauche, VU : ventricule unique.

#### POINTS CLES

- Les MCC résultent d'une anomalie précoce survenant lors du développement embryonnaire du cœur. Cette anomalie peut être causée par des facteurs environnementaux et/ou des facteurs génétiques.
- L'architecture génétique des MCC est complexe et n'inclut plus seulement des anomalies chromosomiques et des modèles monogéniques.
- Les anomalies cytogénétiques (aneuploidies, CNV) sont les causes, actuellement connues, les plus fréquentes de MCC. Elles sont presque toujours responsables de MCC syndromiques dont les atteintes extra-cardiaques influencent le pronostic global du patient.
- Lorsqu'une cause moléculaire est identifiée, un conseil génétique peut être proposé à la famille et un conseil pré-conceptionnel pourra être organisé lorsque le patient souhaitera devenir parent. Dans tous les cas, une échocardiographie fœtale d'expertise sera proposée tôt pendant la grossesse.

#### REFERENCES

1. Russell MW, Chung WK, Kaltman JR, Miller TA. Advances in the Understanding of the Genetic Determinants of Congenital Heart Disease and Their Impact on Clinical Outcomes. *J Am Heart Assoc.* 1 mars 2018;7(6):e006906.
2. Muenke M, Kruszka PS, Sable CA, Belmont JW. *Congenital Heart Disease-Molecular Genetics, Principles of Diagnosis and Treatment.* Karger. 2015.
3. Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Sholler GF, Dunwoodie SL, Harvey RP, et al. Advances in the Genetics of Congenital Heart Disease: A Clinician's Guide. *J Am Coll Cardiol.* 21 févr 2017;69(7):859-70.
4. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res.* 17 mars 2017;120(6):923-40.
5. Simmons MA, Brueckner M. The genetics of congenital heart disease... understanding and improving long-term outcomes in congenital heart disease: a review for the general cardiologist and primary care physician. *Curr Opin Pediatr.* oct 2017;29(5):520-8.
6. Brodwall K, Greve G, Leirgul E, Tell GS, Vollset SE, Øyen N. Recurrence of congenital heart defects among siblings-a nationwide study. *Am J Med Genet A.* juin 2017;173(6):1575-85.
7. Endorsed by the European Society of Gynecology (ESG), the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC), and the German Society for Gender Medicine (DGesGM), Authors/Task Force Members, Regitz-Zagrosek V, Blomstrom Lundqvist C, Borghi C, Cifkova R, et al. ESC Guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy: The Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2 déc 2011;32(24):3147-97.
8. Roos-Hesselink JW, Budts W, Walker F, Backer JFAD, Swan L, Stones W, et al. Organisation of care for pregnancy in patients with congenital heart disease. *Heart.* 1 déc 2017;103(23):1854-9.

Diagnostic	A. génétique	Prévalence	A. cardiaque	Dysmorphie	A. orthopédique	A. digestive	A. peau/tissu	A. neuro	A. gé nito-urinaire	Autres	Héré dité
<b>Syndrome de Down</b>	Trisomie 21	1/1 000	CAV, CIA, CIV, PCA, T4F HTAP	Fentes palpébrales obliques Nuque plate Visage rond Epicanthus	RCIU, RPN Instabilité adan- occipitale Hyperlaxité ligamentaire Clinodactylie V	Atrésie duodénale Imperforation anale		Hypotonie, DI Microcéphalie Autisme		Dysthyroïdie, diabète Leucémie aiguë myéloïde Déficit immunitaire Pli palmaire unique Cataracte, strabisme	-
<b>Syndrome de Turner</b>	Monosomie 45,X0	1/2 500	COG, CIA, RVPA HTA, anévrisme de l'Ao	Pterygium coli Mamelons écartés Fente palatine	RCIU, RPN			DI léger, TDAH		Lymphoedème Insuffisance ovarienne	-
<b>Syndrome de Di George</b>	del22q11.2 (TBX1)	1/3 000	CCT Anomalie des arcs	Nez tubulaire avec pointe bulbeuse Long philtrum Petite bouche	RPN Doigts fins A. vertébrales			DI T. psychotiques	A. rénales	Hypoplasie thymique Hypocalcémie	-
<b>Syndrome "cat-eye"</b>	dup22q11 (TBX1)	1/74 000	T4F, RVPA, CIV, CIA, VU, TGA	Microphthalmie Colobome irien Fente palatine Tubercule pré-tragien		Atrésie anale					-
<b>Syndrome de Williams-Beuren</b>	del7q11.23 (ELN)	1/7 500	Sténose supraAo en sablier Sténose pulmonaire Sténose branches pulmonaires CIA, CIV, HTA Sténose des artères rénales	"Facès d'elfe" Lèvre inférieure éversée Joues pleines Cedème péri-orbitaire Iris stellaire	RPN			DI Hypersociabilité		Hypercalcémie Strabisme	AD
<b>RASopathies</b>	PTPN11, SOS1- 2, HRAS, BRAF, RAF1, SHOC2, MEK1/2, MAP2K1-2, RIT1, KRAS, NRAS, RAS, A2ML1, LZTR1, MYS14, SPRY1, SYNGAP1	1/2 200	<b>Syndrome de Noonan</b> SP, CIA, CAV, CIV, PCA, T4F, CoAo Sténoses AP, CMH ECG : axe positif en aVR  <b>LEOPARD</b> SP, CMH, anomalies valvulaires Anomalies coronaires Anomalies ECG  <b>Syndrome CFC</b> SP, CIA, CIV, CMH Anomalies valvulaires et aorte TDR  <b>Syndrome de Costello</b> SP, CMH, tachycardie atriale	Ptoxis Hypertéonisme Front haut Racine du nez déprimée Filtrum plat Nuque épaisse	RPN Thorax bombé			<b>LEOPARD</b> Lentiginos Naevi Taches café au lait  <b>CFC</b> A. ectodermique	CFC DI Macrocephalie  RVU Hydronephrose Rein dysplasique Cryptorchidie	A. de la coagulation Thrombopénie Hyperthermie maligne Chylothorax  <b>LEOPARD</b> Surdité  <b>Costello</b> Neuroblastome Rhabdomyosarcome	AD
<b>Syndrome de Mowat Wilson</b>	ZEB2	1/75 000	Anomalies valvulaires Sténose aortique et pulmonaire Sténose branches pulmonaires Sling (APGA) T4F, VDDI	Sourcils larges espacés Visage triangulaire Grands lobes d'oreilles Strabisme Yeux enfoncés		Hirschprung Constipation		DI Microcéphalie Epilepsie T. psychotiques	A. génitales	Lymphoedème Insuffisance ovarienne	AD
<b>Syndrome de Smith Magenis</b>	del17p11.2 (RAI1)	1/20 000	CIA, CIV, T4F, APSO RVPA, SA, SP Anomalie valvulaire mitrale Anomalie valvulaire tricuspide	Bouche chapeau gendarme Synophris Strabisme Menton proéminent	Brachydactylie Scoliose			DI Agressivité T. sommeil T. comportement	A. rénales	Surdité Agénésie dentaire A. ophtalmologiques	-
<b>Association CHARGE</b>	CHD7	1/13 000	CCT, CAV, COG, PCA, CIA, CIV Ebstein Anomalie des arcs	Colobome Visage carré Atrésie des choanes A. des oreilles Asymétrie faciale		RGO Fistule oesophagienne		DI A. cérébrales T. comportement	A. génitales	Agénésie des canaux semi- circulaires Hypoplasie des lobes olfactifs	AD

Diagnostic	A. génétique	Prévalence	A. cardiaque	Dysmorphie	A. orthopédique	A. digestive	A. peau/tissu	A. neuro	A. génito-urinaire	Autres	Hérité
Syndrome de Comelia de Lange	<i>NIPBL</i> <i>SMC1A, SMC3</i>	1/50 000	SP, CIA, CIV, PCA Fuite mitrale ou tricuspide	Synophris, longs cils Nez court Lèvre supérieure fine Petites dents	RCIU, RPN Micromélie Oligodactylie	RGO Problèmes d'alimentation		DI Autisme Microcéphalie Épilepsie	A. rénales	Surdité	-
Syndrome de Kabuki	<i>KMT2D, KDM6A</i>	1/32 000	CIA, CIV, COG, PCA, T4F	Colobome Sourcil arqué, ptosis Larges oreilles Grandes fentes palpébrales	Nanisme Brachydactylie V Hémivertèbre Anomalies costales			DI, hypotonie Microcéphalie Épilepsie	A. rénales	Hypoglycémies Foetal pads	AD
Syndrome du cri du chat	del5p15.2 ( <i>CTNND2</i> )	1/32 000	CAV, CIV, T4F, VDDI, APSO	Epicanthus Arête nasale large Micrognathie				DI Microcéphalie		A. des dermatoglyphes Cri aigu	-
Syndrome de Koolen-de-Vries	del17q21.31 ( <i>KANSL1</i> )	1/16 000	CIA, CIV, SP, bicuspidie aortique	Long visage Epicanthus Larges oreilles Nez tubulaire				DI			-
Syndrome de Kleefstra	del9q34.3 ( <i>EHMT1</i> )	-	CIA, CIV, PCA, SP Bicuspidie aortique Flutter atrial	Synophris Prognathisme Arc de cupidon marqué				DI, hypotonie Microcéphalie Épilepsie T. sommeil T. comportement	A. rénales A. génitales		-
Syndrome de Wolf-Hirschhorn	del4p16.3 ( <i>FGFR1</i> )	1/50 000	CIA, CIV, SP, T4F, PCA	Casque de guerrier grec	RCIU, RPN Cyphose/scoliose Pied bot			DI, hypotonie Microcéphalie Épilepsie	A. génitales		-
Syndrome de Goldenhar	-	1/15 000	T4F, CIV, CIA	A. des oreilles et yeux Tubercule prétragien Asymétrie faciale	Hémivertèbres				A. rénales		-
	del8p23.1 ( <i>GATA4, SOX7</i> )	-	CAV, T4F, SP	Front haut Epicanthus Palais ogival Oreilles basses	RCIU, RPN	Hémie diaphragmatique		DI Hyperactivité Microcéphalie			-
Syndrome de Smith Lemli Opitz	<i>DHCR7</i>	1/30 000	CAV, CIA, CIV, PCA RVPA	Fente palatine Micrognathie Petite bouche Oreilles basses implantées	Polydactylie Syndactylie	Hirschprung Constipation RGO		DI, hypotonie Microcéphalie T. comportement	Hypospade A. rénale		AR
Syndrome de Loey's Dietz	<i>TGFBR1, TGFBR2</i>	-	Bicuspidie aortique Anévrisme de l'Ao Tortuosité artérielle Dysplasies valvulaires	Luette bilide Hypertélorisme Exotropie Hypoplasie malaire	Hyperlaxité Craniosynostose Scoliose Pectus excavatum			DI			AD
Séquence de Pierre Robin	-	1/10 000	CIV, CIA	Fente palatine							-
Syndrome d'Andersen-Tawil	<i>KCNJ2</i>	<1/100 000	Bicuspidie aortique QT long, arythmie ventriculaire	Hypertélorisme Oreilles basses	RPN, scoliose Syndactylie			DI Paralysie périodique			AD
CDG syndrome	Défaut de glycosylation	1/75 000	Toutes les cardiopathies Epanchement péricardique	Variable selon type CDG A. des yeux				DI Hypotonie			AR
Syndrome de Patau	Trisomie 13	1/12 000	CIV, CAV, PCA, CIA, VDDI Dysplasie polyvalvulaire	Fente palatine Microphthalmie Hypertélorisme	RCIU, RPN Polydactylie			Hypotonie Hyporéactivité	A. urogénitales	Holoprosencéphalie Cyclopie	-
Syndrome d'Edwards	Trisomie 18	1/7 000	CIV, CIA, PCA, CAV, T4F VDDI, COG Dysplasie polyvalvulaire	Micro-rétrognathie Microphthalmie Hypertélorisme	RCIU, RPN Pieds vanus équin Doigts chevauchants	MAR Atrésie œsophage		Hypotonie Hyporéactivité Microcéphalie	Agénésie rénale Hydronéphrose		-

Diagnostic	A. génétique	Prévalence	A. cardiaque	Dysmorphie	A. orthopédique	A. digestive	A. peau/tissu	A. neuro	A. génito-urinaire	Autres	Hérité
Syndrome d'Ellis van Creveld	<i>EVC1, EVC2</i>	-	CAV avec oreillette unique CIA, oreillette unique		RPN Hexadactylie Thorax étroit					Dysplasie ongles et dents Côtes courtes	AR
Syndrome d'Holt Oram	<i>TBX5</i>	1/100 000	CIA, CIV TDC (BAV)		A. préaxiales MS asymétriques Grande taille						AD
Maladie de Marfan	<i>FBN1</i>	1/5 000	Anévrisme de l'Ao Dysplasie polyvalvulaire		Arachnodactylie Hyperaxité Pectus carinatum					Ectopie du cristallin	AD
Syndrome de Rubinstein Taybi	del16p13.3 ( <i>CREBBP, EP300</i> )	1/112 000	CIA, CIV, PCA, T4F, hypoVG Dextrocardie	Fentes palpébrales bridées, longs cils Hypoplasie maxillaire Nez crochu	RPN Pouce en massue			DI Microcéphalie T. comportement		Tumorigénèse	AD
Syndrome de Poland	-	1/100 000	CIV, dextrocardie		Hypoplasie MS					Agénésie grand pectoral	AD
Anémie de Fanconi	Gènes de réparation de l'ADN	1/160 000	PCA, CoAo, T4F	A. des oreilles Microphthalmie	RPN A. pouce A. avant-bras				Infertilité	Pancytopenie Leucémie aigue myéloïde Hyperpigmentation	AR
Syndrome de Char	<i>TFAP2B</i>	-	PCA	Visage plat, ptosis Philtrum court Bouche triangulaire	A. 5ème doigt					Somnambulisme Persistence dents de lait	AD
Syndrome de Jacobsen	del11qter ( <i>ETS1</i> )	1/100 000	CIV, CIA, TAC, VDDI, COG	Crâne malformé Hypertélorisme Nez court Bouche en V	RICU, RPN			DI	A. rénales	Thrombopénie	-
Syndrome d'Okihara	<i>SALL4</i>	-	CIV, CIA, T4F		A. rayon radial				A. rénales	Limitation abduction yeux	AD
Association VACTERL	-	1/25 000	CIV, T4F, APSO		A. des membres A. vertébrales	A. oesophage Atrésie anale			A. rénales		-
	del1p36 ( <i>RERE, PRDM16</i> )	1/5 000	PCA, CIA, CIV, T4F, CoAo, Ebstein Non compaction myocardique	Front proéminent A. des oreilles Fente palatine	Brachydactylie Campodactylie			DI, hypotonie Microcéphalie Epilepsie		Hypothyroïdie Surdité	-
Syndrome d'Alagille	<i>JAG1, NOTCH2</i>	1/70 000	SP, T4F, CIA, CIV, CoAo Sténose branches pulmonaires Anomalie valvulaire aortique	Yeux enfoncés, nez fin Visage long et fin Oreilles mal ourlées Embryotoxon	Vertèbres ailes de papillon, RPN Anomalies costales	Cholestase A. biliaire		+/- DI	Hypogonadisme A. rénales	Rétinopathie pigmentaire	AD
Syndrome de Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	1/250 000	CIV, CIA, T4F, APSO, TAC	Oreilles dysplasiques	Malformations des pouces	Imperforation anale			A. rénales A. génitales	Surdité	AD
Atrésie de l'oesophage	-	1/2 500	CIV, CIA, T4F Arche aortique droit			Atrésie oesophage Omphalocèle Diverticule					-
Omphalocèle	-	1/8 500	T4F, CIV, CIA								-
Hemie diaphragmatique	<i>ZFPM2,...</i>	1/7 500	CIV				Hemie diaphragmatique				-
RASopathies - Neurofibromatose type 1 - Syndrome de Léguis (NF1-like)	<i>NF1</i>  <i>SPRED1</i>	1/3 500	Anévrismes et sténoses artérielles MAV rein/cœur/cerveau, HTA SP, CIA, CIV, CoAo, prolapsus mitral Neurofibrome intracardiaque				Taches café au lait Lentignes Tumeurs cutanées	Neurofibromes		Nodules de Lish	AD
Syndrome de Waardenburg type 1	<i>PAX3</i>	1/270 000	T4F				A. pigmentaires			Surdité Hétérochromie irienne	AD
Maladie de Rendu Osler	<i>ACVRL, ENG SMAD4</i>	1/6 500	MAV (hépatique, pulmonaire,...) HTAP néonatale				Télangiectasies			Epistaxis chroniques	AD
Maladie d'Ehlers Danlos type IV	<i>COL3A</i>	1/175 000	Dilatation et rupture artérielle Ectasie vasculaire, dissection				Peau translucide Acrogeria			Rupture utérine	AD

## ANNEXE 3 :

### CONGENITAL HEART DISEASES: THE BROKEN HEART, EDITION 2016

#### Part VIII d-Transposition of the Great Arteries

#### Chapter 33: Human Genetics

Patrice Bouvagnet, Anne Moreau de Bellaing

Laboratoire Cardiogénétique, Groupe Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Correspondance: patrice.bouvagnet@chu-lyon.fr

Word count: 4011

#### Summary

d-TGA is one of the rare CHD which benefits from early neonatal diagnosis because d-TGA required rapid post natal catheter procedure. In that respect, detecting parental genetic predisposing factors would contribute to focusing prenatal echographical attention to the early detection of d-TGA cases. A high male to female ratio and a high recurrence risk of d-TGA in the context of heterotaxy suggest the impact of genetic factors although familial cases of d-TGA are exceptional. Since the late 90's, a growing list of genes and chromosomal regions were associated with d-TGA among which the *ZIC3* gene. Although this gene is located on the X chromosome, *ZIC3* does not explain the male preponderance in d-TGA. D-TGA causal genes are involved in many different cellular pathways and can be provisionally sorted in two groups: those which disrupt the function of the embryonic node cilia and those which are downstream of this major embryological process of lateralization. Many more genes or gene factors remain to be discovered in d-TGA and related CHD because only a small percentage of d-TGA are yet genetically resolved.

## **Introduction**

Among Congenital Heart Defects (CHD), d-TGA has one of the lowest recurrence risk suggesting that genetic factors are not preponderant in this particular CHD to the point that Digiglio et al. reported in 2001 a series of familial d-TGA to show that familial d-TGA could be observed. Beside exceptional familial cases, the fact that the male to female ratio of d-TGA cases is high suggests that sexual chromosomes have an impact on d-TGA genesis. By contrast to isolated d-TGA, d-TGA in a context of heterotaxy has a relative high recurrence risk when any CHD and/or heterotaxic sign are considered. In this Chapter, we will review all genes and gene regions associated to d-TGA.

## **Epidemiology**

Although in most cases, as for other congenital heart defects (CHD), it is a sporadic disease, there are a few familial cases [1]. The prevalence of d-TGA is about twice as common in males as in females [2], suggesting that recessive genetic factors on the X chromosome could play a role. This hypothesis has been reinforced by the fact that parental consanguinity is not higher in d-TGA cases than in the control population [3], a situation compatible with X-linked inheritance. d-TGA usually occurs as an isolated congenital heart defect but occasionally may be part of a heterotaxia complex. The relative proportion of these two groups of d-TGA is unknown but the relative risk of recurrence for first degree relatives is much higher in the framework of heterotaxy than in cases unassociated with heterotaxy, suggesting a different influence of genetic factors between these 2 groups [4]. Thus it has been hypothesized that d-TGA could be, in some cases, the sole expression of heterotaxy.

## **Molecular genetics**

### **d-TGA without heterotaxy**

Among all gene mutations so far identified in d-TGA, only one – *MEDL13* (alias *PROSIT240*, *THRAP2*) was identified outside of the framework of heterotaxy. It was found interrupted in a patient

with mental retardation and d-TGA who had a reciprocal translocation[5]. The subsequent mutational screening of a series of 97 d-TGA patients revealed 3 missense mutations that could be causal, although in one case the mutation was found in a normal mother.

#### **d-TGA with heterotaxy**

All other mutations were found either in patients with isolated heterotaxy or heterotaxy with ciliary dysfunction. So far, *MED13L* has not yet been tested on a series of heterotaxic patients.

#### *d-TGA without cilia dysfunction*

In heterotaxy without cilia dysfunction, gene mutations have been found in 6 genes in patients with d-TGA: *ACVR2B*, *CFC1*, *GDF1*, *LEFTY2*, *MYH6*, *NODAL* and *ZIC3*. The causality of *ACVR2B* is dubious in d-TGA because the two studies reporting variants [6, 7] found the same variant (Arg40His), which is found relatively frequently (0.5%) in the world population. The two mutations found in *CFC1* in d-TGA patients are strong candidates for disease-causing mutations because they change the reading frame [8] or alter a splicing site [9]. The frameshift mutation (c.522delC, p.Gly174del) is associated with heterotaxic anomalies including one case of right and one of left lung isomerism but also was found in a normal mother. In the study of Goldmuntz et al. [9], the *CFC1* gene was screened in a series of 58 patients with d-TGA and only the mutation causing abnormal splicing was found, yielding a prevalence of 2% for *CFC1* mutations in patients with d-TGA. Three *GDF1* mutations were found in patients with d-TGA: two in a systematic screen (Cys227X and Ala318Thr) [10] and compound heterozygous mutations in a family with autosomal recessive inheritance and heterotaxy including right atrial isomerism [11]. Interestingly, one of the compound mutations is the Cys227X mutation. This mutation was found in controls suggesting that alone this mutation has either no impact or that it can predispose to isolated d-TGA, a phenotype less severe than heterotaxy, as observed when this mutation is associated with another mutation in trans. The gene encoding the alpha cardiac myosin heavy chain gene (*MYH6*) was found with a mutation in a girl with a d-TGA. This mutation changed a highly conserved histine to a glutamine (p.(His252Gln). Her mother with a patent foramen ovale and her unaffected grand-mother carried the mutation [12]. No other of the 49 TGA

cases had a *MYH6* mutation. Four putative heterozygous mutations were found in d-TGA patients in the *NODAL* gene (Glu203Lys, Gly260Arg, Arg275Cys and a deletion/insertion) with demonstrated experimental deleterious consequence [13]. Surprisingly, the Gly260Arg mutation was found in five cases of Hispanic origin. This latter mutation and the Arg275Cys were also found in unaffected parents. *ZIC3* is the most studied gene in this series. It initially was identified through a positional cloning effort in families suffering from heterotaxy with X-linked inheritance [14]. At least 9 additional *ZIC3* mutations have been found in d-TGA patients [15–20]. *ZIC3* mutations have several specificities. They often are associated with midline anomalies (anal stenosis or imperforation, sacral agenesis, horseshoe kidney), extrahepatic biliary atresia, club feet and mild facial dysmorphism. The inheritance is X-linked affecting boys but there were examples of non-penetrance in males [19, 21] and on the contrary, variable expression in females due to biased X-inactivation either revealing a recessive mutation (by inactivation of the normal allele) [15] or switching off a dominant mutation (by inactivation of the mutant allele) [7]. In this latter family, affected children had heterotaxy and CHD but no d-TGA. In addition to these nucleotide mutations, a cryptic chromosomal deletion was instrumental for discovery of the role of *ZIC3* gene in heterotaxy [22]. Whole exome sequencing of trio composed of an affected child and unaffected parents revealed an astonishing ~10% of putatively causal de novo mutations [23]. In this series, 47 d-TGA were included and deleterious variants were found in four genes (*NAA15*, *MKRNK2*, *SMAD2* and *RAB10*). All genes were mutated twice except the *RAB10* gene. *SMAD2* is downstream of *NODAL* signaling enabling transcriptional activation of poised promoter/enhancers by demethylating H3K27me. Copy number variants (CNV) have been implicated in heterotaxy [24]. Among 262 heterotaxic patients, 3 had a d-TGA and a duplication of a gene: *NUP188*, *NEK2* or *TGFBR2*. The involvement of these genes in lateralization was further demonstrated in *Xenopus* developmental experiments. More recently, 39 trios with a d-TGA child and unaffected parents were tested for CNVs [25]. Five small-sized de novo CNVs were found involving genes never previously involved in CHD (deletions: *CENP4* and *PRIMPOL*, *EIF3J* and *SPG11*, and *MACROD2*; duplication: *NTRK3*, and *DDX53*). Finally, a single heterozygous deletion of the *ISLI*

gene was found in a series of 169 d-TGA cases but no *ISL1* point mutations [26]. Parental DNAs were unavailable. By contrast, isolated d-TGA is never seen in 22q11 deletion patients [27].

*d-TGA with embryonic node and primary cilia dysfunction*

Mutations in *NPHP4* are causal in nephronophthisis, an autosomal recessive kidney disease which represents the most common genetic cause of end-stage renal disease in children and young adults. The protein encoded by *NPHP4* is located in the primary cilia of renal epithelial cells. A recent study carried out in a family with autosomal recessive occurrence of heterotaxy with complex cardiovascular malformations including 2 cases of d-TGA found a homozygous mutation in *NPHP4* (p.Arg1044His). Several other heterozygous mutations were found in d-TGA patients [28].

Interestingly, this protein has been shown to be indispensable for normal rotatory cilia beating in Küppfer's vesicle, the equivalent of the embryonic node in the fish embryo. Other genes of the primary cilium encode proteins shared with the embryonic node and can result in heterotaxy (*NPHP2* (alias *INV*), *NPHP3*, *NPHP12* (alias *IFT139*), *OFD1*, *CEP290* (alias *NPHP6*), *BBS1*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS10*, *BBS12*, *LZTFL1* and *MKS1*) but the related syndromes are very rare and include multivisceral anomalies.

*d-TGA with respiratory cilia dysfunction*

Cilia are cytoplasmic cellular protrusions. There are 3 types of cilia in the human body: 1) immotile cilia with 9 pairs of peripheral microtubules. They have a sensory function and are present on many different cell types. 2) Cilia with a rotatory movement. These cilia are found in the embryonic node and play an essential role in a primordial step of lateralization development. They have 9 pairs of peripheral microtubules with dynein arms that are responsible for cilia movement 3) cilia with a windshield type of movement which are located in the upper and lower respiratory tracts. These respiratory cilia are essential for the clearance of inhaled particles including microbes. They have 9 pairs of microtubules with dynein arms and a central microtubule pair surrounded by a complex of proteins and radial spokes. Each of these cilia types has specific proteins and shares some proteins with the other cilia types. Only dysfunction of the nodal cilia may result in heterotaxy and hence d-

TGA but if the defective protein is shared with another cilia type, additional symptoms will be present. In the context of cilia dysfunction, the most frequent associated anomaly is recurrent airway infection due to respiratory ciliary dyskinesia. This disease is called Primary Ciliary Dyskinesia (PCD). In particular, proteins which are components of the dynein arms and those which are essential for the assembly and regulation of dynein arms – the motor of moving cilia - are common to respiratory and embryonic node cilia. By contrast, mutation in genes encoding proteins of the central complex and radial spokes are never responsible for heterotaxy and hence d-TGA. When a protein common to embryonic node and respiratory cilia is abnormal, the occurrence of heterotaxy is about 54% with 45% of complete situs inversus and about 10% of situs ambiguus (incomplete left/right inversion leading to CHD). In about 45% of PCD cases, there is no situs anomaly (situs solitus) [29, 30]. In the most recent study (Shapiro et al. 2014), only one patient had a d-TGA out of a series of 37 PCD with situs ambiguus. This patient had no outer dynein arm and no mutations were found in *DNAIL1* and *DNAH5*. In a series of 43 heterotaxic patients, Nakhleh et al. [31] found ciliary dysfunction in about 42% including 3 patients with d-TGA and associated cardiac malformations. Nevertheless, no homozygous or compound heterozygous mutations were found after testing 10 PCD causal genes (*DNAIL1*, *DNAI2*, *DNAH5*, *DNAH11*, *DNALI1*, *CCDC39*, *CCDC40*, *DNAAF1* (alias *LRRC50*), *DNAAF2* (alias *KTU*) and *NMES1* (*TXNDC3*) which could result in heterotaxy. As of today, there are 5 additional genes which can cause PCD and heterotaxy (*DNAAF3*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC164* and *HEARTR2*).

### Conclusions

There are already numerous d-TGA causal genes but altogether, these causal genes account for only a small percentage of d-TGA. In particular, the genetic factor – presumably located on the X chromosome – which is responsible for the excess of male cases of d-TGA is still elusive since it is not the *ZIC3* gene [15, 16]. Here, we reported only on gene mutations which result in d-TGA, but it can be anticipated that any gene mutation responsible for heterotaxy could be causal for d-TGA. It is

also possible that a substantial percentage of isolated d-TGA is the consequence of mutation in genes which do not lead to heterotaxy when mutated.

**Table 1:** genes and phenotypic description of d-TGA patients

Gene Name	d-TGA plus other cardiac anomalies	Extracardiac anomalies	Familial/Sporadic	Reference
ACVR2B	P1: interrupted IVC, AVC; P2: CAVC, sub-PS, PS, Interrupted IVC, Azygous to SVC	P1: R-sided stomach; P2: midline liver, polysplenia	P1: DNA variant present in unaffected mother, African-American origin	P1: [7]; P2: [6]
CFC1	P1: dextrocardia; P2: dextrocardia, bilateral SVC	P1: L-isomeric lungs, R-sided stomach, transverse liver, intestinal malrotation, polysplenia; P2: R-isomeric lungs, R-sided stomach, asplenia	-	P1, P2: [8]
CFC1	P1: dextrocardia, bilateral SVC	P1: R-isomeric lungs, R-sided stomach, asplenia, P2: pyloric stenosis	P1: DNA variant present in one of the phenotypically normal parents; P2: sporadic	P1: [8]; P2: [9]
GDF1	P1: TAPVR, Common atrium, PS	P1: transverse liver, R-isomeric lungs, asplenia	P1: familial compound mutation	P1: [11]; P2, P3: [10]
MED13L	Three patients	-	P1: DNA variant present in unaffected mother	P1, P2, P3: [5]
NODAL	P1: SV; P2: CAVC, P3: DILV, PA, F1: 6 relatives with diverse CHD	P1: Abdominal SI; P2: abdominal SI, midline liver, asplenia; F1: abdominal SI, asplenia	P1: sporadic; P2: phenotypically normal mother; F1: phenotypically normal father	P1-P3, F1: [13]
ZIC3	P1: CAVC, PA; P2: MA, PS; P3: MA, single ventricle	P1: abdominal SI, asplenia, arhinencephaly, posteriorly placed anus; P2: extrahepatic atresia, abdominal SI, sacral agenesis, rectal stenosis, club feet; P3: asplenia	P1-P3: family LR1	[14]
ZIC3	AVC, PA	Midline stomach, transverse liver, intestinal malrotation	Familial: 1 affected brother	[22]
ZIC3	LSVC, ASD-SV, AVC, HypoRV, PS	Hypertel., large nasal bridge, sagittal suture fusion	Familial: male incomplete penetrance	[19]

ZIC3	P1: bilat SVC, TAPVR, CAVC; P2: interrupted IVC, ASD, VSD, PS; P3: TAPVR, SV, CAVC, PS, PDA; P4: TAPVR, R-atrial isomerism, HLHS	P1: cholestasis with biliary atresia, asplenia; P2: EHBA, imperforate anus, club feet, fused lumbar vertebrae, posterior embryotoxon, low-set ears; P3: horseshoe kidney, asplenia, low-set-ears; P4: intestinal malrotation, abnormal liver lobation, asplenia, webbed neck, R-Isomeric lungs	P1-P3: familial, all affected are males, P4: familial, 2 fetuses	P1-P4: [20]
ZIC3	SV, PA, MA	Asplenia	-	[15]
ZIC3	-	-	-	[18]
ZIC3	P1: PDA; P2: HypoLV, MV, VSD, Ventricular inversion; P3: CAVC, PA	P3: abdominal SI, asplenia	P1, P2: sporadic; P3: 2 sibs with Ivemark, 1 with heart defect	P1-P3: [16]

**Abbreviations:** ASD: Atrial Septal Defect; ASD-SV: ASD sinus venosus type; AVC: AtrioVentricular Canal; CAVC: Canal AtrioVentricular Complete; DILV: Double Inlet Right Ventricle; Dup.: Duplication; F1: family 1; HLHS: Hypoplastic Left Heart Syndrome; Hypertel.: Hyperteleorism; HypoRV: Hypoplastic Right Ventricle; IVS: Inferior Vena Cava; LSVC: Left Superior Vena Cava; LV: Left Ventricle; MA: Mitral Atresia; MV: Mitral Valve; P1, P2, P3: patient number; PA: Pulmonary Atresia; PDA: Patent Ductus Arteriosus; PS: Pulmonary Stenosis; SI: Situs Inversus; SV: Single Ventricle; SVC: Superior Vena Cava; TAPVR: Total Anomalous Pulmonary Venous Return; VSD: Ventricular Septal Defect.

## References

1. Digilio MC, Casey B, Toscano A, Calabro R, Pacileo G, Marasini M, Banaudi E, Giannotti A, Dallapiccola B, Marino B (2001) Complete transposition of the great arteries: patterns of congenital heart disease in familial recurrence. *Circulation* 104:2809–14.
2. Harris JA, Francannet C, Pradat P, Robert E (2003) The epidemiology of cardiovascular defects, part 2: a study based on data from three large registries of congenital malformations. *Pediatr Cardiol* 24:222–35. doi: 10.1007/s00246-002-9402-5
3. Chehab G, Chedid P, Saliba Z, Bouvagnet P (2007) Congenital cardiac disease and inbreeding: specific defects escape higher risk due to parental consanguinity. *Cardiol Young* 17:414–22. doi: S1047951107000704 [pii] 10.1017/S1047951107000704
4. Oyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PK, Melbye M (2009) Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation* 120:295–301. doi: CIRCULATIONAHA.109.857987 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.857987
5. Muncke N, Jung C, Rudiger H, Ulmer H, Roeth R, Hubert A, Goldmuntz E, Driscoll D, Goodship J, Schon K, Rappold G (2003) Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* 108:2843–50. doi: 10.1161/01.CIR.0000103684.77636.CD 01.CIR.0000103684.77636.CD [pii]
6. Kosaki R, Gebbia M, Kosaki K, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, Casey B (1999) Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am J Med Genet* 82:70–6. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19990101)82:1<70::AID-AJMG14>3.0.CO;2-Y [pii]
7. Ma L, Selamet Tierney ES, Lee T, Lanzano P, Chung WK (2012) Mutations in ZIC3 and ACVR2B are a common cause of heterotaxy and associated cardiovascular anomalies. *Cardiol Young* 22:194–201. doi: S1047951111001181 [pii] 10.1017/S1047951111001181
8. Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Saplakoglu U, dela Cruz J, Splitt M, Goodship JA, Towbin J, Bowers P, Ferrero GB, Marino B, Schier AF, Shen MM, Muenke M, Casey B (2000) Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet* 26:365–9. doi: 10.1038/81695
9. Goldmuntz E, Bamford R, Karkera JD, dela Cruz J, Roessler E, Muenke M (2002) CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. *Am J Hum Genet* 70:776–80. doi: S0002-9297(07)60280-8 [pii] 10.1086/339079
10. Karkera JD, Lee JS, Roessler E, Banerjee-Basu S, Ouspenskaia MV, Mez J, Goldmuntz E, Bowers P, Towbin J, Belmont JW, Baxevanis AD, Schier AF, Muenke M (2007) Loss-of-function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet* 81:987–94. doi: S0002-9297(07)63874-9 [pii] 10.1086/522890
11. Kaasinen E, Aittomaki K, Eronen M, Vahteristo P, Karhu A, Mecklin JP, Kajantie E, Aaltonen LA, Lehtonen R (2010) Recessively inherited right atrial isomerism caused by mutations in growth/differentiation factor 1 (GDF1). *Hum Mol Genet* 19:2747–53. doi: ddq164 [pii] 10.1093/hmg/ddq164

12. Granados-Riveron JT, Ghosh TK, Pope M, Bu'Lock F, Thornborough C, Eason J, Kirk EP, Fatkin D, Feneley MP, Harvey RP, Amour JAL, David Brook J (2010) Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Hum Mol Genet* 19:4007–4016. doi: 10.1093/hmg/ddq315
13. Mohapatra B, Casey B, Li H, Ho-Dawson T, Smith L, Fembach SD, Molinari L, Niesh SR, Jefferies JL, Craigen WJ, Towbin JA, Belmont JW, Ware SM (2009) Identification and functional characterization of NODAL rare variants in heterotaxy and isolated cardiovascular malformations. *Hum Mol Genet* 18:861–71. doi: ddn411 [pii] 10.1093/hmg/ddn411
14. Gebbia M, Ferrero GB, Pilia G, Bassi MT, Aylsworth A, Penman-Splitt M, Bird LM, Bamforth JS, Burn J, Schlessinger D, Nelson DL, Casey B (1997) X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat Genet* 17:305–8. doi: 10.1038/ng1197-305
15. Chhin B, Hatayama M, Bozon D, Ogawa M, Schon P, Tohmonda T, Sassolas F, Aruga J, Valard AG, Chen SC, Bouvagnet P (2007) Elucidation of penetrance variability of a ZIC3 mutation in a family with complex heart defects and functional analysis of ZIC3 mutations in the first zinc finger domain. *Hum Mutat* 28:563–70. doi: 10.1002/humu.20480
16. Cowan J, Tariq M, Ware SM (2014) Genetic and functional analyses of ZIC3 variants in congenital heart disease. *Hum Mutat* 35:66–75. doi: 10.1002/humu.22457
17. De Luca A, Sarkozy A, Consoli F, Ferese R, Guida V, Dentici ML, Mingarelli R, Bellacchio E, Tuo G, Limongelli G, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B (2010) Familial transposition of the great arteries caused by multiple mutations in laterality genes. *Heart* 96:673–7. doi: hrt.2009.181685 [pii] 10.1136/hrt.2009.181685
18. D'Alessandro LC, Latney BC, Paluru PC, Goldmuntz E (2013) The phenotypic spectrum of ZIC3 mutations includes isolated d-transposition of the great arteries and double outlet right ventricle. *Am J Med Genet A* 161A:792–802. doi: 10.1002/ajmg.a.35849
19. Megarbane A, Salem N, Stephan E, Ashoush R, Lenoir D, Delague V, Kassab R, Loiselet J, Bouvagnet P (2000) X-linked transposition of the great arteries and incomplete penetrance among males with a nonsense mutation in ZIC3. *Eur J Hum Genet* 8:704–8. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200526
20. Ware SM, Peng J, Zhu L, Fembach S, Colicos S, Casey B, Towbin J, Belmont JW (2004) Identification and functional analysis of ZIC3 mutations in heterotaxy and related congenital heart defects. *Am J Hum Genet* 74:93–105. doi: S0002-9297(07)61948-X [pii] 10.1086/380998
21. D'Alessandro LC, Casey B, Siu VM (2013) Situs inversus totalis and a novel ZIC3 mutation in a family with X-linked heterotaxy. *Congenit Heart Dis* 8:E36–40. doi: 10.1111/j.1747-0803.2011.00602.x
22. Ferrero GB, Gebbia M, Pilia G, Witte D, Peier A, Hopkin RJ, Craigen WJ, Shaffer LG, Schlessinger D, Ballabio A, Casey B (1997) A submicroscopic deletion in Xq26 associated with familial situs ambiguus. *Am J Hum Genet* 61:395–401. doi: S0002-9297(07)64066-X [pii] 10.1086/514857
23. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, Romano-Adesman A, Bjornson RD, Breitbart RE, Brown KK, Carriero NJ, Cheung YH, Deanfield J, DePalma S, Fakhro KA, Glessner J, Hakonarson H, Italia MJ, Kaltman JR, Kaski J, Kim R, Kline JK, Lee T, Leipzig J, Lopez A, Mane SM, Mitchell LE, Newburger JW, Parfenov M, Pe'er I, Porter G, Roberts AE, Sachidanandam R, Sanders SJ, Seiden HS, State MW, Subramanian S, Tikhonova IR, Wang

- W, Warburton D, White PS, Williams IA, Zhao H, Seidman JG, Brueckner M, Chung WK, Gelb BD, Goldmuntz E, Seidman CE, Lifton RP (2013) De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature* 498:220–3. doi: nature12141 [pii] 10.1038/nature12141
24. Fakhro KA, Choi M, Ware SM, Belmont JW, Towbin JA, Lifton RP, Khokha MK, Brueckner M (2011) Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning. *Proc Natl Acad Sci U A* 108:2915–20. doi: 1019645108 [pii] 10.1073/pnas.1019645108
  25. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy JG, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, Mazaika E, Vardarajan B, Italia M, Leipzig J, DePalma SR, Golhar R, Sanders SJ, Yamrom B, Ronemus M, Iossifov I, Willsey AJ, State MW, Kaltman JR, White PS, Shen Y, Warburton D, Brueckner M, Seidman C, Goldmuntz E, Gelb BD, Lifton R, Seidman J, Hakonarson H, Chung WK (2014) Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res* 115:884–896. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304458
  26. Osoegawa K, Schultz K, Yun K, Mohammed N, Shaw GM, Lammer EJ (2014) Haploinsufficiency of insulin gene enhancer protein 1 (ISL1) is associated with d-transposition of the great arteries. *Mol Genet Genomic Med* 2:341–351. doi: 10.1002/mgg3.75
  27. Boudjemline Y, Ferment L, Le Bidois J, Lyonnet S, Sidi D, Bonnet D (2001) Prevalence of 22q11 deletion in fetuses with conotruncal cardiac defects: a 6-year prospective study. *J Pediatr* 138:520–4. doi: S0022-3476(01)15716-1 [pii] 10.1067/mpd.2001.112174
  28. French VM, van de Laar IM, Wessels MW, Rohe C, Roos-Hesselink JW, Wang G, Frohn-Mulder IM, Severijnen LA, de Graaf BM, Schot R, Breedveld G, Mientjes E, van Tienhoven M, Jadot E, Jiang Z, Verkerk A, Swagemakers S, Venselaar H, Rahimi Z, Najmabadi H, Meijers-Heijboer H, de Graaff E, Helbing WA, Willemsen R, Devriendt K, Belmont JW, Oostra BA, Amack JD, Bertoli-Avella AM (2012) NPHP4 variants are associated with pleiotropic heart malformations. *Circ Res* 110:1564–74. doi: CIRCRESAHA.112.269795 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.112.269795
  29. Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, Dell S, Morgan L, Molina PL, Robinson BV, Minnix SL, Olbrich H, Severin T, Ahrens P, Lange L, Morillas HN, Noone PG, Zariwala MA, Knowles MR (2007) Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation* 115:2814–21. doi: CIRCULATIONAHA.106.649038 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649038
  30. Shapiro AJ, Davis SD, Ferkol T, Dell SD, Rosenfeld M, Olivier KN, Sagel SD, Milla C, Zariwala MA, Wolf W, Carson JL, Hazucha MJ, Burns K, Robinson B, Knowles MR, Leigh MW (2014) Laterality Defects other than Situs Inversus Totalis in Primary Ciliary Dyskinesia: Insights into Situs Ambiguus and Heterotaxy. *Chest* 146:1176-86. doi: 1837138 [pii] 10.1378/chest.13-1704
  31. Nakhleh N, Francis R, Giese RA, Tian X, Li Y, Zariwala MA, Yagi H, Khalifa O, Kureshi S, Chatterjee B, Sabol SL, Swisher M, Connelly PS, Daniels MP, Srinivasan A, Kuehl K, Kravitz N, Burns K, Sami I, Omran H, Barnada M, Olivier K, Chawla KK, Leigh M, Jonas R, Knowles M, Leatherbury L, Lo CW (2012) High prevalence of respiratory ciliary dysfunction in congenital heart disease patients with heterotaxy. *Circulation* 125:2232–42. doi: CIRCULATIONAHA.111.079780 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079780